

MARCELLA NOVAES FRANCO

PRODUÇÃO DE CELULASES POR ACTINOMICETOS EM RESÍDUOS
AGRO-INDUSTRIAIS, VISANDO A OBTENÇÃO DE BIOETANOL

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PROF. PAULO DE GÓES
RIO DE JANEIRO
2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Marcella Novaes Franco

PRODUÇÃO DE CELULASES POR ACTINOMICETOS EM RESÍDUOS
AGRO-INDUSTRIAIS, VISANDO A OBTENÇÃO DE BIOETANOL



Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Microbiologia)

Orientadores:

Prof^a. Rosalie Reed Rodrigues Coelho

Prof. Andrew Macrae



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PROF PAULO DE GÓES
RIO DE JANEIRO
FEVEREIRO DE 2009

FICHA CATALOGRÁFICA

Franco, Marcella Novaes

Produção de celulases por actinomicetos em resíduos agro-industriais, visando a obtenção de bioetanol/ Marcella Novaes Franco – Rio de Janeiro, 2009.

x, 70fls.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Rio de Janeiro/ Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, 2009.

Orientadores: Rosalie Reed Rodrigues Coelho
Andrew Macrae

Referências bibliográficas:f 63

1. Actinomicetos
2. *Streptomyces*
3. Celulases
4. Endoglucanases
5. Bioetanol
6. Bagaço de cana de açúcar
 - I. Coelho Rosalie Reed Rodrigues
 - II. UFRJ, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Mestrado em Ciências Biológicas.
 - III. Produção de celulases por actinomicetos em resíduos agro-industriais, visando a obtenção de bioetanol.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Marcella Novaes Franco

PRODUÇÃO DE CELULASES POR ACTINOMICETOS EM RESÍDUOS AGRÔ-INDUSTRIAIS, VISANDO A OBTENÇÃO DE BIOETANOL

Rio de Janeiro, de de .

Alane Beatriz Vermelho, PhD, Universidade Federal do Rio de Janeiro
(Presidente da Banca)

Elba Pinto da Silva Bon, PhD, Universidade Federal do Rio de Janeiro
(Membro da Banca)

Selma Gomes Ferreira Leite, DSc, Universidade Federal do Rio de Janeiro
(Membro da Banca)

Eliana Barreto-Bergter, PhD, Universidade Federal do Rio de Janeiro
(Membro / Revisor)

Marta Helena Branquinha de Sá, DSc, Universidade Federal do Rio de Janeiro
(Suplente Interno)

Mônica Caraméz Triches Damaso, PhD, Empresa Brasileira de Pesquisa
Agropecuária (EMBRAPA)
(Suplente Externo)

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Biotecnologia e Laboratório de Biotecnologia Sustentável e Bioinformática Microbiana, Departamento de Microbiologia Geral, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Centro de Ciências da Saúde (CCS), Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob a orientação dos Professores Rosalie Reed Rodrigues Coelho.

Agradecimentos

À Deus, por me dar forças diante das dificuldades e por me guiar sempre pelo melhor caminho.

Ao meu pai Mauro Leão Franco pelo amor e investimento ao longo da minha vida e minha mãe Mara Delfina Vianna Amaral pelo amor, amizade e incentivo. Sem eles eu não teria conseguido mais esta conquista.

À minha irmã Marina e meu irmão Mauricio, pela amizade, apoio e incentivo.

Ao meu padrasto Héber, minha madrasta Sueli, Tias Claudia e Simone e sogra Francisca por serem tão importantes na minha vida.

Ao meu namorado Antonio pelo carinho, amizade, paciência e compreensão, principalmente pelas palavras de apoio nos momentos mais difíceis.

A professora Rosalie Reed Rodrigues Coelho pela orientação, amizade, conselhos, apoio e dedicação e ao professor Andrew Macrae, pelo apoio, confiança e pelos conhecimentos compartilhados.

A todos os amigos e colegas do Laboratório de Biotecnologia de Actinomicetos que estiveram comigo durante esta etapa da minha vida: Doralice, Fábio, Juliana, Ludmilla, Marta, Mônica, Pedro, Rodrigo Pires, Rodrigo Fonseca. Em especial, gostaria de agradecer ao amigo André Grigorevski, por ter me ensinado grande parte do que sei sobre celulases e pela parceria em muitos experimentos, à amiga Mariana Menezes pela ajuda na realização de alguns experimentos e à Adriana Fróes, pela amizade e conhecimentos compartilhados.

Aos colegas do Laboratório de Biotecnologia Sustentável e Bioinformática Microbiana: Ida Carolina, Bernardo e Cláudia pela amizade e cooperação.

Aos amigos colegas do Laboratório de Taxonomia e Ecologia Microbiana pelo grande companheirismo e amizade, bem como sua presença nos momentos de descontração: Anderson Cabral, Paulinho, Simone, José Olavo e as inesquecíveis Selma e Oscarina. À amiga Zoraidy por todo carinho, incentivo e amizade incondicional. Em especial gostaria de agradecer a professora Leda Mendonça por permitir a utilização do seu laboratório na realização de alguns experimentos.

Ao professor Allen Hagler do Laboratório de Biotecnologia Ambiental por toda contribuição científica e conhecimentos compartilhados, ao colega José Roberto e Patrícia pelo companheirismo e transmissão de conhecimentos, ao amigo Vinício

Barbosa pela confiança, incentivo e apoio espiritual, e em especial, à amiga Tatiana Pinotti por sua presença constante na minha vida, sempre com conselhos e palavras de incentivo e seu namorado Luiz Fernando pela ajuda científica, estatística e computacional.

À Daniele Marinho pela amizade e valiosa ajuda estatística.

À amiga e irmã Nathália Soares Ferreira por sua importância na minha vida e por estar sempre por perto, em todos os momentos.

Aos meus grandes amigos: Kátia, Junior, Aline e Renato, por estarem sempre comigo, me proporcionando momentos maravilhosos.

À professora Elba Bon do Laboratório de Tecnologia Enzimática do Instituto de Química, pela realização de experimentos em seu laboratório, ao doutorando Ricardo Sposina e à Doutora Leda Maria Fortes Gottschalk, pela transmissão de conhecimentos fundamentais à realização deste trabalho.

À professora Alane Beatriz Vermelho, por permitir a utilização de equipamentos do Laboratório Proteases de Microrganismos.

À coordenação do curso de Pós-Graduação em Microbiologia e Imunologia, em especial à secretária Safira, pela imensa ajuda nos momentos em que mais precisei.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro ao laboratório de Biotecnologia de Actinomicetos e à CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho. Muito obrigada.

Aos meus pais Mauro Leão Franco e Mara Delfina Vianna Amaral, minha avó Vilma Novaes (*in memoriam*) e meu namorado Antonio, por todo o amor, apoio e incentivo ao longo da minha vida, contribuindo dia a dia para o meu crescimento pessoal e profissional.

Resumo

Marcella Novaes Franco

PRODUÇÃO DE CELULASES POR ACTINOMICETOS EM RESÍDUOS AGRO-INDUSTRIAIS, VISANDO A OBTENÇÃO DE BIOETANOL

Orientadores: Rosalie Reed Rodrigues Coelho

Andrew Macrae

As estirpes de actinomiceto *Streptomyces* sp. M23 e *Streptomyces drozdowiczii* M7A, isoladas de solo de Mata Atlântica, e a estirpe SCPE 09, ainda não identificada, isolada de solo de canavial, foram selecionadas anteriormente como promissoras para a produção de celulases. No presente trabalho estas estirpes foram testadas quanto a sua capacidade de produção de celulases em resíduos de baixo custo, bagaço de cana de açúcar ou farelo de trigo como fonte de carbono e milhocina como fonte de nitrogênio. Os resultados mostraram que o meio com farelo de trigo proporcionou a maior produção de celulases (CMCase e FPase), e a estirpe *Streptomyces* sp. M23 foi a mais eficiente tanto em relação a produção de CMCase (máximo de 552,0 U/L no terceiro dia de fermentação) quanto à produção de FPase (máximo de cerca de 34,5 U/L também após o terceiro dia de cultivo). Para otimização da atividade enzimática foram testados os sobrenadantes obtidos a partir do cultivo de *Streptomyces* sp. M23 em bagaço de cana e farelo de trigo por três dias. Os perfis de pH e temperatura demonstraram atividade ótima em pH 5,0 e 60° C para CMCase, e em pH 6,0 e 50° C para FPase, para ambos os sobrenadantes. A termoestabilidade dos extratos enzimáticos foi testada a 50° C e 60° C. A 50° C as endoglucanases apresentaram maior tolerância térmica que as FPases, retendo mais de 85% da atividade inicial mesmo após 8 horas de incubação. Os zimogramas realizados com ambos os sobrenadantes mostraram a presença de duas bandas, uma banda comum de massa molecular aparente de 42 kDa, e uma banda de 70 kDa, para o sobrenadante do farelo de trigo e outra de 100 kDa, para o sobrenadante do bagaço de cana. A estirpe *Streptomyces* sp. M23 não apresentou produção significativa de β -glucosidases, nas condições experimentais utilizadas. Os resultados obtidos indicam que as três estirpes são promissoras para aplicações biotecnológicas, capazes de produzir celulases (CMCases e FPases) em resíduos de baixo custo.

Palavras-chave: Actinomicetos, *Streptomyces*, celulases, endoglucanases, bioetanol, bagaço de cana de açúcar, farelo de trigo.

Rio de Janeiro

Fevereiro de 2009

Summary

Marcella Novaes Franco

ACTINOMYCETES CELLULASE PRODUCTION USING AGRO-INDUSTRIAL RESIDUES AIMING AT BIOETHANOL PRODUCTION

Orientadores: Rosalie Reed Rodrigues Coelho

Andrew Macrae

Streptomyces strain M23, *S. drozdowiczii* M7A, isolated from Brazilian Mata Atlântica soil, and an unidentified actinomycete strain SCPE 09, isolated from Brazilian sugarcane plantation soil, were evaluated for cellulase production using sugarcane bagasse and wheat bran, as low cost carbon sources and corn steep liquor as a nitrogen source. Strains grown in media containing wheat bran provided better cellulase production (CMCase and FPase), and of the three strains investigated *Streptomyces* sp. M23 strain was most productive, not only in relation to CMCase activity (maximum of 552,0 U/L, after third day cultivation), but also in relation to FPase activity (maximum of 34,5 U/L, also after the third day). *Streptomyces* strain M23 was selected for detailed study. Supernatants obtained after three days cultivation in sugarcane bagasse and wheat bran were used for enzymatic activity optimization. Temperature and pH profiles showed best CMCase activity at 60° C and pH 5,0, whereas maximum FPase activity occurred at 50° C and pH 6,0, in supernatants from both media. CMCase and FPase thermostability were accessed at 50 and 60° C. The endoglucanase was more thermotolerant than the FPase at 50°C, retaining more than 85% of its activity after 8 hours. Zymograms of both supernatants detected the presence of two bands in each supernatant, one in common, with an apparent molecular weigh of 42 kDa. The second band with wheat bran is 70 kDa, and the second band from the sugarcane bagasse 100 kDa. *Streptomyces* sp M23 did not show significant levels of β -glucosidase production, under the experimental conditions. Three strains have been tested and are capable of producing cellulases (CMCase and FPase) from low cost residues. They are promising for biotechnological applications in particular *Streptomyces* strain M23

Key-words: actinomycete, *Streptomyces*, cellulases, endoglucanases, bioethanol, sugarcane bagasse, wheat bran.

Rio de Janeiro

Fevereiro 2009.

Índice

Erro! Nenhuma entrada de índice analítico foi encontrada.

Lista de Figuras

FIGURA 1 – BAGAÇO DE CANA DE AÇÚCAR	6
FIGURA 2 – ESTRUTURA QUÍMICA DA CELULOSE.....	7
FIGURA 3 – MECANISMO DE AÇÃO DAS CELULASES ATRAVÉS DO SINERGISMO ENTRE ENDOGLUCANASES, EXOGLUCANASES E B-GLUCOSIDADES (BÉGUIN & AUBERT, 1994).....	9
FIGURA 4 - ACTINOMICETOS E SUA DIVERSIDADE DE MORFOTIPOS COLONIAIS.....	15
FIGURA 5 - FRASCOS ERLENMEYERS DE 125 mL CONTENDO MEIO DE SAIS, FARELO DE TRIGO COMO FONTE DE CARBONO E MILHOCINA COMO FONTE DE NITROGÊNIO.....	25
FIGURA 6 – FONTES DE CARBONO UTILIZADAS NAS FERMENTAÇÕES. A – FARELO TRIGO E B – BAGAÇO DE CANA DE AÇÚCAR PRÉ-TRATADO POR EXPLOSÃO A VAPOR.	25
FIGURA 7 – BAGAÇO DE CANA DE AÇÚCAR UTILIZADO NA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA. A - SEM TRATAMENTO, B – TRATADO POR EXPLOSÃO A VAPOR.	32
FIGURA 8 – CINÉTICA DA PRODUÇÃO DE ENDOGLUCANASES (CMCASE) POR <i>STREPTOMYCES DROZDOWICZII</i> M7A(▲), SCPE 09 (■) E <i>STREPTOMYCES</i> SP. M23 (◆), EM MEIO LÍQUIDO DE SAIS ADICIONADO DE 1,0% DE BAGAÇO DE CANA DE AÇÚCAR E 1,2% DE MILHOCINA. AS CURVAS TRACEJADAS INDICAM A VARIAÇÃO NO PH DO MEIO DE CULTURA APÓS 5 DIAS DE CRESCIMENTO DAS ESTIRPES <i>STREPTOMYCES DROZDOWICZII</i> M7A(--▲--), SCPE 09 (--■--) E <i>STREPTOMYCES</i> SP. M23 (--◆--). AS BARRAS DE ERROS REPRESENTAM O DESVIO PADRÃO (N = 3).....	34
FIGURA 9 – CINÉTICA DA PRODUÇÃO DE ENDOGLUCANASES (CMCASE) POR <i>STREPTOMYCES DROZDOWICZII</i> M7A(▲), SCPE 09 (■) E <i>STREPTOMYCES</i> SP. M23 (◆), EM MEIO LÍQUIDO DE SAIS ADICIONADO DE 1,0% DE FARELO DE TRIGO E 1,2% DE MILHOCINA. AS CURVAS TRACEJADAS INDICAM A VARIAÇÃO NO PH DO MEIO DE CULTURA APÓS 5 DIAS DE CRESCIMENTO DAS ESTIRPES <i>STREPTOMYCES DROZDOWICZII</i> M7A(--▲--), SCPE 09 (-■--) E <i>STREPTOMYCES</i> SP. M23 (--◆--). AS BARRAS DE ERROS REPRESENTAM O DESVIO PADRÃO (N = 3).....	35
FIGURA 10 – CINÉTICA DA PRODUÇÃO DE CELULASES (FPASE) POR <i>STREPTOMYCES DROZDOWICZII</i> M7A(▲), SCPE 09 (■) E <i>STREPTOMYCES</i> SP. M23 (◆), EM MEIO LÍQUIDO DE SAIS ADICIONADO DE 1,0% DE BAGAÇO DE CANA DE AÇÚCAR E 1,2% DE MILHOCINA. AS CURVAS TRACEJADAS INDICAM A VARIAÇÃO NO PH DO MEIO DE CULTURA APÓS 5 DIAS DE CRESCIMENTO DAS ESTIRPES <i>STREPTOMYCES DROZDOWICZII</i> M7A(--▲--), SCPE 09 (--■--) E <i>STREPTOMYCES</i> SP. M23 (--◆--). AS BARRAS DE ERROS REPRESENTAM O DESVIO PADRÃO (N = 3).....	36
FIGURA 11 – CINÉTICA DA PRODUÇÃO DE CELULASES (FPASE) POR <i>STREPTOMYCES DROZDOWICZII</i> M7A(▲), SCPE 09 (■) E <i>STREPTOMYCES</i> SP. M23 (◆), EM MEIO LÍQUIDO DE SAIS ADICIONADO DE 1,0% DE FARELO DE TRIGO E 1,2% DE MILHOCINA. AS CURVAS TRACEJADAS INDICAM A VARIAÇÃO NO PH DO MEIO DE CULTURA APÓS 5 DIAS DE CRESCIMENTO DAS ESTIRPES <i>STREPTOMYCES DROZDOWICZII</i> M7A(--▲--), SCPE 09 (-■--) E <i>STREPTOMYCES</i> SP. M23 (--◆--). AS BARRAS DE ERROS REPRESENTAM O DESVIO PADRÃO (N = 3).....	37
FIGURA 12 – VALORES MÁXIMOS DE PRODUÇÃO DE ENDOGLUCANASE (CMCASE) PELAS ESTIRPES <i>STREPTOMYCES DROZDOWICZII</i> M7A (■), <i>STREPTOMYCES</i> SP. M23 (■) E SCPE 09 (■), EM MEIO DE CULTIVO CONTENDO BAGAÇO DE CANA DE AÇÚCAR OU FARELO DE TRIGO. OS NÚMEROS ACIMA DE CADA BARRA CORRESPONDEM AO PERÍODO DA INCUBAÇÃO EM DIAS. AS BARRAS DE ERROS REPRESENTAM O DESVIO PADRÃO (N = 3).....	38
FIGURA 13 – VALORES MÁXIMOS DE PRODUÇÃO DE CELULASES (FPASE) PELAS ESTIRPES <i>STREPTOMYCES DROZDOWICZII</i> M7A (■), <i>STREPTOMYCES</i> SP. M23 (■) E SCPE 09	

(■), EM MEIO DE CULTIVO CONTENDO BAGAÇO DE CANA DE AÇÚCAR OU FARELO DE TRIGO. OS NÚMEROS ACIMA DE CADA BARRA CORRESPONDEM AO PERÍODO DA INCUBAÇÃO EM DIAS. AS BARRAS DE ERROS REPRESENTAM O DESVIO PADRÃO (N = 3).	38
FIGURA 14 – EFEITO DA TEMPERATURA NA ATIVIDADE DE CMCASE, MEDIDA EM TAMPÃO PH 4,8, DOS SOBRENADANTES DE <i>STREPTOMYCES</i> SP. M23 OBTIDOS A PARTIR DO CULTIVO DESSA ESTIRPE EM BAGAÇO DE CANA DE AÇÚCAR (●) E FARELO DE TRIGO (■). AS BARRAS DE ERROS REPRESENTAM O DESVIO PADRÃO (N = 3).....	39
FIGURA 15 – EFEITO DO PH NA ATIVIDADE CMCASE DOS SOBRENADANTES DE <i>STREPTOMYCES</i> SP. M23 OBTIDOS A PARTIR DO CULTIVO DESSA ESTIRPE EM BAGAÇO DE CANA DE AÇÚCAR (●) E FARELO DE TRIGO (■). AS BARRAS DE ERROS REPRESENTAM O DESVIO PADRÃO (N = 3).....	40
FIGURA 16 - EFEITO DA TEMPERATURA NA ATIVIDADE DE FPASE DOS SOBRENADANTES DE <i>STREPTOMYCES</i> SP. M23, OBTIDOS A PARTIR DO CULTIVO DESSA ESTIRPE EM BAGAÇO DE CANA DE AÇÚCAR (●) E FARELO DE TRIGO (■). AS BARRAS DE ERROS REPRESENTAM O DESVIO PADRÃO (N = 3).....	41
FIGURA 17- EFEITO DO PH NA ATIVIDADE FPASE DOS SOBRENADANTES DE <i>STREPTOMYCES</i> SP. M23 OBTIDOS A PARTIR DO CULTIVO DESSA ESTIRPE EM BAGAÇO DE CANA DE AÇÚCAR (●) E FARELO DE TRIGO (■). AS BARRAS DE ERROS REPRESENTAM O DESVIO PADRÃO (N = 3).	42
FIGURA 18 - ESTUDO DA TERMOESTABILIDADE NA ATIVIDADE DE ENDOGLUCANASES DOS SOBRENADANTES DE <i>STREPTOMYCES</i> SP. M23 OBTIDOS A PARTIR DO CULTIVO DESSA ESTIRPE EM BAGAÇO DE CANA DE AÇÚCAR INCUBADO A 50° C (▲) E 60° C (●) E FARELO DE TRIGO INCUBADO A 50°C (■) E 60° C (◆). AS BARRAS DE ERROS REPRESENTAM O DESVIO PADRÃO (N = 3).....	44
FIGURA 19 - ESTUDO DA TERMOESTABILIDADE NA ATIVIDADE DE FPASE DOS SOBRENADANTES DE <i>STREPTOMYCES</i> SP. M23 OBTIDOS A PARTIR DO CULTIVO DESSA ESTIRPE EM BAGAÇO DE CANA DE AÇÚCAR INCUBADO A 50° C (▲) E 60° C (●) E FARELO DE TRIGO INCUBADO A 50°C (■) E 60° C (◆). AS BARRAS DE ERROS REPRESENTAM O DESVIO PADRÃO (N = 3).....	45
FIGURA 20 – PERFIL ELETROFORÉTICO DE ENDOGLUCANASES DO EXTRATO BRUTO DE <i>STREPTOMYCES</i> SP. M23 CULTIVADO POR TRÊS DIAS EM: A – 1,0% DE FARELO DE TRIGO E 1,2% DE MILHOCINA E B – 1,0% BAGAÇO DE CANA E 1,2% DE MILHOCINA. OS VALORES DAS MASSAS MOLECULARES APARENTES DE PROTEÍNAS PADRÃO ESTÃO INDICADOS AO LADO DAS SETAS.	46
FIGURA 21 – AÇÚCARES REDUTORES PRODUZIDOS A PARTIR DA DEGRADAÇÃO DE BAGAÇO DE CANA PRÉ-TRATADO POR CELULASES DE <i>TRICHODERMA REESEI</i> RUT C30 (▲) E <i>STREPTOMYCES</i> SP. M23 (◆) E BAGAÇO DE CANA SEM TRATAMENTO POR CELULASES DE <i>TRICHODERMA REESEI</i> RUT C30 (▲) E <i>STREPTOMYCES</i> SP. M23 (◆).AS BARRAS DE ERROS REPRESENTAM O DESVIO PADRÃO (N = 3).....	48
FIGURA 22 – PRODUÇÃO DE GLICOSE A PARTIR DA DEGRADAÇÃO DE BAGAÇO DE CANA PRÉ-TRATADO POR CELULASES DE <i>TRICHODERMA REESEI</i> RUT C30 (▲) E <i>STREPTOMYCES</i> SP. M23 (◆) E BAGAÇO DE CANA SEM TRATAMENTO POR CELULASES DE <i>TRICHODERMA REESEI</i> RUT C30 (▲) E <i>STREPTOMYCES</i> SP. M23 (◆). AS BARRAS DE ERROS REPRESENTAM O DESVIO PADRÃO (N = 3).....	48

Lista de Siglas e Abreviaturas

- APS: Persulfato de amônia
- CMC: Carboximetilcelulose
- CMCase: Atividade de endoglucanases sobre CMC
- CPP: Cellulose paper powder
- DNS: Ácido dinitrosalicílico
- FPase: Atividade de endoglucanases e exoglucanases sobre papel de filtro
- kDa: kilo Daltons
- Proálcool: Programa Nacional do Alcool
- rpm: Rotações por minuto
- SDS-PAGE: Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes

1. Introdução

1.1. Etanol

O etanol (C_2H_5OH) pertence a classe dos álcoois, cujas moléculas contêm um grupamento hidroxila ligado a um átomo de carbono, sendo obtido por fermentação ou síntese. No processo fermentativo é produzido com base na cana de açúcar, na beterraba ou no amido de cereais, como o milho e outros grãos (BASTOS, 2007). O etanol é o biocombustível líquido mais utilizado no mundo e grande parte da sua produção comercial é realizada a partir de açúcar de cana ou de beterraba (DEMIRBAS, 2007).

1.1.1. Histórico da utilização do etanol no Brasil

O etanol é utilizado no Brasil como combustível desde a primeira metade do século 20. A sua utilização como fonte renovável de energia se iniciou através do estímulo de políticas públicas. A partir de 1931 foi dado início à primeira política pública nacional visando à mistura do álcool anidro à gasolina (PUPPIM DE OLIVEIRA, 2002), mas sua utilização em larga escala teve início bem mais tarde, em 1975, quando o governo brasileiro criou o Programa Nacional do Álcool (Proálcool), havendo então uma intensificação do uso da mistura do etanol à gasolina. O objetivo principal do Proálcool consistia na substituição do uso da gasolina pelo álcool, obtido de biomassas como cana de açúcar e mandioca, diminuindo assim a dependência do Brasil ao petróleo estrangeiro. O governo passou, então, a investir nas destilarias, visando o aumento na produção deste combustível (ROSILLO-CALLE & CORTEZ, 1998).

No Brasil, o etanol foi amplamente utilizado como combustível até 1990. Em 1985 a venda de automóveis movidos a etanol chegou a representar 96% do mercado, no entanto, a partir daí, vários fatores levaram a um decréscimo nas vendas dos mesmos. Entre eles, o aumento do preço do álcool no mercado e o início da produção em massa de carros populares, que não poderiam ser facilmente adaptados ao álcool combustível sem um aumento no seu preço final. Como consequência, as vendas de carros que utilizavam apenas o etanol puro como combustível caíram vertiginosamente, culminando com o abandono das políticas governamentais de incentivo (MOREIRA & GOLDENBERG, 1999).

Atualmente o percentual de etanol anidro misturado à gasolina é de 25%, e o consumo de etanol como combustível voltou a crescer em decorrência da comercialização de carros com motor “flex”. Estes carros possuem motores capazes de funcionar com gasolina misturada ao álcool em qualquer proporção, bem como com 100% de álcool puro. Nos últimos anos, cerca de 60% do total de veículos produzidos no Brasil possuem o motor “flex” (GRAD, 2006). Segundo a Associação Nacional dos Fabricantes de Veículos Automotores (ANFAVEA), 87,2% do total de vendas ao longo de 2008 foram de veículos modelo bicombustível “flex” (MOREIRA, 2009).

No Brasil, estudos indicam que em 2013, a demanda de etanol será em torno de 32 bilhões de litros, o que representa o dobro da produção atual. A implementação da mistura do etanol ao óleo diesel também contribuirá para o aumento do consumo desse álcool. É provável que a colheita de cana de açúcar no mesmo período não seja suficiente para suprir as necessidades do mercado consumidor, o que torna imprescindível a adoção de práticas alternativas de produção (BON, GIRIO & PEREIRA JUNIOR, 2008).

Além do fato de que os estoques de petróleo, uma fonte de energia não renovável, deverão acabar num futuro não muito remoto, nos dias atuais um outro fator tem auxiliado para a retomada da utilização do etanol como combustível - a preocupação com o meio ambiente. A queima de combustíveis fósseis tem contribuído ao longo dos anos para o efeito estufa, tendo em vista a grande quantidade de gases emitidos na atmosfera. O CO₂ é o gás que mais contribui para o aquecimento global, e sua permanência na atmosfera pode durar décadas. Com isso, torna-se muito importante a utilização de fontes alternativas de energia, produzidas a partir de materiais renováveis (BON, GIRIO & PEREIRA JUNIOR, 2008).

1. 2. Aproveitamento de resíduos lignocelulósicos para a produção de etanol

O etanol produzido convencionalmente a partir de matérias-primas sacaríneas ou amiláceas é denominado etanol de primeira geração. Neste caso a produção ocorre a partir da fermentação, principalmente de sacarose de caldo de cana, ou glicose da hidrólise de amido, por leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae*. Porém quando este combustível é produzido a partir de biomassa lignocelulósica é denominado etanol de segunda geração, e neste caso a degradação da mesma pode ocorrer por métodos físicos ou químicos, mas principalmente através da utilização de enzimas – as hidrolases (BON, GIRIO & PEREIRA JUNIOR, 2008).

A necessidade de um aumento de matérias primas para a produção de etanol, sem a interferência nas áreas reservadas para plantação de alimentos, fez surgir no mundo o interesse por novas tecnologias, dando origem ao etanol de segunda geração. O etanol de segunda geração pode ser produzido a partir de resíduos agrícolas, agroindustriais e florestais, bem como matérias-primas provenientes de

sobras e resíduos de produtos naturais como bagaço e palha da cana de açúcar, o sabugo e a palha de milho, as palhas de trigo e arroz, restos de madeira processada, e resíduos municipais baseados em papel (BASTOS, 2007).

Os materiais lignocelulósicos são os compostos orgânicos mais abundantes na biosfera e participam com aproximadamente 50% da biomassa terrestre. 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). Tanto a celulose quanto a hemicelulose podem ser convertidas em açúcares fermentáveis para a produção de bioetanol (BASTOS, 2007).

A composição dos resíduos lignocelulósicos apresenta variações, de acordo com sua origem. Na tabela podemos observar a composição de diversos destes materiais, e verificar que podem ser considerados uma fonte barata, renovável e abundante para a obtenção de glicose e outros açúcares fermentáveis. Graças a isso tem recebido grande atenção nas últimas décadas, representando uma importante rota alternativa para a produção de etanol (CHEN, XIA & XUE, 2007), já que contribui não só para a redução do consumo de petróleo como também para a redução da poluição ambiental (DEMIRBAS, 2007).

Tabela 1. Composição de diferentes materiais lignocelulósicos (BON, GIRIO & PEREIRA JUNIOR, 2008).

Componente %	Sabugo de milho	Palha de trigo	Palha de arroz	Bagaço de Cana	Semente de algodão	Jornal	Resíduos urbanos
Glicose	39,0	36,6	41,0	38,1	20,0	64,4	40,0
Manose	0,3	0,8	1,8	-	2,1	16,6	8,0
Galactose	0,8	2,4	0,4	1,1	0,1	-	-
Xilose	14,8	19,2	14,8	23,3	4,6	4,6	13,0
Arabinose	3,2	2,4	4,5	2,5	2,3	0,5	2,0
Lignina	15,1	14,5	9,9	18,4	17,6	21,0	20,0
Cinzas	4,3	9,6	2,4	2,8	14,8	0,4	1,0
Proteína	4,0	3,0	-	3,0	3,0	-	-

1.2.1. Projeto Bioetanol

Visando o aproveitamento de biomassa de cana de açúcar para produção de bioetanol foi criado, no Brasil, um projeto denominado Bioetanol, financiado pela FINEP. O projeto Bioetanol conta com a participação de cerca de 150 pesquisadores, 14 universidades e 15 institutos de pesquisa. Este projeto visa o desenvolvimento de uma tecnologia brasileira para a conversão de bagaço e palha de cana de açúcar em etanol. A hidrólise da biomassa da cana de açúcar para a produção de açúcares fermentáveis está sendo efetuada utilizando as enzimas celulasas. Neste projeto, processos de pré-tratamento da biomassa de cana de açúcar são desenvolvidos, bem como a caracterização da biomassa antes e após o seu pré-tratamento. A produção de enzimas, hidrólise enzimática, caracterização dos xaropes, fermentação para a produção de etanol e otimização energética são áreas que também estão sendo abordadas.

A estimativa da produção nacional de cana de açúcar no segundo semestre de 2008 destinada à indústria sucro-alcooleira é de 558,72 milhões de toneladas, correspondendo a 11,4% a mais do que os 501,54 milhões de toneladas

processadas na safra passada (CONAB, 2008). No Brasil cerca de 16 milhões de toneladas de bagaço de cana de açúcar (Figura 1) e 76 milhões de toneladas de palha são gerados anualmente (BON, GIRIO & PEREIRA JUNIOR, 2008).



Fonte:http://www.editoravalete.com.br/site_alcoolbras/edicoes/ed_95/ed_95a.html

Figura 1 – Bagaço de cana de açúcar

A biomassa de bagaço resultante da indústria é utilizada para aquecer os caldeirões de fermentação para a produção de bioetanol. Entretanto, parte dessa biomassa pode ser utilizada para a obtenção de mais bioetanol.

O bagaço de cana de açúcar possui uma estrutura complexa, sendo composto por 50% de celulose, 25% de hemicelulose e 25% de lignina. Antes da hidrólise enzimática é submetido a um processo de pré-tratamento, visando desestabilizar a estrutura lignocelulósica. Existem processos de pré-tratamento físicos, físico-químicos, químicos ou biológicos. A explosão a vapor é um método muito utilizado no pré-tratamento de materiais lignocelulósicos. Neste processo, a hemicelulose é degradada e a lignina sofre transformação devido à alta temperatura, aumentando assim a eficiência da hidrólise da celulose (SUN & CHEN, 2002).

1.3. Celulose

A celulose é o biopolímero renovável mais abundante do globo terrestre e possui importância mundial como matéria-prima industrial e fonte de energia renovável (TEERI, 1997; JOSHI & MANSFIELD, 2007). A celulose é um polímero linear formado por unidades de glicose ligadas entre si por ligações β – 1,4 (Figura 2). As cadeias de celulose se encontram organizadas em arranjos ordenados, formando microfibrilas insolúveis, estabilizadas através de ligações de hidrogênio entre as cadeias (IGARASHI, WADA & SAMEJIMA, 2007). A celobiose, um dímero de glicose, é a unidade repetitiva do polímero (ARISTIDOU & PENTILLÄ, 2000).

As microfibrilas apresentam regiões com elevado grau de cristalinidade, apresentando 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 & PEREIRA JUNIOR, 2008). Diferentemente do amido, um polímero de reserva, a celulose possui papel estrutural, protegendo a célula vegetal contra a ação da pressão osmótica e estresses mecânicos (BÉGUIN & ALBERT, 1994).

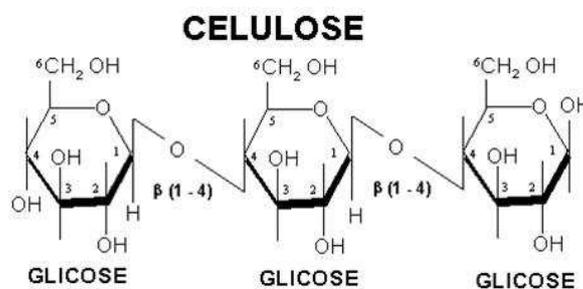


Figura 2 – Estrutura química da celulose.

1.3.1. Degradação biológica da celulose – as celulases

Nos ambientes naturais a celulose é digerida exclusivamente por microrganismos, distribuídos entre o grupo das eubactérias e dos fungos. A degradação microbiana da celulose é realizada através da atuação de um complexo enzimático, as celulases (Figura 3). Essas enzimas fazem parte da família das glicosil-hidrolases, que hidrolisam oligossacarídeos e polissacarídeos e reconhecem as ligações $\beta - 1,4$ entre as moléculas de glicose (HAICHAR *et al.*, 2007). O complexo enzimático celulolítico consiste de três classes de enzimas que atuam sinergisticamente na hidrólise da celulose: endoglucanases (1,4- β -D-glucan-glucanohidrolase), exoglucanases (exo 1,4- β -D-glucan-celobiohidrolase) e β -D-glucosidases ou celobiasas (JUHÁSZ *et al.*, 2005).

As endoglucanases (EC 3.2.1.4) são as enzimas responsáveis por iniciar a hidrólise da molécula de celulose. Essas enzimas atuam randomicamente na região amorfa da cadeia de celulose, clivando ligações $\beta - 1,4$ na região central da molécula e liberando como produto oligossacarídeos de diversos graus de polimerização (DIENES, EGYHÁZI & RÉCZEY, 2004). A carboximetilcelulose (CMC) é utilizada como substrato preferencial para a atividade dessas enzimas (CAO & TAN, 2002).

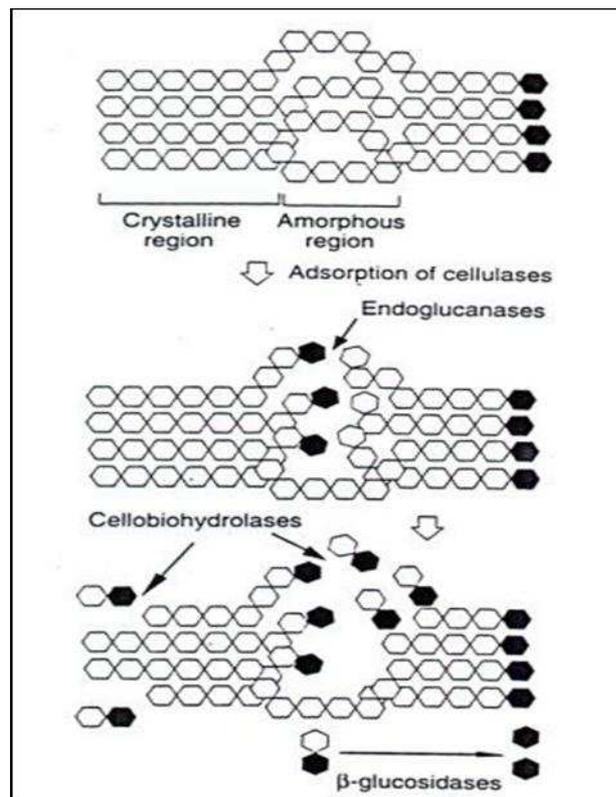


Figura 3 – Mecanismo de ação das celulases através do sinergismo entre endoglucanases, exoglucanases e β -glucosidases (BÉGUIN & AUBERT, 1994).

As exoglucanases ou celobiohidrolases (EC 3.2.1.91) atuam nas extremidades da molécula de celulose microcristalina, liberando unidades de celobiose (CAO & TAN, 2002). As celobiohidrolases podem ser de dois tipos: a tipo I, que hidrolisa terminais redutores, e as do tipo II, que hidrolisa terminais não redutores. As celobiohidrolases sofrem inibição pelo seu produto de hidrólise, a celobiose, por isso é de grande importância a atuação de outras enzimas do complexo celulolítico – as β – glucosidases (BON, GIRIO & PEREIRA JUNIOR, 2008). As β – glucosidases são enzimas que catalisam a hidrólise da celobiose a glicose, reduzindo assim a inibição das endoglucanases e exoglucanases pela presença deste dímero (PETROVA, BAKALOVA & KOLEV, 2002).

1.3.2. Produção de celulases por microrganismos em resíduos lignocelulósicos

O uso de resíduos e biomassa celulósica de baixo custo na produção de celulases, além de reduzir bastante o valor gasto com a produção dessas enzimas, pode também resultar em uma produtividade equivalente àquela obtida em outras fontes de carbono como a lactose (ADSUL *et al.*, 2004). Carboidratos ou seus derivados são indutores de grande parte das enzimas celulolíticas, por isso, a fonte de carbono utilizada é de grande importância na produção de enzimas. Altos rendimentos de celulases têm sido obtidos através da utilização de fontes de carbono contendo celulose (JUHÁSZ *et al.*, 2005).

Muitos microrganismos podem ser cultivados em bagaço de cana de açúcar. O cultivo pode ser realizado através de processos de fermentação líquida ou fermentação sólida. Na fermentação líquida, ou submersa, o bagaço poderá ser hidrolisado, sendo o produto da hidrólise utilizado como substrato. Na fermentação em estado sólido, o bagaço pode ser utilizado não só como fonte de carbono como também como suporte sólido (PANDEY *et al.*, 2000). Outro exemplo de resíduo que tem sido utilizado na produção de celulases por microrganismos é o farelo de trigo. O farelo de trigo é um subproduto da indústria de moagem de trigo e representa uma importante fonte de açúcares. Este resíduo é constituído principalmente de amido, glucuronoarabinoxilanas, celuloses, β -glucanas, proteína e lignina (PALMAROLA-ADRADOS *et al.*, 2005).

1.3.3. Aplicação das celulases na indústria

Além da aplicação de celulases para a degradação de resíduos agroindustriais visando à obtenção de bioetanol, que é um dos objetivos do projeto Bioetanol, acima exposto, as celulases possuem ainda grande importância econômica, podendo ser aplicadas em uma ampla variedade de atividades industriais. As principais aplicações são nas indústrias alimentícias, ração animal, têxtil, detergente e cervejarias. Outras áreas incluem a indústria de polpa e papel, gestão de resíduos e indústria médico-farmacêutica (BHAT & BHAT, 1997).

As celulases podem ser utilizadas nas indústrias alimentícias em conjunto com as hemicelulases e pectinases, na extração e clarificação de sucos de fruta. Após o esmagamento das frutas, essas enzimas são utilizadas para aumentar a liquefação através da degradação da fase sólida. O processamento enzimático aumenta a produtividade e melhora a qualidade do produto (BHAT, 2000).

As celulases têm sido utilizadas também no processamento de ração animal. O tratamento de silagem com essas enzimas é benéfico, pois aumenta a sua digestibilidade (BÉGUIN & AUBERT, 1994). A utilização de celulases na ração animal melhora a sua qualidade nutricional e favorece a digestão de ruminantes e monogástricos (BHAT, 2000).

A utilização de celulases na indústria têxtil vem aumentando nos últimos anos e atualmente estas enzimas correspondem ao terceiro grupo mais utilizado. A principal vantagem do seu uso é a sua capacidade de modificar as fibras celulósicas de forma controlada, resultando em um produto de melhor qualidade. A bioestonagem e biopolimento constituem os processos mais conhecidos na indústria têxtil (VYAS, VYAS & VYAS, 2006).

As celulasas têm sido utilizadas também na fabricação de detergentes, pois são capazes de alterar a estrutura das fibras de celulose. A adição dessas enzimas nos detergentes facilita a remoção da sujeira e contribui para a manutenção da maciez, brilho e cor dos tecidos (BHAT, 2000). As celulasas utilizadas para esta finalidade devem ser estáveis em valores extremos de pH e temperatura e com isso, microrganismos produtores de celulasas com essas características têm sido procurados (GEORGE, AHMAD & RAO, 2001).

1.3.4. Microrganismos celulolíticos

Podemos encontrar microrganismos celulolíticos aeróbios e anaeróbios em uma ampla variedade de grupos taxonômicos. A maioria destes microrganismos pertence ao grupo das bactérias, e dos fungos, entretanto, protozoários anaeróbicos produtores de celulasas já foram isolados de rúmen animal. Gêneros dentro do domínio Archea já foram descritos na literatura, capazes de produzir celulasas termoestáveis, com atividade em torno de 100° C. Como exemplo podemos citar *Pyrococcus*, *Sulfolobus* e *Thermatoga* (HAKI & RAKSHIT, 2003). Bactérias pertencentes aos gêneros *Clostridium*, *Bacillus*, *Ruminococcus*, *Bacteriodes*, *Erwinia*, *Acetovibrio*, *Microbispora* e bactérias do grupo dos actinomicetos como os gêneros *Streptomyces*, *Cellulomonas* e *Thermomonospora* são produtoras de celulasas (BÉGUIN & AUBERT, 1994). Dentre os actinomicetos o gênero *Streptomyces* tem sido um dos mais estudados (JANG & CHEN, 2003; GRIGOREVSKI-LIMA *et al.*, 2005 & ALANI, ANDERSON & MOO-YOUNG, 2008).

Dentre os fungos, *Sclerotium rolfsii*, *Phanerochaete chrysosporium* e espécies de *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Schizophyllum* e *Penicillium* são uns dos mais citados

na literatura (PRASAD, SINGH & JOSHI, 2007). As celulasas de *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 & ZHAO, 2006). Aparentemente estes microrganismos 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* e *Aspergillus*.

Grande parte dessas enzimas apresenta estabilidade em faixas limitadas de temperatura e pH (ALANI, ANDERSON & MOO-YOUNG, 2008). Celulasas 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 maneira, as celulasas 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 celulasas termoestáveis produzidas por *Streptomyces* transformantes têm sido recuperadas. Recentemente, Alani, Anderson & Moo-Young (2008) conseguiram isolar uma estirpe de *Streptomyces* produtora de celulasas termoalcalofílicas.

Outra estirpe de *Streptomyces*, a M23, isolada no Japão, produz um tipo de exoglucanase (CBHII) que apresenta termoestabilidade a 100° C. Essa celulase pode ser a enzima de maior estabilidade dentre as produzidas pelo gênero *Streptomyces*. Devido essa característica, o gene que codifica essa celulase foi clonado e seqüenciado. Posteriormente foi subclonado em um plasmídio, sendo

expresso em *S. lividans* TK-24, que foi capaz de secretar a enzima de forma eficiente (PARK *et al.*, 2005). Como podemos ver, os actinomicetos têm se mostrado promissores na produção de celulases, incluindo aquelas com características termoestáveis e alcalofílicas que são ideais para utilização em processos industriais e biotecnológicos.

Em termos comerciais os fungos tem sido utilizados na produção de enzimas-padrão, como aquelas produzidas por *Trichoderma reesei*, comercializadas pela Sigma-Aldrich. Embora os actinomicetos produzam celulases com grande potencial biotecnológico, pouco se tem relatado da comercialização de celulases de actinomicetos. No mercado temos a Indi-age neutra, produzida por *Streptomyces lividans*, e comercializada pela Genencor (COELHO & NASCIMENTO, 2008).

1.4. Actinomicetos

As bactérias pertencentes à classe Actinobacteria são chamadas informalmente de actinomicetos. São bactérias filamentosas, Gram positivas, que contém um alto índice G+C em seu genoma (MINCER *et al.*, 2002), e possuem caracteristicamente uma grande diversidade de morfotipos coloniais (Figura 4). Anteriormente estes microrganismos eram classificados como fungos, devido à presença de hifas aéreas verdadeiras, característica comum aos fungos. Entretanto, a composição de sua parede celular, em especial seu envelope lipídico e a composição de peptidoglicana, fizeram com que esses microrganismos fossem então reconhecidos como bactérias aeróbias verdadeiras (MCNEIL & BROWN, 1994).



Fonte: <http://www.dbsm.uninsubria.it/biotemic/images/actinomycetes.JPG>

Figura 4 - Actinomicetos e sua diversidade de morfotipos coloniais.

A maioria dos gêneros pertencentes a este grupo é formada por microrganismos aeróbios, entretanto alguns poderão ser anaeróbios facultativos ou obrigatórios. Os actinomicetos são quimioheterotróficos e poderão utilizar uma ampla variedade de fontes de energia, inclusive polímeros complexos. Grande parte dos actinomicetos é de vida livre, sendo uma minoria associada a patologias em humanos, animais ou plantas (HOLT *et al.*, 1994). Algumas espécies do gênero *Frankia* podem fixar nitrogênio através da simbiose com plantas (MINCER *et al.*, 2002).

Os actinomicetos possuem uma grande variedade bioquímica, e são considerados um importante grupo de bactérias devido à capacidade de produção de metabólitos secundários. São considerados também uma fonte promissora de enzimas de diferentes especificidades (COELHO & NASCIMENTO, 2008). Os metabólitos secundários produzidos compreendem muitos produtos de importância econômica da indústria farmacêutica, já disponíveis no mercado. Por outro lado, os produtos do metabolismo secundário, mais especificamente os antibióticos, podem garantir aos actinomicetos uma vantagem ecológica nos ambientes naturais. Uma outra importância ecológica diz respeito a sua habilidade em degradar moléculas

complexas, como por exemplo, materiais lignocelulósicos, sendo, portanto, importantes agentes em processos de decomposição (ABDULLA & EL-SHATOURY, 2007).

As enzimas hidrolíticas extracelulares também podem auxiliar esses microrganismos na competição por nutrientes em seus “habitats”. Como exemplos podemos citar as amilases, quitinases, pectinases, celulases, xilanases e proteases (PARADKAR *et al.*, 2003).

Os actinomicetos se encontram distribuídos em uma grande variedade de ambientes naturais, como rios, mares e na atmosfera, entretanto, o solo é o seu reservatório mais comum (COELHO & NASCIMENTO, 2008). Normalmente são encontrados em solos ligeiramente alcalinos ou neutros, e constituem uma das maiores comunidades presentes nesse ambiente (KENNEDDY, 1999), porém também podem estar presentes em abundância em solos ácidos, como os do cerrado brasileiro (COELHO & DROZDOWICZ, 1975).

Os actinomicetos de ambientes terrestres têm sido estudados já por muito tempo, e conseqüentemente a descoberta de novos compostos bioativos nesses ambientes tem diminuído. Com isso tornou-se necessária a exploração de outros ecossistemas, como o marinho. Assim sendo, o ambiente marinho tem se tornado a principal fonte de pesquisa visando à descoberta de novos produtos naturais e diversidade biológica (WARD & BORA, 2006). A diversidade das actinobactérias nestes ambientes ainda é pouco conhecida, porém nos últimos anos o número de trabalhos realizados vem aumentando, principalmente com actinomicetos isolados de sedimentos, água e invertebrados marinhos (ZHANG *et al.*, 2006).

Recentemente, dois novos metabólitos secundários foram isolados no ambiente marinho: “Abyssomicin C” e “Salinosporamide A”. O antibiótico “Abyssomicin C” é produzido por uma estirpe de *Verrucosispora*, isolado no mar do Japão. Já “Salinosporamide A” é um antitumoral produzido pelo actinomiceto marinho *Salinospora tropica* e se encontra em fase de testes pela empresa Nereus Pharmaceutical de São Diego, Califórnia (BALTZ, 2007).

Apesar da classe das actinobactérias compreender mais de 80 gêneros diferentes, a maioria dos metabólitos bioativos tem sido isolado de espécies do gênero mais comum de actinomiceto encontrado no solo: o gênero *Streptomyces* (MONCIARDINI *et al.*, 2002).

1.4.1. O gênero *Streptomyces*

O gênero *Streptomyces* proposto em 1943 por Waksman & Henrici foi classificado na família *Streptomycetaceae*, com base na sua morfologia e constituição da parede celular. Esse gênero é formado por bactérias aeróbias Gram-positivas pertencentes à ordem Actinomycetales, classe Actinobacteria (ANDERSON & WELLINGTON, 2001) e, por possuir um grande número de espécies, está amplamente distribuído na natureza (TADEI, RODRÍGUEZ & VILCHEZ, 2006), sendo reconhecidas mais de 500 espécies pelo *Bergey's Manual* (MADIGAN, MARTINKO & PARKER, 2004).

O gênero *Streptomyces* pertence ao grupo vinte e cinco do *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (HOLT *et al.*, 1994). Os microrganismos desse gênero caracterizam-se morfologicamente pela produção de hifas vegetativas ramificadas que geralmente não se fragmentam. O micélio aéreo na sua forma madura poderá

formar longas cadeias de esporos. Algumas espécies deste gênero também podem formar estruturas como escleródios e esporângios. A produção de pigmentos é responsável pela cor dos micélios aéreo e vegetativo (HOLT *et al.*, 1994).

Uma característica comum a esse gênero é a instabilidade genética. O genoma de diversas espécies de *Streptomyces* é linear e a região instável se encontra nas extremidades do cromossomo (VOLFF & ALTENBUCHNER, 1998). Como consequência da instabilidade genética, muitas características fenotípicas relacionadas à diferenciação e metabolismo secundário poderão ser variáveis. A formação de micélio aéreo, esporulação, pigmentação e produção de enzimas extracelulares podem ser citadas como exemplos de características variáveis (OCHI & HOSOYA, 1998).

As espécies presentes nesse gênero produzem diversos metabólitos secundários e dentre estes, os antibióticos são os mais importantes (MADIGAN, MARTINKO & PARKER, 2004). Desde a descoberta da penicilina há mais de 70 anos atrás, mais de 20.000 antibióticos já foram descritos na literatura, sendo a grande maioria sintetizada por diferentes espécies do gênero *Streptomyces* (PETKOVIC *et al.*, 2006). Como já citado anteriormente este gênero é conhecido como um grande produtor de enzimas hidrolíticas, capazes de degradar substratos orgânicos (CONNELL, 2001) inclusive as celulasas, amplamente secretadas por várias estirpes (SEMÊDO *et al.*, 2000).

1.5. Justificativa

Atualmente, a escassez das reservas de combustíveis fósseis tem gerado uma maior preocupação com o aumento da produção de combustíveis produzidos a partir de matéria-prima renovável. As fontes de energia alternativas devem ser além de renováveis, eficientes, viáveis economicamente, e seguras para o meio ambiente (CHUM & OVEREND, 2001). Resíduos urbanos, da agricultura e indústria são gerados em grandes quantidades em países desenvolvidos. Estes resíduos podem ser utilizados na produção de combustíveis como o etanol (PRASAD, SINGH & JOSHI, 2007). A utilização de celulases na hidrólise enzimática de materiais celulósicos tem se mostrado uma alternativa promissora para obtenção de altos rendimentos de açúcares fermentáveis a serem transformados neste produto (ADSUL *et al.*, 2004).

Dentro do projeto Bioetanol, cujo objetivo principal é o aproveitamento do bagaço e palha da cana de açúcar para a produção de etanol a partir dos açúcares obtidos do hidrolisado destas matérias primas, a seleção de microrganismos produtores de celulases eficientes é primordial.

Vários microrganismos celulolíticos têm a capacidade de degradar bagaço de cana de açúcar liberando açúcares para fermentação alcoólica. Neste contexto dois grandes grupos de microrganismos podem ser de interesse: os fungos, onde os do gênero *Trichoderma* se destacam, e as bactérias do grupo dos actinomicetos, destacando-se o gênero *Streptomyces*. Ambos são altamente reconhecidos por sua ampla utilização industrial para a produção de compostos bioativos úteis. Grande parte dos trabalhos na literatura voltados para o aproveitamento de resíduos agroindustriais e produção de combustíveis é realizada com gêneros fúngicos.

Entretanto, sabendo-se da capacidade celulolítica de bactérias pertencentes ao grupo dos actinomicetos, e em especial da termoestabilidade e alcalofilia das celulasas produzidas, a caracterização de suas enzimas se torna de grande importância.

O laboratório de Biotecnologia de Actinomicetos vem isolando há vários anos diversas estirpes de actinomicetos a partir de solos e ambientes brasileiros. Muitas delas já foram estudadas preliminarmente, e algumas já selecionadas como celulolíticas promissoras. Dentre elas, três estirpes se destacaram. As estirpes *Streptomyces drozdowiczii* M7A e *Streptomyces sp.* M23, isoladas de solo de floresta, apresentaram capacidade celulolítica quando crescidas em celulose microcristalina. Estas estirpes foram capazes de produzir endoglucanases e exoglucanases, com tolerância a temperaturas mais elevadas, favorecendo sua utilização em processos industriais (SEMÊDO *et al.*, 2000). *Streptomyces drozdowiczii* M7A foi identificada em nosso laboratório como sendo uma espécie nova (SEMÊDO *et al.*, 2004). Esta estirpe já foi testada para a produção de celulasas em diversos substratos de baixo custo (GRIGOREVISKI-LIMA *et al.*, 2005), se mostrando adequada, porém nunca foi examinada quanto à eficiência em produzir celulasas em bagaço de cana de açúcar. A estirpe M23 foi identificada preliminarmente, através de técnicas de biologia molecular, como pertencente ao gênero *Streptomyces* (FRANCO, 2007). Já a estirpe SCPE 09 foi isolada de solo de canavial em uma destilaria de Pernambuco e caracterizada, em estudos preliminares, como promissora quanto à atividade celulolítica (DA VINHA *et al.*, 2006). Tendo em vista o potencial celulolítico dessas três estirpes tornou-se de grande importância a realização de um estudo visando a produção de celulasas, bem como sua caracterização, para posterior aplicação na degradação de bagaço

de cana de açúcar em açúcares fermentáveis, visando uma futura produção de etanol.

Para a produção das celulases a utilização de resíduos de baixo custo como substrato é altamente pertinente. Um dos resíduos escolhidos para o presente estudo foi o bagaço de cana de açúcar, pois este se constitui num dos subprodutos agroindustriais mais abundantes. O farelo de trigo também foi testado, pois já foi citado em vários trabalhos como um substrato que apresenta condições ideais para produção de celulases (GRIGOREVSKI-LIMA, 2005; CAMASSOLA & DILLON, 2007). Além destes, o uso da milhocina, em substituição ao extrato de levedura, também é recomendável (GRIGOREVSKI-LIMA *et al.*, 2005). Trata-se de um subproduto do beneficiamento do milho, de custo relativamente baixo, quando comparada ao extrato de levedura (US\$ 80.00/ton x US\$ 1900.00/ton)(NASCIMENTO *et al.*, 2009).

1.6. Objetivos

1.6.1. Objetivo Geral

- Selecionar uma estirpe de actinomiceto eficiente na produção de celulases a partir de resíduos de baixo custo, caracterizar parcialmente as atividades celulolíticas obtidas, e testar a sua eficácia na hidrólise de bagaço de cana de açúcar para a obtenção de açúcares redutores visando à produção de bioetanol.

1.6.2. Objetivos Específicos

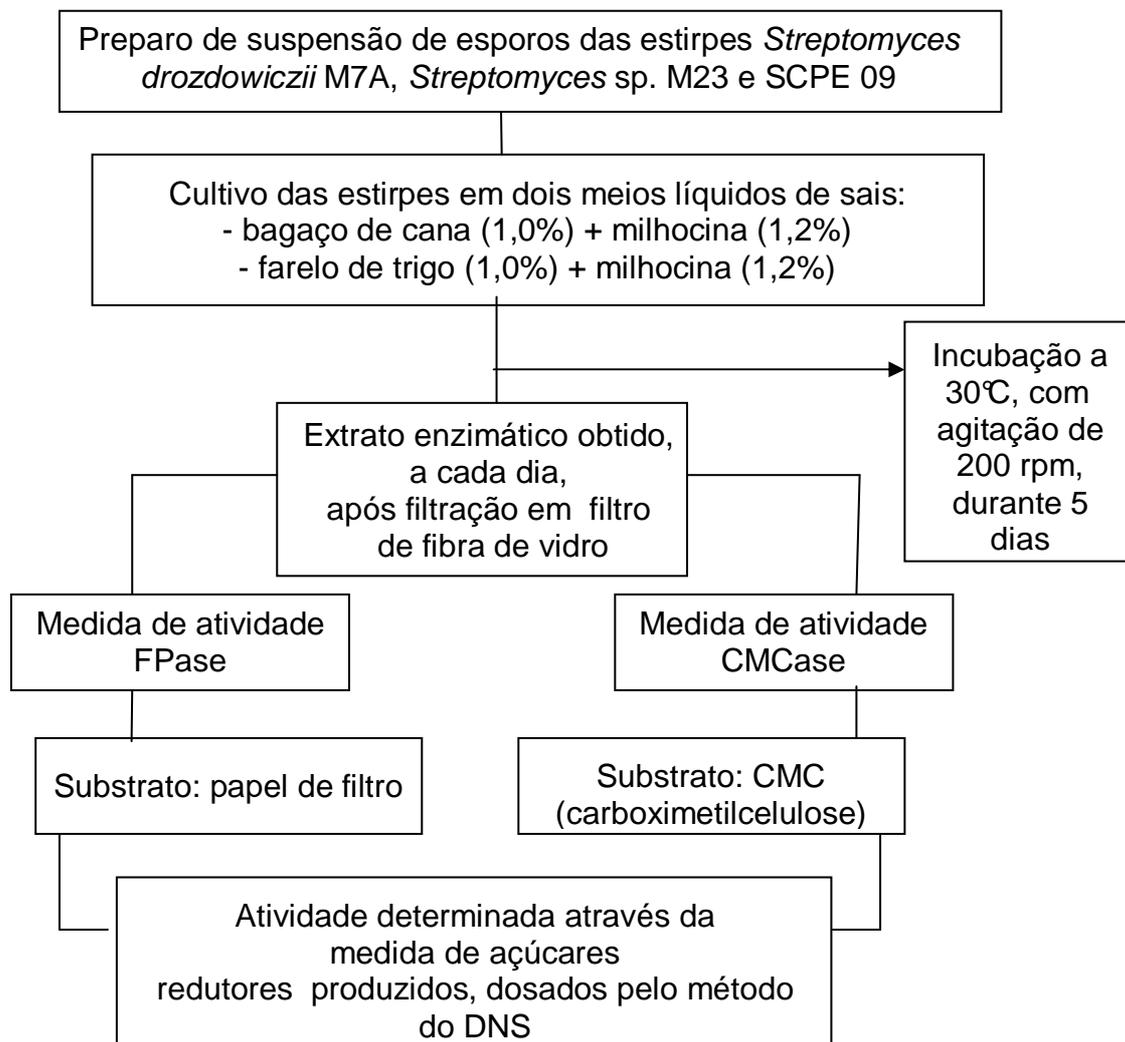
- Determinar a cinética de produção de celulases (endoglucanases e FPase) em fermentação submersa utilizando bagaço de cana de açúcar ou farelo de trigo como fonte de C, e milhocina como fonte de N, para três estirpes promissoras, e a partir dos resultados obtidos escolher uma mais eficiente.
- A partir do extrato enzimático obtido com a estirpe mais promissora, utilizando as melhores condições, determinar a atividade de β -glucosidase, bem como os ótimos de pH e temperatura e a estabilidade térmica para as atividades de endoglucanase e FPase (atividade de endoglucanases e exoglucanases sobre papel de filtro).
- Detectar, em gel de SDS-PAGE, as endoglucanases presentes no extrato enzimático obtido com a estirpe mais promissora.
- Realizar experimentos preliminares de hidrólise do bagaço de cana de açúcar utilizando os extratos enzimáticos obtidos.

2. Materiais e Métodos

2.1. Metodologia realizada com as três estirpes

No Esquema 1 estão apresentados os procedimentos realizados, com o objetivo de selecionar a estirpe mais eficiente na produção de celulases.

Esquema 1. Metodologia utilizada na escolha da estirpe mais eficiente



2.1.1. Manutenção das estirpes

As estirpes celulolíticas *Streptomyces drozdowiczii* M7A, *Streptomyces* sp. M23 e SCPE 09 foram mantidas em glicerol 20% a -20 °C na forma de suspensão de esporos (Esquema 2) baseado em Hoopwood e colaboradores (1985), a partir do crescimento das mesmas em meio de agar-extrato de malte-extrato levedura (item 2.3.1). Para todos os experimentos, foi utilizada a mesma suspensão de esporos de cada microrganismo estudado.

2.1.2 Produção de celulases em frascos Erlenmeyers com agitação

Os cultivos destinados à produção de celulases foram realizados em frascos Erlenmeyers de 125 mL (Figura 5), contendo 25 mL de meio de cultura composto de uma solução de sais (item 2.3.2) acrescida de uma fonte de carbono de baixo custo e a milhocina como fonte de nitrogênio. A solução de sais utilizada foi feita baseada no meio de Breccia e colaboradores (1995), acrescido de uma solução de elementos traços (SHIRLING & GOTTLIEB, 1966). Os resíduos agroindustriais de baixo custo utilizados como fontes de carbono foram o bagaço de cana de açúcar pré-tratado por explosão a vapor (1,0% p/v) ou farelo de trigo (1,0% p/v) (Figura 6).



Figura 5 - Frascos Erlenmeyers de 125 mL contendo meio de sais, farelo de trigo como fonte de carbono e milhocina como fonte de nitrogênio.

Após a esterilização, os meios foram inoculados com 25 μL de suspensão de esporos ($5,7 \times 10^8$ de esporos/mL para a estirpe *Streptomyces drozdowiczii* M7A, $1,5 \times 10^9$ esporos/mL para a SCPE 09 e $2,3 \times 10^8$ para *Streptomyces* sp. M23) obtidos e padronizados de acordo com o Esquema 2. As estirpes foram incubadas a 30°C , em agitação orbital de 200 rpm, durante 5 dias. A cada dia, três frascos foram retirados, os sobrenadantes filtrados em filtros de fibra de vidro (Millipore) e analisados quanto à atividade celulolítica e quanto ao pH. Os valores de pH foram determinados com auxílio de um potenciômetro, após calibração com tampões 7,0 e 10,0. Os resultados foram apresentados como uma média destas três réplicas.

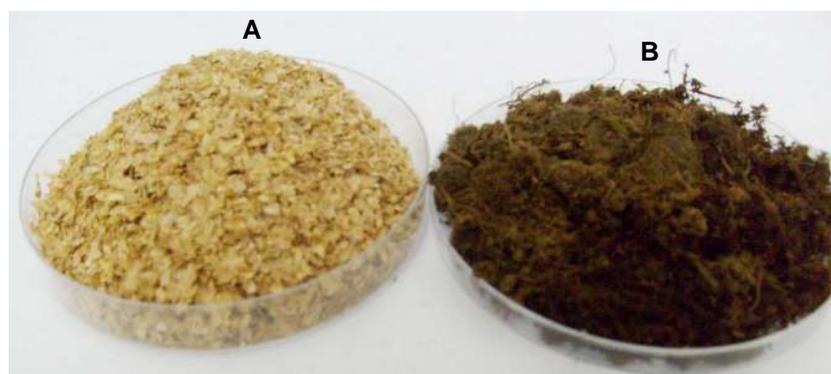
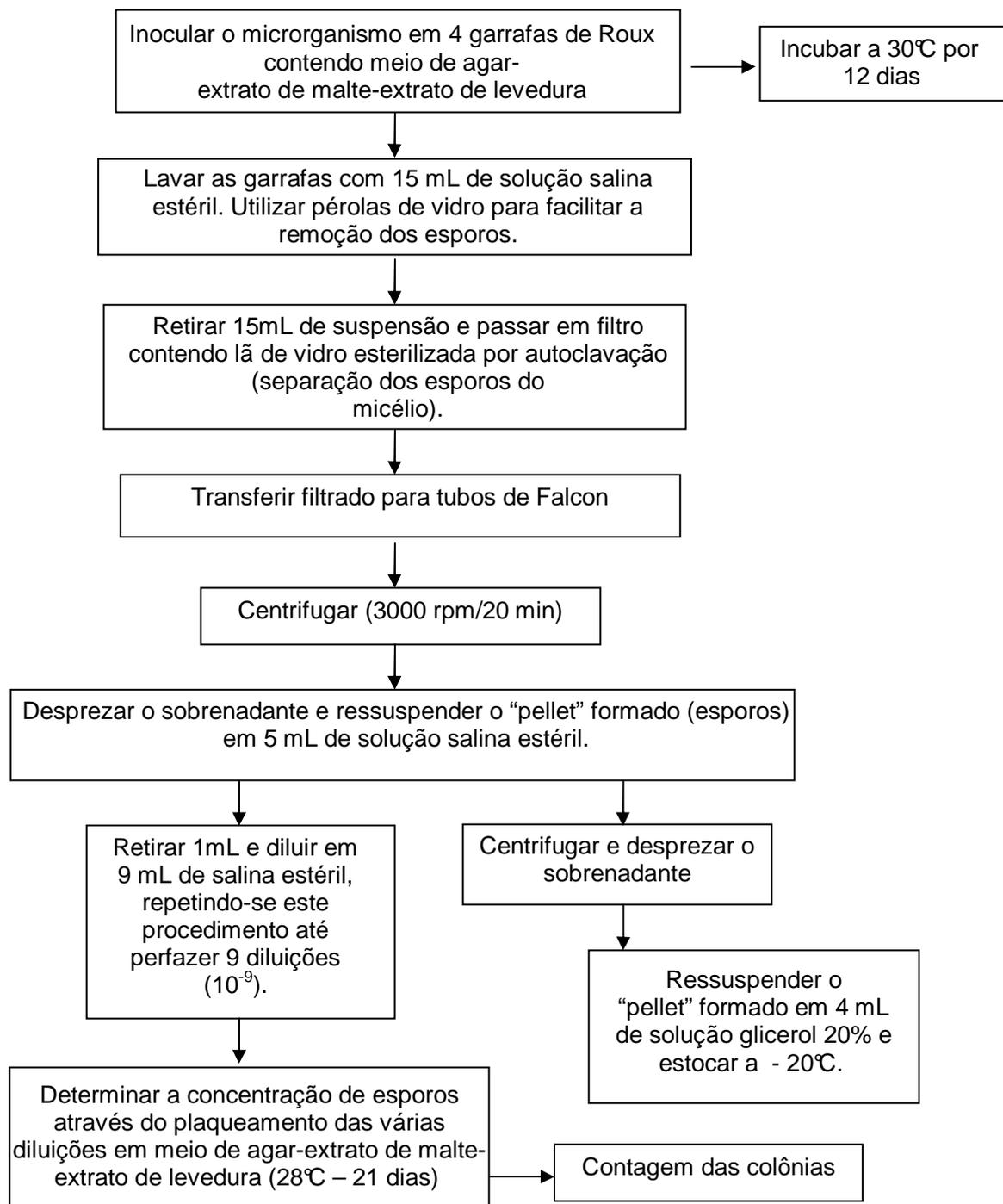


Figura 6 – Fontes de carbono utilizadas nas fermentações. A – Farelo trigo e B – Bagaço de cana de açúcar pré-tratado por explosão a vapor.

Esquema 2. Preparo e padronização da suspensão de esporos, baseado em Hopwood *et al.*, 1985.



2.1.3. Ensaio enzimáticos

Os sobrenadantes das fermentações foram utilizados para a determinação das atividades CMCase e FPase. Todos os ensaios foram realizados em triplicatas onde uma unidade de atividade enzimática (U) é definida pela liberação de 1 μmol de glicose por minuto. Os procedimentos utilizados foram realizados com base na metodologia padrão descrita pela IUPAC (GHOSE, 1987).

2.1.3.1. Determinação da atividade CMCase

A atividade CMCase corresponde à dosagem de endoglucanases. O método se baseia na dosagem de açúcares redutores produzidos pela degradação de carboximetilcelulose (CMC), utilizando-se para tal o método do ácido dinitrosalicílico (DNS) (MILLER, 1959). O sistema reacional continha 0,5 mL do extrato enzimático e 0,5 mL de CMC (4,0% p/v) diluído em tampão citrato de sódio 50mM pH 4,8 e foi incubado a 50°C durante 10 minutos. Nos tubos controle da reação, chamado tempo zero, foram adicionados 0,5 mL do extrato enzimático e 0,5 mL de tampão citrato de sódio (50mM pH 4,8). O branco da reação consistiu de um tubo contendo 0,5 mL de DNS e 0,5 mL de tampão citrato de sódio 50mM pH 4,8, utilizado para zerar o aparelho. A reação foi interrompida pela adição das amostras a um tubo contendo 0,5 mL de DNS. Os tubos foram submetidos a água fervente por 5 minutos. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 540 nm, após diluição com 6,5 mL de água destilada.

2.1.3.2. Determinação da atividade FPase

A atividade FPase, ou seja, atividade de papel de filtro, compreende uma mistura de exoglucanases e endoglucanases e foi determinada através da dosagem, pelo método do DNS, dos açúcares redutores liberados durante a degradação de uma tira de papel de filtro Whatman nº 1 medindo 1,0 cm x 6,0 cm (aproximadamente 50 mg). O meio reacional continha 0,5 mL do extrato enzimático, 1,0 mL de tampão citrato de sódio 50mM pH 4,8 e uma tira de papel de filtro, e foi incubado a 50°C durante 1 hora. Nos tubos controle da reação, chamado tempo zero, foram adicionados 0,5 mL do extrato enzimático e 1 mL de tampão citrato de sódio (50mM pH 4,8). Nos tubos controle do substrato foram adicionados 1,5 mL de tampão citrato de sódio 50mM pH 4,8 acrescido de uma tira de papel de filtro Whatman nº 1 medindo 1,0 cm x 6,0 cm (aproximadamente 50 mg). O branco da reação, utilizado para zerar o aparelho, continha 0,5 mL de DNS e 0,5 mL de tampão citrato de sódio 50mM pH 4,8. A reação foi interrompida pela adição de 3,0 mL de DNS ao meio reacional. Os tubos foram submetidos a água fervente por 5 minutos. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 540 nm, após diluição com 20 mL de água destilada.

2.2. Metodologia realizada com a estirpe selecionada

A estirpe selecionada foi a *Streptomyces* sp M23. Os experimentos foram realizados com os dois sobrenadantes obtidos após três dias de incubação nos dois substratos, farelo de trigo e bagaço de cana de açúcar. Os experimentos que envolviam determinação da atividade enzimática foram realizados em triplicatas, e uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida pela liberação de 1 µmol de glicose por minuto.

2.2.1. β -Glucosidase

Os ensaios enzimáticos (GHOSE, 1987), foram realizados em tubos contendo 1,0 mL do sobrenadante + 1,0 mL de solução de celobiose 15mM diluída em tampão citrato de sódio 50mM pH 4,8. A seguir, os tubos foram incubados por 30 minutos em banho-maria. Após esse período a reação enzimática foi interrompida através da fervura por 5 minutos. Nos tubos controle da reação (tempo zero) foram adicionados 1,0 mL do extrato enzimático e 1,0 mL de solução de celobiose 15 mM diluída em tampão citrato de sódio (50mM pH 4,8) e os mesmos logo em seguida submetidos a fervura. Os resultados foram obtidos a partir da leitura de glicose em Bioanalisador (YSI 2700 SELECT™ Biochemistry Analyzer) através do método da glicose oxidase.

2.2.2 Efeito da temperatura nas atividades CMCase e FPase

O estudo foi realizado sob as mesmas condições descritas nos itens 2.1.3.1 e 2.1.3.2 com as temperaturas que variaram de 30 a 100°C. A mistura reacional foi incubada em banho-maria a pH 4,8, nas respectivas temperaturas (GRIGOREVSKI-LIMA *et al.*, 2005), e após o tempo de reação a atividade foi interrompida em banho de gelo.

2.2.3. Efeito do pH nas atividades CMCase e FPase

O ensaio enzimático foi realizado de acordo com os itens 2.1.3.1 e 2.1.3.2, na temperatura ótima obtida a partir do item 2.2.2. A mistura reacional foi incubada em banho-maria, com as faixas de pH variando de 3,0 a 10,0. Nessa etapa foram utilizados os seguintes tampões: Glicina HCl 50 mM (pH 3,0), Citrato de Sódio 200 mM (pH 4,0), Citrato de Sódio 50 mM (pH 5,0 e pH 6,0), Citrato de Sódio 200 mM

(pH 7,0), Tris HCl 50 mM (pH 8,0) e Tris HCl 200 mM (pH 9,0 e pH 10,0) (GRIGOREVSKI-LIMA *et al.*, 2005) e após o tempo de reação, a atividade foi interrompida em banho de gelo.

2.2.4. Termoestabilidade das atividades CMCase e FPase

O estudo foi realizado através da incubação do extrato enzimático bruto nas temperaturas de 50 e 60° C. O extrato enzimático foi incubado por 8 horas, sendo as atividades determinadas após 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 horas. As atividades CMCase e FPase foram realizadas em pH e temperatura ótimos.

2.2.5. Zimograma através de SDS-PAGE para detecção de atividade enzimática (CMCase)

O perfil de produção das celulases foi estudado em gel de eletroforese desnaturante, em poliacrilamida-dodecilsulfato de sódio (SDS–PAGE) (10% para o gel de corrida e 3,0% para o gel de empacotamento), contendo 0,2% (p/v) de CMC. Paralelamente aos extratos brutos obtidos nos dois substratos, farelo de trigo e bagaço de cana, foram injetados marcadores de massa molecular entre 12,0 e 225,0 kDa, com o objetivo de determinar a massa molecular aparente de cada enzima detectada. A corrida foi processada a 100 V, durante 3 horas a 4°C.

Ao fim da corrida o gel foi revelado para a detecção da atividade de CMCase, através de incubação a 50° C em tampão citrato de sódio 50mM pH 6,0 durante 30 minutos. Em seguida o gel foi mergulhado em solução 0,1% (p/v) de Vermelho Congo durante 10 minutos, e o excesso de corante foi removido por lavagens

sucessivas em NaCl 1M (CÉSAR & MRSA, 1996). As bandas foram visualizadas em transiluminador.

2.2.5.1 Composição dos géis de corrida e empacotamento

Gel de corrida		Gel de empacotamento	
Bis-Acrilamida (30%)	3300 µL	Bis-Acrilamida (30%)	880 µL
Tampão Tris-HCl pH 8,8	2500 µL	Tampão Tris-HCl pH 6,8	1660 µL
Água	2540 µL	Água	4060 µL
CMC 0,2%	1400 µL	SDS 10%	66 µL
SDS 10%	100 µL	APS	33,4 µL
APS	100 µL	TEMED	6,6 µL
TEMED	10 µL		

2.2.5.2. Tampão de amostra com SDS

Soluções	mL
Tampão Tris-HCl pH 6,8 0,125M	2,5
SDS 4%	4,0
Glicerol	2,0
Azul de bromofenol 0,02%	2,0
H ₂ O destilada q.s.p	10

2.2.5.3. Tampão de corrida

Soluções	
Tris 0,025M	30,28 g
Glicina 0,192M	144,13 g
SDS 0,1%	10 g
H ₂ O q. s. p	10000mL

2.2.6. Avaliação da eficácia do extrato enzimático bruto de *Streptomyces* na degradação do bagaço de cana

A eficiência do extrato enzimático produzido por *Streptomyces* sp. M23 crescido em farelo de trigo por três dias foi testada na hidrólise de dois tipos de bagaço de cana de açúcar: um não tratado, e outro pré-tratado por explosão a vapor (Figura 7). Foram montados sistemas em frascos Erlenmeyers de 250 mL, contendo 100 mL do extrato enzimático (contendo 60 U/L de atividade FPase e 0,1 U/L de β -glucosidase) e 0,6 g do bagaço. Os sistemas foram realizados em triplicatas e os resultados apresentados correspondem à média das três determinações. A hidrólise foi feita em agitador rotatório a 200 rpm, 50°C e pH 7,5. Após 2, 4, 6, 8, 24 e 48 horas, alíquotas de 2mL foram retiradas para análise quanto ao conteúdo de açúcares redutores, utilizando-se o método do DNS (MILLER, 1959). As mesmas amostras foram utilizadas para medição da concentração de glicose (g/L), realizada em bioanalisador (YSI 2700 SELECT™ Biochemistry Analyzer). Foram utilizados sistemas contendo apenas bagaço de cana tratado ou sem tratamento, e água destilada. Para efeito de comparação, utilizamos um sobrenadante do crescimento do fungo celulolítico *Trichoderma reesei* RUT C30, com a mesma concentração de FPase e uma concentração de β -glucosidase de 0,12 U/L em sistemas montados em duplicatas.

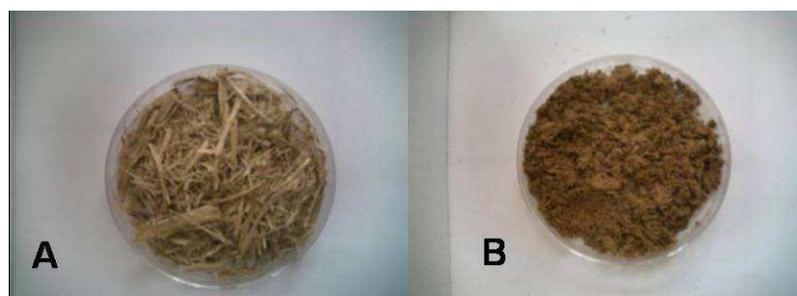


Figura 7 – Bagaço de cana de açúcar utilizado na hidrólise enzimática. A - Sem tratamento, B – Tratado por explosão a vapor.

3. Resultados

3.1. Produção de Endoglucanases

3.1.1. Meio com bagaço de cana de açúcar

O perfil cinético da produção de endoglucanases (CMCase) pelas estirpes *Streptomyces drozdowiczii* M7A, SCPE 09 e *Streptomyces* sp. M23, obtido após 5 dias de cultivo em meio líquido de sais contendo 1,0% de bagaço de cana de açúcar e 1,2% de milhocina está apresentado na Figura 8. A atividade enzimática máxima foi obtida pela estirpe *Streptomyces* sp. M23, após três dias de crescimento (327,7 U/L). As estirpes *Streptomyces drozdowiczii* M7A e *Streptomyces* sp. SCPE 09 apresentaram picos de atividade de 95,5 e 132,5 U/L respectivamente, no segundo dia de cultivo.

O pH do meio de cultivo, que originalmente era 7,0, alcançou 8,2 para a estirpe *Streptomyces drozdowiczii* M7A, 8,0 para SCPE 09 e 7,9 para *Streptomyces* sp. M23, após 5 dias de cultivo (Figura 8).

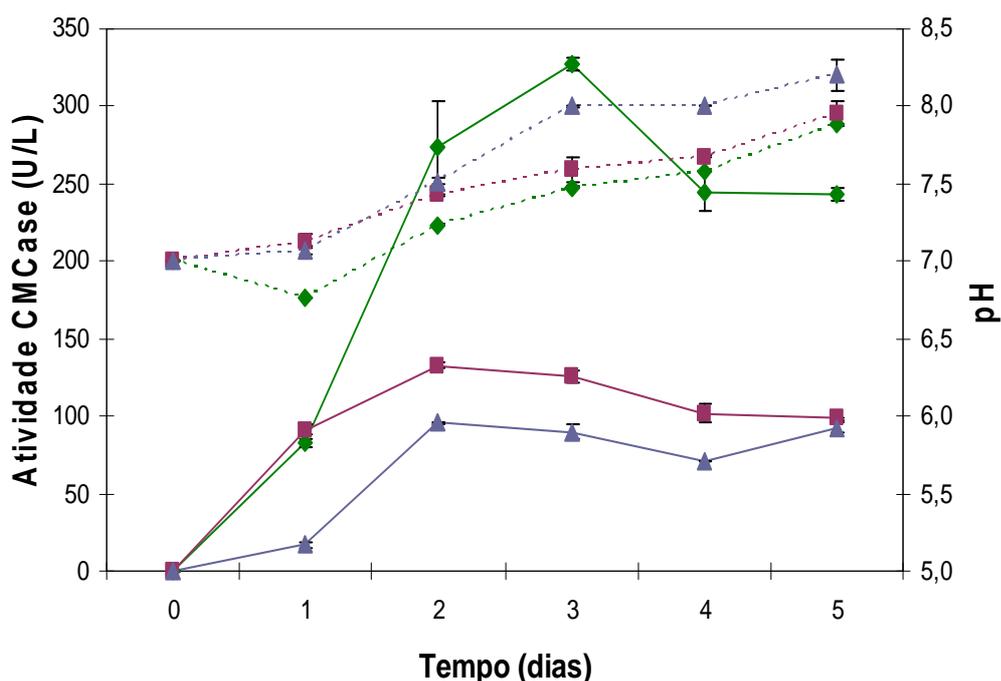


Figura 8 – Cinética da produção de endoglucanases (CMCase) por *Streptomyces drozdowiczii* M7A (▲), SCPE 09 (■) e *Streptomyces sp.* M23 (◆), em meio líquido de sais adicionado de 1,0% de Bagaço de cana de açúcar e 1,2% de milhocina. As curvas tracejadas indicam a variação no pH do meio de cultura após 5 dias de crescimento das estirpes *Streptomyces drozdowiczii* M7A (--▲--), SCPE 09 (--■--) e *Streptomyces sp.* M23 (--◆--). As barras de erros representam o desvio padrão (n = 3).

3.1.2. Meio com farelo de trigo

As três estirpes de actinomicetos também foram cultivadas em meio de sais contendo 1,0% de farelo de trigo como fonte de carbono, durante 5 dias. Neste meio a estirpe *Streptomyces sp.* M23 produziu 552,0 U/L de atividade máxima de CMCase no terceiro dia de crescimento, enquanto a SCPE 09 apresentou um máximo no segundo dia (441,0 U/L), e *Streptomyces drozdowiczii* M7A no quarto dia, chegando a 339,3 U/L (Figura 9).

Após 5 dias o pH do meio de cultivo das estirpes *Streptomyces drozdowiczii* M7A e SCPE 09, variou de 7,0 para 7,9, enquanto *Streptomyces sp.* M23

apresentou uma variação de pH ligeiramente maior que as demais, atingindo 8,1 no quinto dia de cultivo (Figura 9).

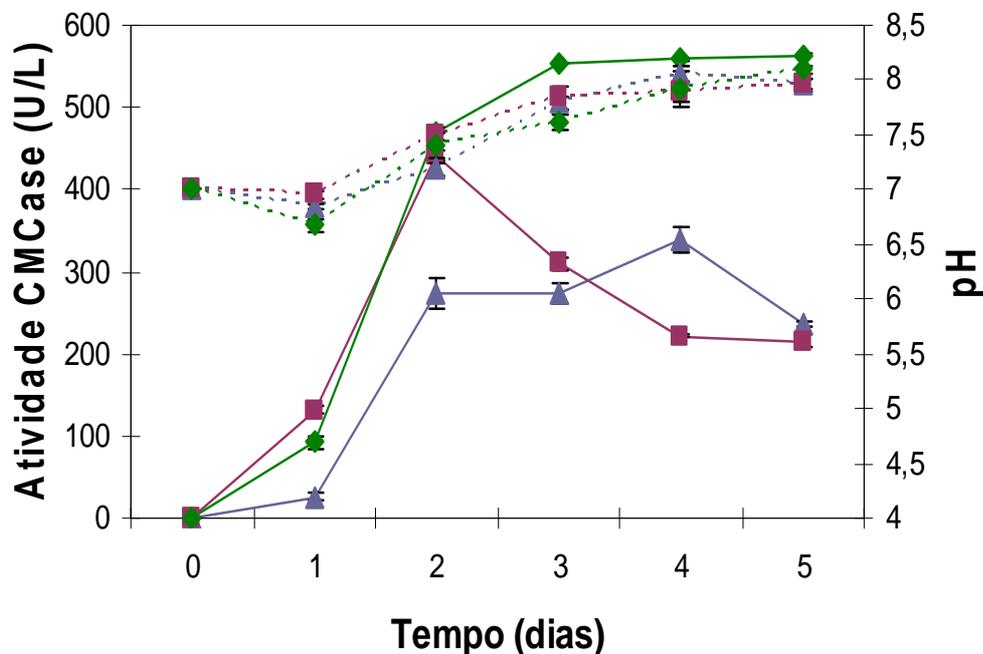


Figura 9 – Cinética da produção de endoglucanases (CMCase) por *Streptomyces drozdowiczii* M7A (▲), SCPE 09 (■) e *Streptomyces* sp. M23 (◆), em meio líquido de sais adicionado de 1,0% de farelo de trigo e 1,2% de milhocina. As curvas tracejadas indicam a variação no pH do meio de cultura após 5 dias de crescimento das estirpes *Streptomyces drozdowiczii* M7A(--▲--), SCPE 09 (--■--) e *Streptomyces* sp. M23 (--◆--). As barras de erros representam o desvio padrão (n = 3).

3.2. Produção de Celulases (FPase)

3.2.1. Meio com bagaço de cana de açúcar

Após cultivo em meio de sais acrescido de 1,0% de bagaço de cana de açúcar, *Streptomyces* sp. M23 e SCPE 09 apresentaram atividade máxima de FPase de 37,8 e 22,2 U/L, respectivamente, no terceiro dia de crescimento. *Streptomyces drozdowiczii* M7A, produziu um pico de atividade de 30,4 U/L, porém apenas no quinto dia de crescimento (Figura 10).

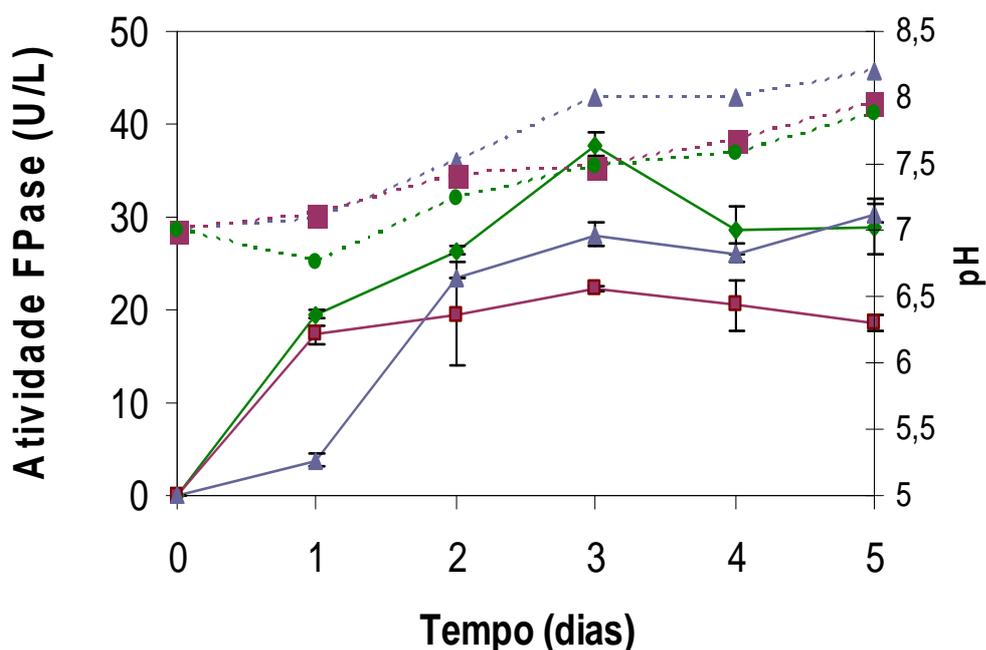


Figura 10 – Cinética da produção de celulases (FPase) por *Streptomyces drozdowiczii* M7A (▲), SCPE 09 (■) e *Streptomyces sp.* M23 (◆), em meio líquido de sais adicionado de 1,0% de bagaço de cana de açúcar e 1,2% de milhocina. As curvas tracejadas indicam a variação no pH do meio de cultura após 5 dias de crescimento das estirpes *Streptomyces drozdowiczii* M7A(--▲--), SCPE 09 (--■--) e *Streptomyces sp.* M23 (--◆--). As barras de erros representam o desvio padrão (n = 3).

3.2.2. Meio com Farelo de trigo

Em meio de sais contendo farelo de trigo como fonte de carbono, *Streptomyces sp.* M23 forneceu 61,2 U/L de atividade FPase após 3 dias de crescimento. As estirpes *Streptomyces drozdowiczii* M7A e SCPE 09 apresentaram seu pico de atividade após 5 dias de atividade, correspondendo a 41,5 e 58,2 U/L, respectivamente (Figura 11).

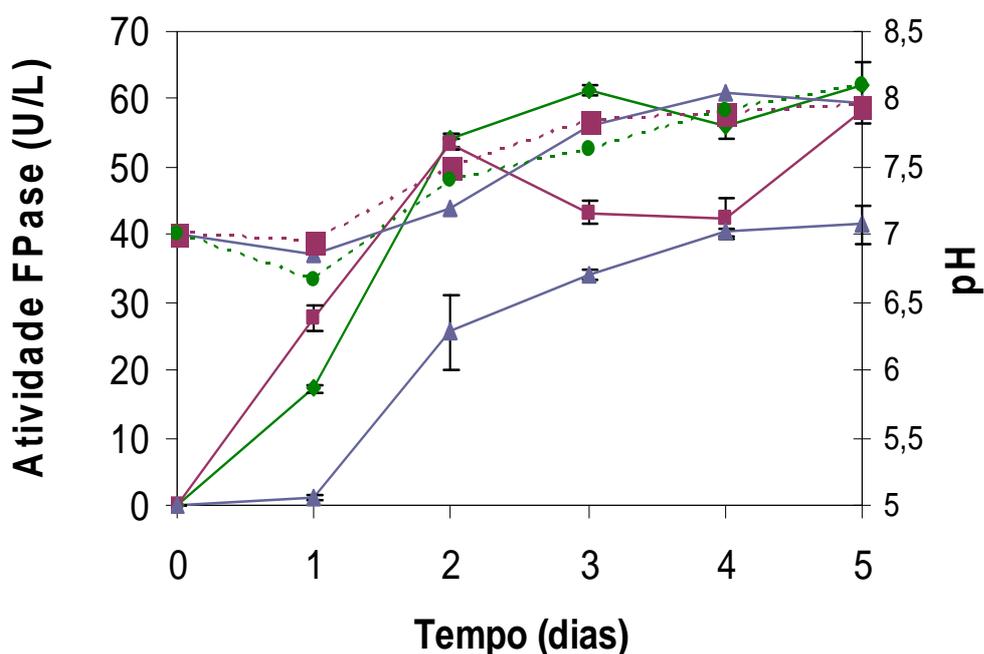


Figura 11 – Cinética da produção de celulases (FPase) por *Streptomyces drozdowiczii* M7A (▲), SCPE 09 (■) e *Streptomyces* sp. M23 (◆), em meio líquido de sais adicionado de 1,0% de farelo de trigo e 1,2% de milhocina. As curvas tracejadas indicam a variação no pH do meio de cultura após 5 dias de crescimento das estirpes *Streptomyces drozdowiczii* M7A(--▲--), SCPE 09 (--■--) e *Streptomyces* sp. M23 (--◆--). As barras de erros representam o desvio padrão (n = 3).

Nas Figuras 12 e 13 estão representados os melhores resultados para as atividades de CMCase e de FPase respectivamente, a partir dos extratos obtidos após crescimentos dos três actinomicetos nos dois substratos testados, o farelo de trigo e o bagaço de cana. De acordo com esta comparação a estirpe M23 foi selecionada. Considerando que as diferenças encontradas entre os resultados com farelo de trigo e com bagaço de cana não foram muito significativas, e considerando ainda a importância do possível emprego do bagaço de cana como substrato na produção de celulases, os extratos brutos destes dois substratos, obtidos nas melhores condições (crescimento em farelo de trigo após três dias de cultivo tanto

para CMCase como para Fpase) foram empregados para a caracterização das atividades de celulases

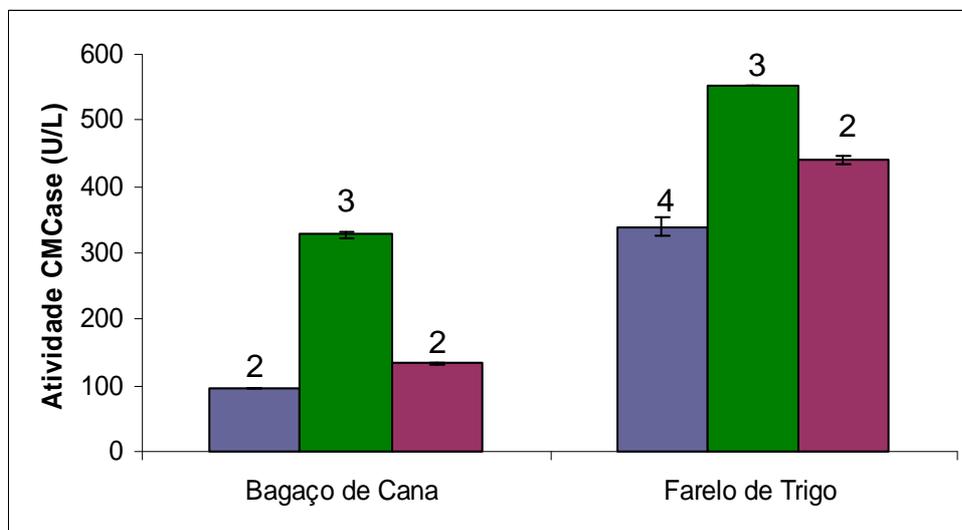


Figura 12 – Valores máximos de produção de endoglucanase (CMCase) pelas estirpes *Streptomyces drozdowiczii* M7A (■), *Streptomyces* sp. M23 (■) e SCPE 09 (■), em meio de cultivo contendo bagaço de cana de açúcar ou farelo de trigo. Os números acima de cada barra correspondem ao período da incubação em dias. As barras de erros representam o desvio padrão (n = 3).

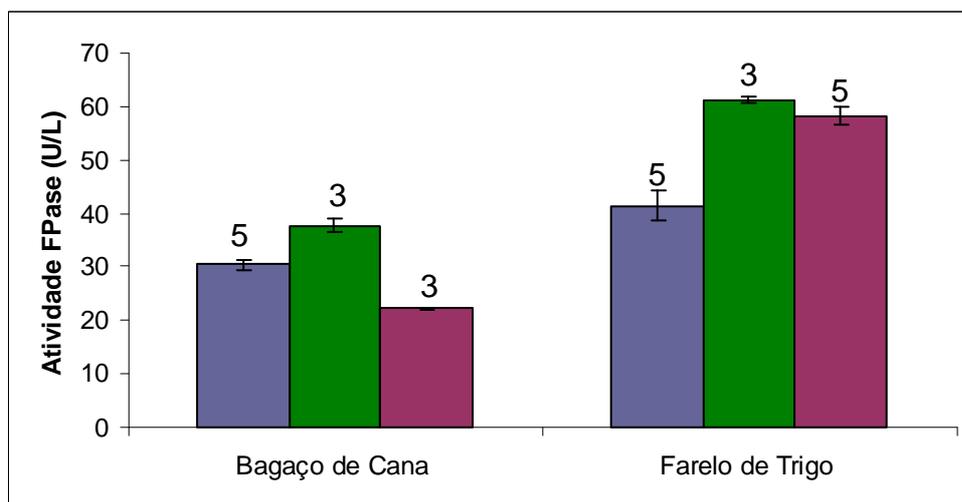


Figura 13 – Valores máximos de produção de celulases (FPase) pelas estirpes *Streptomyces drozdowiczii* M7A (■), *Streptomyces* sp. M23 (■) e SCPE 09 (■), em meio de cultivo contendo bagaço de cana de açúcar ou farelo de trigo. Os números acima de cada barra correspondem ao período da incubação em dias. As barras de erros representam o desvio padrão (n = 3).

3.3. Caracterização da atividade de celulases (CMCase e FPase)

3.3.1. Efeito da temperatura e do pH na atividade de endoglucanases (CMCase)

Os perfis de temperatura para a atividade de endoglucanases foram semelhantes, porém o sobrenadante proveniente do farelo de trigo forneceu valores um pouco maiores de atividade relativa de CMCase. A maior atividade enzimática, medida em pH 4,8, ocorreu entre 50 e 60°C, e ambos sob renadantes apresentaram atividade relativa superior a 55% quando incubados a 70° C (Figura 14). A atividade máxima para o meio contendo bagaço foi de 679,8 U/L, enquanto para o farelo de trigo foi de 708,9 U/L.

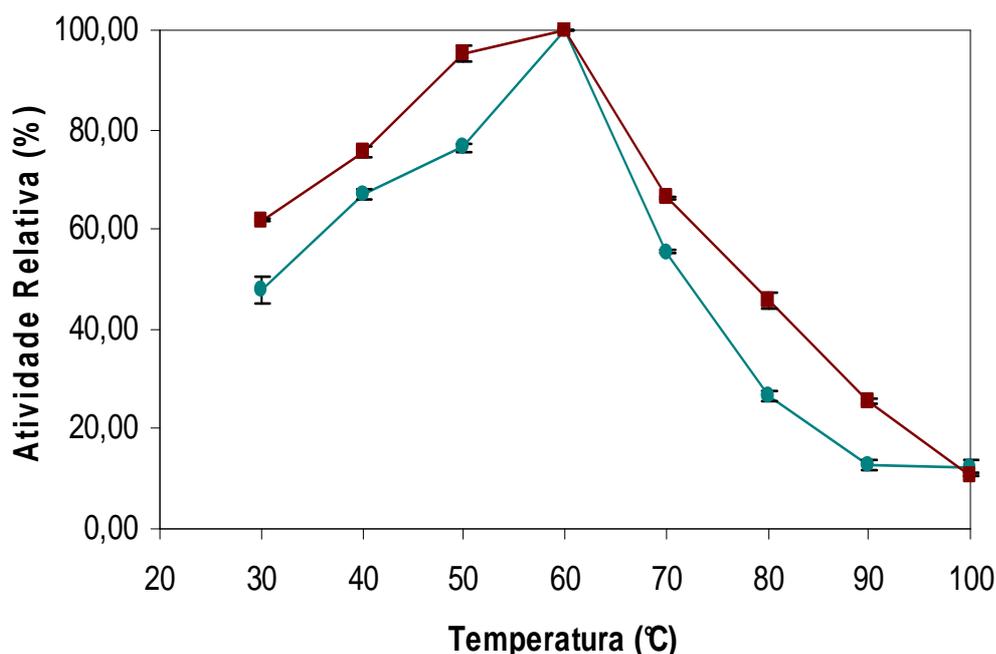


Figura 14 – Efeito da temperatura na atividade de CMCase, medida em tampão pH 4,8, dos sobrenadantes de *Streptomyces* sp. M23 obtidos a partir do cultivo dessa estirpe em bagaço de cana de açúcar (●) e farelo de trigo (■). As barras de erros representam o desvio padrão (n = 3).

Os perfis de pH obtidos para os dois sobrenadantes também foram bastante semelhantes (Figura 15). Em ambos os casos a atividade máxima foi obtida em pH 5,0 e ambos sobrenadantes testados apresentaram atividade relativa superior a 75% em pH 7,0.

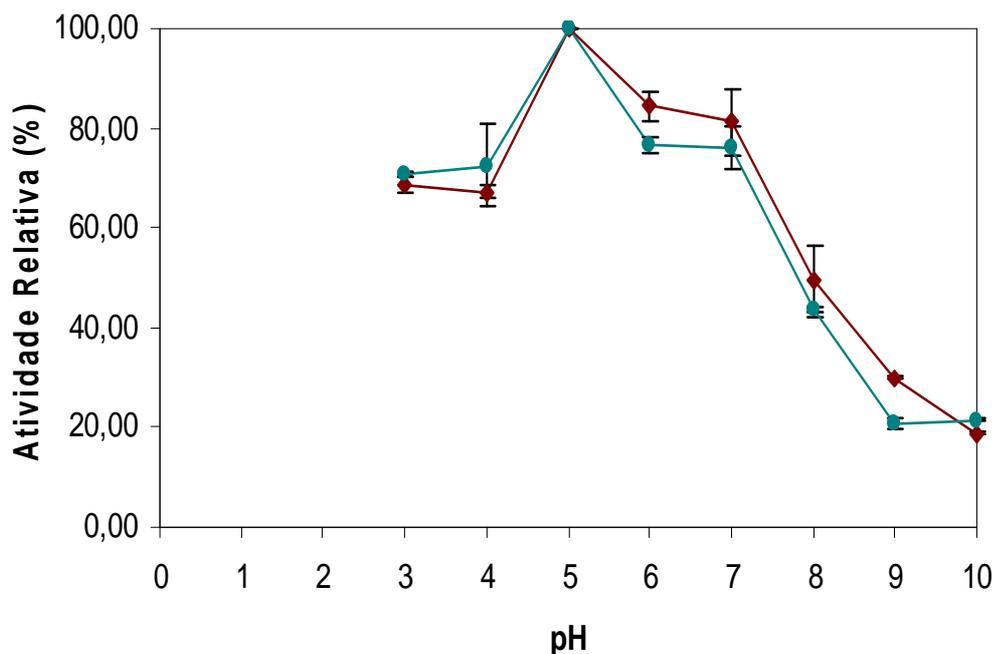


Figura 15 – Efeito do pH na atividade CMCase dos sobrenadantes de *Streptomyces* sp. M23 obtidos a partir do cultivo dessa estirpe em bagaço de cana de açúcar (●) e farelo de trigo (■). As barras de erros representam o desvio padrão (n = 3).

Quando foi feita a medida da atividade de CMCase nos dois sobrenadantes da estirpe M23, utilizando-se agora para a dosagem os valores ótimos de pH e temperatura aqui obtidos, foi possível verificar um aumento na atividade da enzima. No sobrenadante obtido a partir no cultivo em bagaço de cana a atividade de CMCase aumentou de 679,8 U/L para 814,3 U/L, enquanto que no sobrenadante do cultivo em farelo de trigo o aumento foi de 708,9 U/L para 777,1 U/L.

3.3.2. Efeito da temperatura e do pH na atividade de celulasas (FPase)

Os perfis de temperatura para a atividade de FPase, determinados utilizando pH 4,8, indicaram uma temperatura ótima de 50°C, e em ambos sobrenadantes, sendo a atividade máxima de 52,3 U/L para o bagaço de cana e 56,2 U/L para o farelo de trigo (Figura 16). Os ensaios realizados nessa temperatura, para verificação do efeito do pH na atividade enzimática, indicaram, em ambos sobrenadantes testados, que a atividade máxima ocorreu em pH 6,0. Foi observada atividade relativa superior a 75% em pH 8,0, para as enzimas produzidas em bagaço de cana (Figura 17).

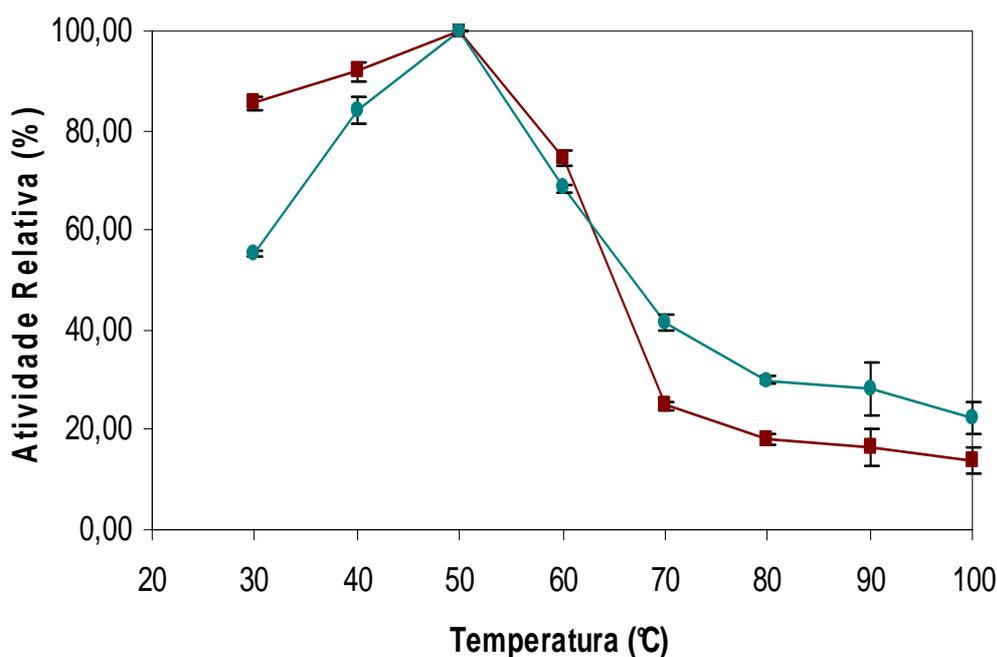


Figura 16 - Efeito da temperatura na atividade de FPase dos sobrenadantes de *Streptomyces* sp. M23, obtidos a partir do cultivo dessa estirpe em bagaço de cana de açúcar (●) e farelo de trigo (■). As barras de erros representam o desvio padrão (n = 3).

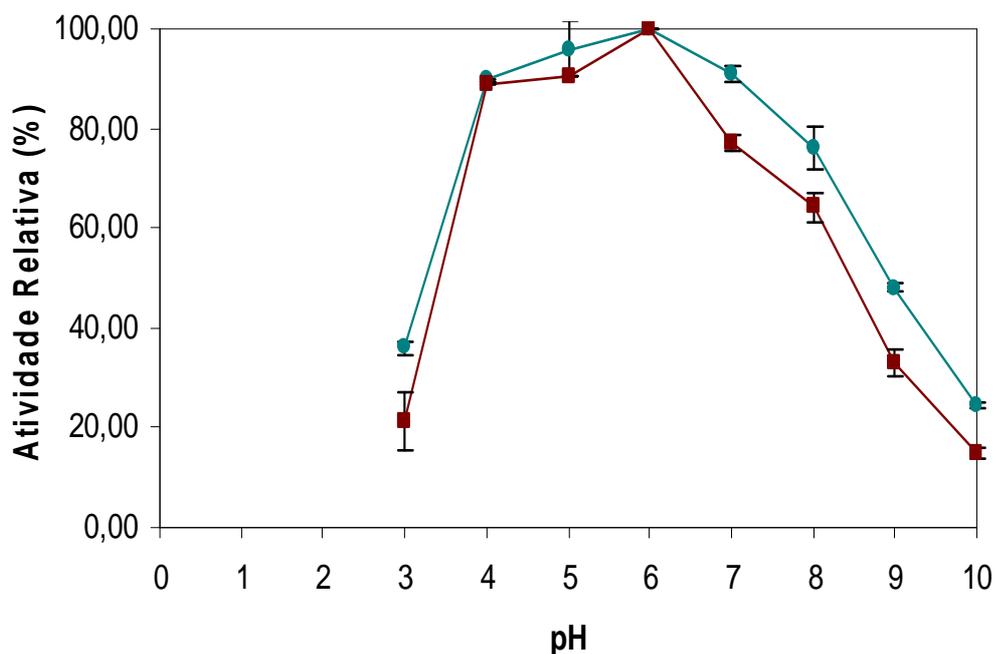


Figura 17 - Efeito do pH na atividade FPase dos sobrenadantes de *Streptomyces* sp. M23 obtidos a partir do cultivo dessa estirpe em bagaço de cana de açúcar (●) e farelo de trigo (■). As barras de erros representam o desvio padrão ($n = 3$).

Quando foi feita a medida da atividade de FPase nos dois sobrenadantes da estirpe M23 utilizando-se agora os valores ótimos de pH e temperatura aqui obtidos, foi possível observar um pequeno aumento na atividade FPase no sobrenadante obtido a partir do farelo de trigo, de 56,2 U/L para 58,6 U/L. Já no sobrenadante obtido a partir do cultivo em bagaço de cana, houve um decréscimo na atividade enzimática, passando de 52,3 U/L para 35,0 U/L, possivelmente porque foram utilizados sobrenadantes obtidos em épocas diferentes.

3.4. Termoestabilidade

O estudo da termoestabilidade das atividades de CMCase e FPase foi realizado nos sobrenadantes do terceiro dia de crescimento de *Streptomyces* sp. M23 em ambos os meios estudados, meio de sais contendo milhocina 1,2% como fonte de nitrogênio e bagaço de cana de açúcar ou farelo de trigo 1,0% como fonte de carbono. Foram testadas duas temperaturas, 50° C e 60° C.

3.4.1. Atividade de endoglucanases (CMCase)

Quando a termoestabilidade foi determinada a 60° C a atividade de CMCase, para ambos os sobrenadantes, decresceu rapidamente com o passar do tempo, ficando em torno de 40% após 30 min, e 10% após uma hora. Após 3 horas de incubação o sobrenadante obtido a partir do bagaço de cana já estava completamente inativado, enquanto que aquele proveniente do farelo de trigo manteve a atividade no mesmo patamar de 10% dos 60 minutos iniciais (Figura 18).

Já a termoestabilidade testada a 50° C foi bem maior. O sobrenadante obtido a partir do cultivo em bagaço de cana manteve valores de atividade endoglucanásica em torno de 90% da inicial após 5 horas, e após 8 horas, a atividade ainda era 85% da atividade inicial. O sobrenadante obtido a partir do farelo de trigo foi ainda mais estável, mantendo sua atividade endoglucanásica em torno de 90% mesmo após 6 horas de incubação (Figura 18).

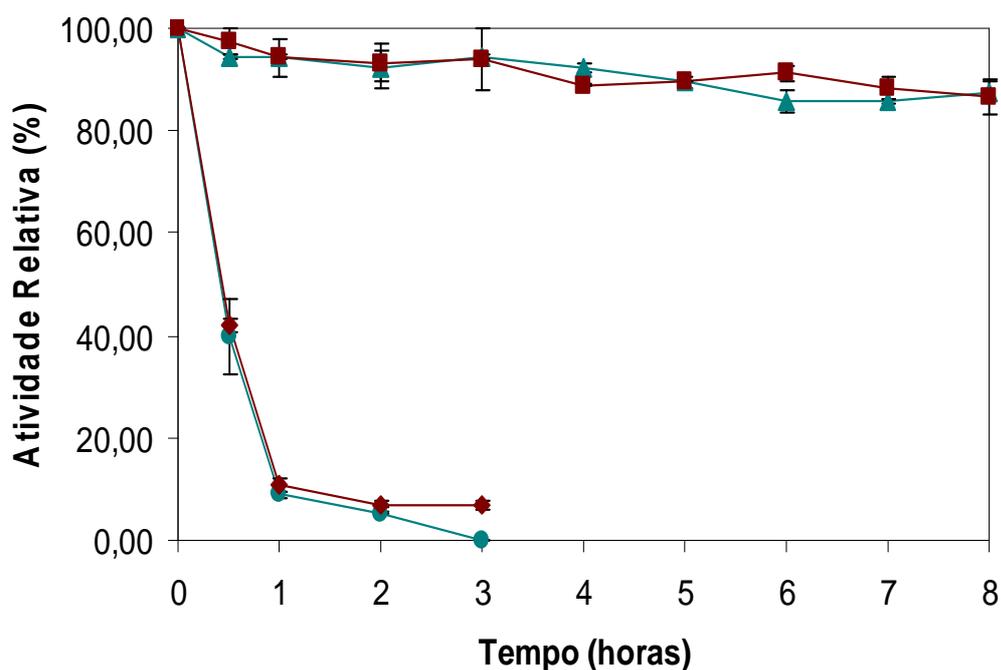


Figura 18 - Estudo da termoestabilidade na atividade de endoglucanases dos sobrenadantes de *Streptomyces* sp. M23 obtidos a partir do cultivo dessa estirpe em bagaço de cana de açúcar incubado a 50°C (▲) e 60°C (●) e farelo de trigo incubado a 50°C (■) e 60°C (◆). As barras de erros representam o desvio padrão (n = 3).

3.4.2. Atividade de celulases (FPase)

A termoestabilidade de endoglucanases e exoglucanases medidas pela degradação do papel de filtro (atividade FPase), está representada na Figura 19. Neste caso, a 60°C, após 30 minutos de incubação, a atividade de FPase caiu para 50% da inicial no sobrenadante do bagaço de cana, e 33% no sobrenadante do farelo de trigo. No entanto, após 5 horas, as enzimas presentes no sobrenadante do bagaço de cana perderam completamente a sua atividade, enquanto no sobrenadante do farelo, se mantiveram a 15% da atividade inicial mesmo após 7 horas de incubação.

Quando o sobrenadante obtido a partir do cultivo em bagaço de cana foi incubado a 50°C manteve cerca de 86% de sua atividade inicial por até duas horas. Após 5 horas de incubação a atividade se manteve em torno de 71% e ao fim de 8 horas era 54% de sua atividade inicial. A termoestabilidade do sobrenadante obtido a partir do cultivo em farelo de trigo foi um pouco maior, manteve mais de 84% de sua atividade até 5 horas de incubação e ao fim de 7 horas sua atividade relativa foi de 75%.

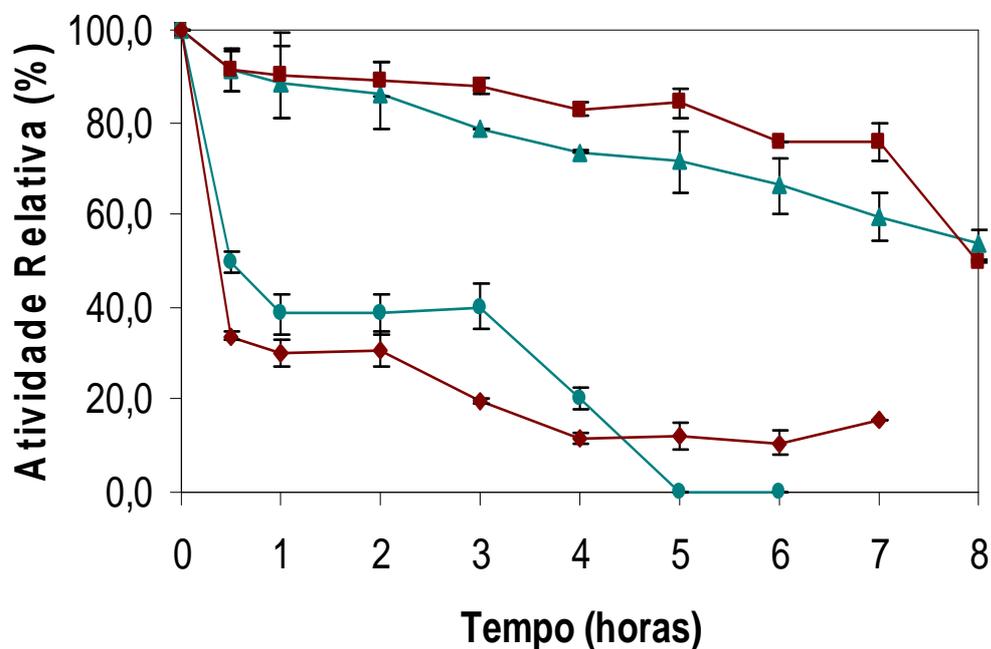


Figura 19 - Estudo da termoestabilidade na atividade de FPase dos sobrenadantes de *Streptomyces* sp. M23 obtidos a partir do cultivo dessa estirpe em bagaço de cana de açúcar incubado a 50°C (▲) e 60°C (●) e farelo de trigo incubado a 50°C (■) e 60°C (◆). As barras de erros representam o desvio padrão (n = 3).

3.5. Zimograma através de SDS-PAGE da atividade enzimática de endoglucanases (CMCase) presentes nos extratos

O perfil eletroforético dos extratos enzimáticos obtidos através do cultivo de *Streptomyces* sp. M23 por 3 dias em 1,0% de bagaço de cana ou farelo de trigo pode ser observado no zimograma da Figura 20. Foram detectadas duas bandas em cada extrato enzimático testado. A banda de maior massa molecular aparente foi detectada apenas no sobrenadante do bagaço de cana (100 kDa), enquanto a banda de 70 kDa só apareceu no sobrenadante do farelo de trigo. Ambos os extratos enzimáticos apresentaram uma banda com massa molecular aparente de 42 kDa.

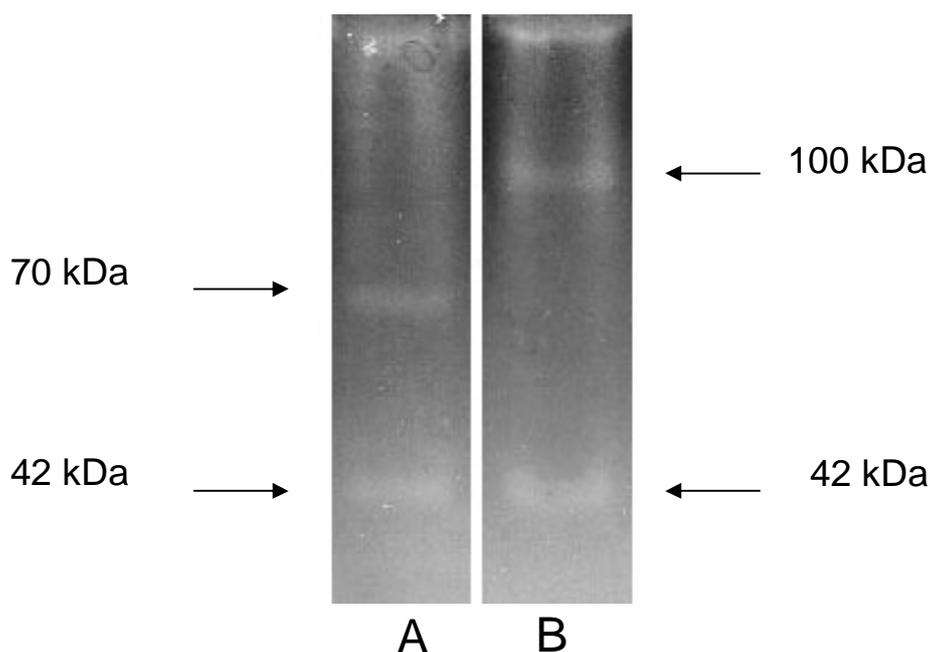


Figura 20 – Perfil eletroforético de endoglucanases do extrato bruto de *Streptomyces* sp. M23 cultivado por três dias em: A – 1,0% de farelo de trigo e 1,2% de milhocina e B – 1,0% bagaço de cana e 1,2% de milhocina. Os valores das massas moleculares aparentes de proteínas padrão estão indicados ao lado das setas.

3.6. Determinação da atividade de β -glucosidase

Os extratos enzimáticos de *Streptomyces* sp. M23 obtidos do cultivo em bagaço de cana de açúcar e farelo de trigo não apresentaram produção significativa de β -glucosidases. A atividade enzimática encontrada foi de 0,1 U/L e 0,04 U/L, respectivamente.

3.7. Quantificação de açúcares redutores e glicose liberados pela hidrólise enzimática do bagaço de cana

A medida de açúcares redutores e a produção de glicose resultantes da hidrólise se encontram nas Figuras 21 e 22, respectivamente. A maior produção de açúcares redutores nos sistemas contendo o sobrenadante obtido do crescimento de *Streptomyces* sp M23 ocorreu após 24 horas – 0,1 mg/mL quando foi utilizado o bagaço pré-tratado por explosão a vapor, porém já após duas horas de incubação a produção era de cerca de 93% deste valor. Os resultados obtidos com o bagaço sem tratamento foram inferiores, 0,07 mg/mL após 8 horas de hidrólise. O fungo *Trichoderma reesei* RUTC30 também apresentou melhor desempenho na hidrólise do bagaço pré-tratado, atingindo pico de produção de açúcares redutores de 0,7 mg/mL após 48 horas de hidrólise. Quando o bagaço sem tratamento foi utilizado, *T. reesei* RUT C30 produziu apenas 0,1 mg/mL após 24 horas de experimento.

Quanto a produção de glicose esta também foi maior nos sistemas contendo o sobrenadante do fungo *Trichoderma reesei* RUT C30, no bagaço de cana pré-tratado, onde o valor máximo (0,2 g/L) foi obtido após 48 horas de hidrólise. O bagaço de cana pré-tratado também foi o melhor substrato para *Streptomyces* sp. M23, entretanto a produção máxima de glicose (0,02 g/L) foi muito baixa, e ocorreu com apenas 2 horas de hidrólise.

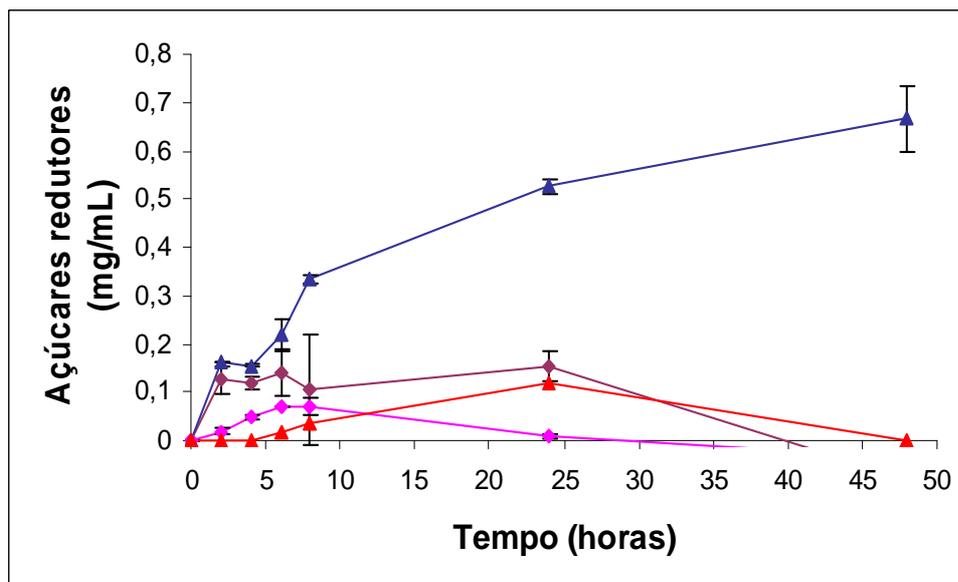


Figura 21 – Açúcares redutores produzidos a partir da degradação de bagaço de cana pré-tratado por celulases de *Trichoderma reesei* RUT C30 (▲) e *Streptomyces* sp. M23 (▼) e bagaço de cana sem tratamento por celulases de *Trichoderma reesei* RUT C30 (▲) e *Streptomyces* sp. M23 (▼). As barras de erros representam o desvio padrão (n = 3).

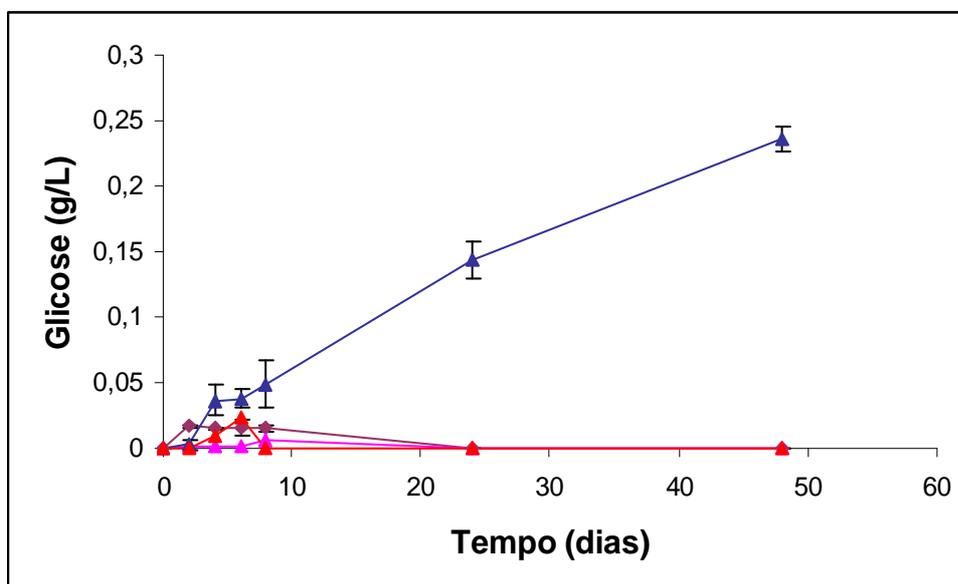


Figura 22 – Produção de glicose a partir da degradação de bagaço de cana pré-tratado por celulases de *Trichoderma reesei* RUT C30 (▲) e *Streptomyces* sp. M23 (▼) e bagaço de cana sem tratamento por celulases de *Trichoderma reesei* RUT C30 (▲) e *Streptomyces* sp. M23 (▼). As barras de erros representam o desvio padrão (n = 3).

4. Discussão

Questões econômicas, geopolíticas e ambientais têm motivado, nos últimos anos, uma preocupação mundial com a descoberta de fontes alternativas de energia, como por exemplo, o etanol. O aumento do consumo deste combustível nos próximos anos, em especial nos países desenvolvidos, estimula a pesquisa pelo desenvolvimento de novas tecnologias para a sua produção a partir de matéria prima lignocelulósica proveniente de resíduos (BASTOS, 2007). Neste caso a seleção de estirpes celulolíticas e a caracterização de suas enzimas possui grande importância biotecnológica.

No presente trabalho três estirpes de actinomicetos celulolíticas, isoladas de ambientes brasileiros, foram estudadas, tendo por objetivo selecionar a mais eficiente na produção de celulasas. As estirpes foram cultivadas em meio contendo bagaço de cana de açúcar ou farelo de trigo como fonte de carbono, e milhocina como fonte de nitrogênio. As três estirpes estudadas foram capazes de produzir celulasas em meio líquido contendo sais utilizando ambas fontes de carbono. Além de ser amplamente sabido que a biossíntese de celulasas é induzida durante o crescimento do microrganismo em celulose, ou derivados de celulose (JANG & CHEN, 2003), a utilização destes resíduos agro-industriais ricos em lignocelulose visou principalmente uma redução dos custos de produção enzimática, para que a sua utilização em escala industrial se tornasse viável.

De um modo geral todas três foram favoráveis, tanto na produção de CMCase como na produção de FPase, crescidas em milhocina e farelo de trigo ou no bagaço de cana de açúcar, apresentando produção de CMCase que variou de 95,5 U/L a 552,0 U/L para CMCase, em tempos que variaram de 2 a 4 dias, e de

22,2 a 61,2 U/L para FPases, em 3 a 5 dias. No entanto, a estirpe M23 se destacou. Nas condições utilizadas nos experimentos, a utilização de farelo de trigo também foi mais favorável que o bagaço.

Streptomyces sp. M23 apresentou um pico de atividade de CMCase de 552,0 U/L, quando cultivada em farelo de trigo, e de 327,7 U/L, quando cultivada em bagaço de cana de açúcar. Com estes resultados foi possível verificar que os substratos de baixo custo testados 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 (SEMÊDO *et al.*, 2000), contendo celulose microcristalina (Sigma), extrato de levedura e proteose peptona. Neste caso o pico de atividade de CMCase foi de apenas 95,0 U/L (SEMÊDO *et al.*, 2000).

A estirpe *Streptomyces drozdowiczii* M7A também apresentou resultados favoráveis quando crescida em farelo de trigo, onde foi capaz de produzir 339,3 U/L de atividade de CMCase. Esta estirpe já havia sido utilizada em trabalhos anteriores visando a produção de celulasas. Semêdo e colaboradores (2000) a cultivaram em meio contendo celulose microcristalina (Sigma) extrato de levedura e proteose peptona e nessas condições a atividade máxima de CMCase foi de 235,0 U/L. Grigorevski-Lima e colaboradores (2005) também já haviam cultivado essa estirpe anteriormente. Quando crescida em um meio mais rico, contendo 0,3% de extrato de levedura e 1,0% de CMC, foram obtidos os melhores resultados, de 595,0 U/L, porém em meio contendo 1,0% de farelo de trigo e 0,3% de milhocina a mesma apresentou pico de atividade de CMCase de 221,0 U/L, (GRIGOREVSKI-LIMA *et al.*, 2005). Os resultados aqui mostrados indicam que a concentração de milhocina utilizada no presente trabalho (1,2%) favoreceu uma maior produção enzimática quando comparado aos resultados de Grigorevski-Lima e colaboradores (2005). A

cinética de produção de CMCases ainda não havia sido testada com a estirpe de actinomiceto SCPE 09, isolada recentemente de um solo de canavial (DA VINHA *et al.*, 2006). A mesma também apresentou bons resultados na produção de celulases, sendo também mais eficiente em farelo de trigo, onde chegou a produzir 441,0 U/L no segundo dia de fermentação.

Em recente trabalho Nascimento e colaboradores (2009) utilizaram resíduos agroindustriais na produção de endoglucanases pela estirpe *Streptomyces malaysiensis* AMT-3. O farelo de trigo e o dreche cervejeiro (BSG) 0,5% foram testados, em combinação com a milhocina ou extrato de levedura (0,1 ou 1,2%). O dreche cervejeiro com milhocina (1,2%) deram a melhor combinação, fornecendo até 720,0 U/L, mas a combinação farelo de trigo e milhocina também foi favorável, produzindo 420,0 U/L. No presente trabalho, *Streptomyces* sp. M23 e SCPE 09 apresentaram maior produção utilizando uma concentração maior desses dois substratos (1,0% de farelo de trigo e 1,2% de milhocina), Com isso, foi possível observar que o aumento na concentração dos substratos, favoreceu uma maior produção de endoglucanases.

Vários outros trabalhos são citados na literatura, mostrando a produção de endoglucanases por actinomicetos, em especial *Streptomyces*, em diferentes substratos. Uma estirpe de *Streptomyces*, a T3-1, produziu 40,3 U/mL em 1,5% de CMC e sulfato de amônio, uréia e peptona (JANG & CHEN, 2003), porém a estirpe era transformante, e os nutrientes utilizados não eram substratos de baixo custo. *Streptomyces* sp. isolada de solo do Canadá 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 de CMCCase (ALANI, ANDERSON & MOO-YOUNG, 2008) enquanto *Thermomonospora* sp., um actinomiceto alcalotermofílico (GEORGE, AHMAD &

RAO, 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, enquanto que quando cultivada em farelo de trigo a atividade foi de 8,5U/mL. Pode-se observar que valores bem mais altos do que os encontrados por nós tem sido conseguido com outras estirpes, utilizando outros substratos, porém em geral são substratos caros, ou mesmo substratos mais baratos porém associados com outros mais caros. Vale ressaltar que no nosso caso foram utilizados apenas resíduos de baixo custo, milhocina, farelo de trigo e bagaço de cana, e portanto a tentativa de se obter uma produção apreciável de endoglucanases por actinomicetos crescidos em resíduos de baixo custo deve ser uma meta prioritária. A milhocina, em especial, é um dos principais sub-produtos da indústria de beneficiamento do milho (PAREKH, FORMANEK & BLASCHEK, 1999), capaz de substituir o extrato de levedura como fonte rica de nutrientes tais como N orgânico e vitaminas. Este resíduo tem sido utilizado na produção de diversas enzimas (DE AZEREDO *et al.*, 2006; CHEN, XIA & XUE, 2007), inclusive celulasas (GRIGOREVSKI-LIMA *et al.*, 2005; NASCIMENTO *et al.*, 2009).

Considerando a atual conjuntura nacional, onde o aumento na produção de etanol sem prejuízo de novas áreas de plantio de cana tem sido almejada, o aproveitamento do bagaço de cana residual para produção de celulasas visando a produção de etanol de segunda geração é de grande interesse. A produção de endoglucanases em bagaço de cana de açúcar não foi encontrada na literatura para actinomicetos. Foi descrita a produção de endoglucanases em folhas de cana de açúcar, mas não em bagaço, e os autores trabalharam com um consórcio de microrganismos, incluindo bactérias e actinomicetos (GUEVARA & ZAMBRANO, 2006). Já com os fungos, que são considerados os principais produtores de

celulases, vários trabalhos são descritos. Aguiar & Menezes (2000) avaliaram a produção de celulases pela estirpe *Aspergillus niger* IZ9, crescida em meio de cultura de Mandels & Weber (1969), acrescido de 1,0% de bagaço de cana (quimicamente tratado) proteose peptona e Tween 80. Nestas condições foi obtido um pico de atividade de endoglucanases de 0,25 U/mL, após sete dias de cultivo. Neste caso, apesar de ter sido utilizado o bagaço de cana como principal fonte de C, o meio de cultura foi enriquecido com outros ingredientes que poderiam inviabilizar o processo em termos biotecnológicos. Ainda assim, os resultados obtidos foram inferiores aqueles obtidos para a estirpe M23. *Aspergillus fumigatus*, produtor de endoglucanases termofílicas e acidofílicas também foi cultivado em 1,0% de bagaço de cana e 1,2% de milhocina. Os melhores resultados foram obtidos no sexto dia de cultivo, com atividade de 365,0 U/L (GRIGOREVSKI-LIMA *et al.*, 2009).

Todos estes resultados promissores indicam que os trabalhos visando à procura de novas estirpes produtoras de celulase utilizando o bagaço de cana de açúcar como principal fonte de C, e ainda a milhocina como fonte de N devem ser intensificados. Isto porque a principal preocupação continua sendo os custos de produção, e assim sendo, os estudos visando este barateamento se fazem necessários. Apesar de menos estudados, os actinomicetos parecem ser bastante promissores, pois podem não apresentar produção tão elevada quanto os fungos, mas por outro lado, podem apresentar ótimos de atividade e uma maior estabilidade em valores extremos de pH e temperatura.

A atividade de FPase também se constitui um fator importante na avaliação de uma estirpe para atividade de celulase de um modo geral. Neste caso a celulase vai apresentar uma atividade de endo e outra de exo celulase, e portanto é capaz de atuar tanto nas regiões cristalinas como nas regiões amorfas da celulose. É bem

sabido que a maioria dos microrganismos celulolíticos apresentam atividade de endoglucanase (BHAT & BHAT, 1997), mas nem sempre apresentam de exo, e portanto, a atividade de FPase é um diferencial. As três estirpes testadas neste trabalho foram capazes de produzir FPase em meio de sais contendo bagaço de cana de açúcar ou farelo de trigo como fonte de carbono. Nas condições do presente trabalho a estirpe *Streptomyces* sp. M23 foi a mais eficiente, fornecendo atividade de 61,2 U/L em meio contendo farelo de trigo, e de 37,8 U/L quando cultivada em meio contendo bagaço de cana. Esta mesma estirpe foi estudada por Semêdo e colaboradores (2000) quanto à produção de FPase em meio contendo celulose microcristalina (Sigma), extrato de levedura e proteose peptona e nessas condições, obteve-se o pico máximo de atividade de 2 U/L. Conforme pode-se notar, houve um grande aumento na produção de FPase desta estirpe, em comparação ao trabalho anterior. Já *Streptomyces drozdowiczii* M7A apresentou atividade de FPase máxima de 30,4 U/L e 41,5 U/L, respectivamente, quando cultivada em bagaço de cana e farelo de trigo. Semêdo e colaboradores (2000) cultivaram essa estirpe em meio contendo celulose microcristalina (Sigma), extrato de levedura e proteose peptona e obtiveram uma atividade máxima de 3,9 U/L. Em outro trabalho, esta estirpe foi crescida em meio contendo 0,3% de extrato de levedura e 1,0% de CMC, atingindo pico máximo de atividade de 25 U/L no terceiro dia de cultivo (GRIGOREVSKI-LIMA *et al.*, 2005). Os meios de cultivo utilizados no presente estudo, além de ter um custo menor, favoreceram uma maior produção em comparação aos trabalhos anteriores com esta mesma estirpe. Além daqueles acima descritos, apenas um trabalho foi encontrado na literatura para a produção de FPase por actinomicetos. Uma estirpe de *Streptomyces* sp. quando cultivada em 1,0

% de celulose cristalina apresentou pico de atividade FPase de 4,3 U/mL obtidos em após 5 dias de crescimento (ALANI, ANDERSON & MOO-YOUNG, 2008).

Por outro lado, muitos trabalhos envolvendo a produção de FPase por fungos se encontram disponíveis. Jorgensen & Olsson (2006) obtiveram para *Penicillium brasilianum* IBT 20888, quando cultivado em biorreator em meio contendo extrato de levedura e madeira de um tipo de pinheiro submetido a explosão a vapor, valores de 0,59 U/mL de FPase. *Trichoderma viride* NCIM 1051 em 1,0% de bagaço de cana tratado com NaOH resultou em uma atividade FPásica de 0,4 U/mL (ADSUL *et al.*, 2004). *Aspergillus niger* IZ9 em meio contendo bagaço de cana de açúcar tratado com hidróxido de sódio (NaOH) apresentou pico de atividade de 0,2 U/mL (AGUIAR & MENEZES, 2000). Em todos os casos acima descritos os tempos de incubação variaram de 7 a 10 dias, bem maiores que aqueles utilizados em nosso trabalho.

É importante ressaltar que é difícil estabelecer uma comparação entre os resultados obtidos, tendo em vista as diferenças nas condições de cultivo e produção, os substratos testados, quantidade de inóculo utilizado e as condições dos ensaios enzimáticos. Numa avaliação geral pode-se observar que várias estirpes, principalmente de fungos, são eficientes na produção de FPase, com valores maiores que aqueles aqui obtidos. Porém, em alguns casos os substratos são mais caros, e em outros o tempo de incubação foi maior. Pode-se supor que se, no nosso caso, a cinética tivesse sido realizado por um período de tempo mais longo, por exemplo, até 10 dias, a produção de Fpase poderia ter sido maior. Por outro lado, a estirpe SCPE 09, embora não tenha apresentado a maior produção enzimática dentre as três testadas, teve como vantagem a produção máxima de celulasas com apenas dois dias de cultivo.

Assim sendo, de um modo geral, pode-se dizer que as estirpes estudadas no presente trabalho, apesar de não terem fornecido valores maiores aos encontrados na literatura para outros microrganismos, podem ser considerados interessantes quanto à produção de Fpase. Após otimização das condições, inclusive com a utilização de um planejamento fatorial, maiores valores poderão ser conseguidos.

Sabendo-se da importância das β -glucosidases na hidrólise de resíduos celulósicos, um ensaio enzimático foi realizado para verificar se essas enzimas são produzidas por *Streptomyces* sp. M23. Nas condições ótimas de produção de endoglucanase, ou seja, quando crescida em bagaço de cana ou farelo de trigo por três dias, o sobrenadante não apresentou atividade significativa desta atividade (0,1 U/L e 0,04 U/L, respectivamente).

Semêdo e colaboradores (2000) já haviam verificado em trabalho anterior que *Streptomyces* sp. M23 e *Streptomyces drozdowiczii* M7A quando crescidos em meio contendo celulose microcristalina (SIGMA) foram capazes de degradar CMC (endoglucanases) e papel de filtro (endo e exoglucanases), entretanto, não foram capazes de degradar a celobiose (substrato das β -glucosidases). Entretanto, Alani, Anderson & Moo-Young (2008) obtiveram 3,9 U/mL de atividade β -glucosidase com o cultivo de *Streptomyces* sp. em meio contendo celulose microcristalina como fonte de carbono. Outra estirpe, *Streptomyces* T3-1, apresentou atividade de 20,5 U/mL quando crescida em meio contendo CMC (JANG & CHEN, 2003). Segundo trabalho de Ramírez & Cocha (2003), *Streptomyces* sp. 11CMC1 quando crescida em meio contendo tiras de papel de filtro (Whatman nº 1) e extrato de levedura, também produziu 0,6 U/mL de β -glucosidases.

Observa-se, de acordo com os dados acima, que os níveis de produção de β -glucosidase para *Streptomyces* sp M23 nas condições estudadas foram muito

inferiores aos citados na literatura. Apesar disso, não podemos afirmar que esta enzima não esteja sendo produzida pelo microrganismo. Em geral os níveis de atividade encontrados na literatura foram obtidos na fase estacionária do crescimento do microrganismo. É bem sabido que há necessidade de uma ação sinérgica para a eficiente degradação de substratos celulósicos. Estes são hidrolisados inicialmente pelas endo e exoglucanases a oligo-celulose e celobiose, que irão então induzir a produção das β -glucosidases. Assim sendo, é possível que apenas três dias não tenha sido um tempo suficiente para a ocorrência dos eventos acima descritos.

Enzimas termoestáveis possuem grande importância biotecnológica. 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 & CHENG, 2003). As CMCases presentes nos extratos enzimáticos obtidos a partir do cultivo da estirpe *Streptomyces* sp. M23 em bagaço de cana e farelo de trigo foram estáveis a 50°C, onde foi possível verificar uma atividade relativa superior a 85% mesmo após 8 horas de incubação, porém a 60°C perderam cerca de 50% da sua atividade após meia hora. 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 & CHEN 2003), *Streptomyces drozdowiczii* M7A, que foi capaz de reter 100% de sua atividade a 50°C por uma hora, mas não a 60°C (GRIGOREVSKI-LIMA *et al.*, 2005), e uma estirpe de *Termomonospora* sp. que apresentou endoglucanases com 100% de estabilidade a 50°C mesmo após 72h de incubação (GE ORGE, AHMAD & RAO,

2001). Por outro lado, existem referências de endoglucanases mais estáveis, como uma estirpe de *Streptomyces* sp, que quando incubada a 60° C reteve 84% de sua atividade inicial ao término das 3 horas de incubação (ALANI, ANDERSON & MOO-YOUNG, 2008).

Quanto à termoestabilidade da enzima FPase, foi verificado que ambos os extratos enzimáticos de *Streptomyces* sp. M23 testados mantiveram cerca de 85% de sua atividade inicial a 50° C até após 2 horas e mesmo após 8 horas de incubação, a atividade se manteve em torno de 50% de sua atividade inicial. A 60° C, entretanto, em apenas 30 minutos de incubação a atividade enzimática foi reduzida a menos de 50%. Não foram encontrados na literatura dados que pudessem ser utilizados para comparação com os resultados aqui obtidos, nem para actinomicetos, nem para fungos. No caso específico de *Streptomyces* sp M23, pode-se concluir que a termoestabilidade de FPase é bem maior a 50°C, principalmente no caso do sobrenadante proveniente do crescimento em farelo de trigo.

O zimograma para a detecção de endoglucanases realizado com os extratos brutos de *Streptomyces* sp. M23, obtidos a partir do cultivo em bagaço de cana ou farelo de trigo, revelaram algumas diferenças entre as duas amostras. Foi detectada a presença de uma banda de maior massa molecular aparente de 100 kDa, para o bagaço de cana, e uma de 70 kDa, para o farelo de trigo. Também foi encontrada uma banda em comum para os dois extratos, de 42 kDa. Estes resultados indicam que apesar da semelhança de comportamento dos dois sobrenadantes no que diz respeito aos ótimos de pH e temperatura de CMCase e FPase, existem enzimas diferentes presentes nos extratos produzidos. Essa diferença entre os perfis eletroforéticos das endoglucanases produzidas pode indicar um dos motivos pelos

quais a atividade enzimática foi maior no farelo de trigo, já que este extrato bruto possui uma enzima diferente.

Poucos dados referentes à realização de zimogramas utilizando extrato enzimático de *Streptomyces* sp. foram encontrados na literatura. Nascimento e colaboradores (2009) detectaram 3 bandas a partir do extrato bruto de *Streptomyces malaysiensis* cultivado em 0,5% de dreche cervejeiro e 0,1% ou 1,2% de milhocina. Ambos os extratos apresentaram mesmo perfil eletrofóretico, com bandas de 178, 115 e 51 KDa. Em relação aos fungos, tem-se observado resultados bastante variados, em termos quantitativos e qualitativos. Por exemplo, o extrato enzimático bruto de *Penicillium citrinum* revelou a presença de duas endoglucanases de massa molecular aparente de aproximadamente 90 e 38 kDa. Já o extrato enzimático purificado da levedura *Cryptococcus* sp. S-2 (THONGEKKAEW *et al.*, 2008) apresentou uma banda com massa molecular aparente de 34 kDa.

Os experimentos preliminares de hidrólise do bagaço de cana de açúcar, com ou sem explosão a vapor, não foram bem sucedidos. No entanto pode ser confirmado que o bagaço submetido a um pré-tratamento com explosão a vapor favoreceu o processo de hidrólise. Este resultado já é amplamente conhecido, visto que o pré-tratamento ataca a hemicelulose, e permite a liberação das fibras de celuloses da lignocelulose presente no bagaço de cana de açúcar, fazendo com que estas fiquem mais disponíveis a ação das celulasas (SUN & CHEN, 2002).

. A análise da produção de açúcares redutores a partir de bagaço pré-tratado indicou que no caso do *T. reesei* RUT-C30 a produção foi sempre crescente, até 48 horas. Já a produção a partir do sobrenadante obtido com a estirpe M23 apresentou um platô, entre 2 e 24 horas, e em seguida foi decrescente. No caso da produção de glicose os resultados foram praticamente nulos, tanto para a RUT- C30 como

para M23, o que seria esperado devido a ausência de atividade de β -glucosidase.

Como já ressaltado, os experimentos de hidrólise do bagaço de cana de açúcar aqui realizados, utilizando os extratos obtidos com a estirpe M23, foram preliminares, e devem ser continuados. Na verdade, considerando que esta estirpe produz baixos níveis de β -glucosidase o ideal seria a utilização de um consórcio, utilizando-se os sobrenadantes de mais de um microrganismo, onde a atividade de endoglucanase e FPase fosse associada a de β -glucosidase. Caso fosse necessário, a própria utilização de estirpes ricas em FPase também poderia ser associada.

Conclusões

- As três estirpes de actinomicetos testadas no presente trabalho foram promissoras para a produção de celulases em resíduos de baixo custo. Todas três foram capazes de crescer tanto em farelo de trigo como em bagaço de cana de açúcar associado a milhocina, produzindo endoglucanases e FPases em quantidades razoáveis, entretanto, quantidades limitadas de β -glucosidases.
- Dentre as três estirpes de actinomicetos testadas neste trabalho, *Streptomyces* sp. M23 foi a que apresentou melhores resultados em ambos os substratos testados, tendo obtido no terceiro dia de cultivo, uma produção máxima de CMCase de 552,0 U/L e FPase de 34,5 U/L no farelo de trigo, e no bagaço de cana de açúcar 327,7 U/L de CMCase e 37,8 U/L de FPase.
- Dentre os dois substratos testados, o farelo de trigo forneceu resultados ligeiramente maiores de produção enzimática, tanto de CMCase quanto FPase, para as três estirpes estudadas.
- Os extratos enzimáticos obtidos a partir do cultivo de *Streptomyces* sp. M23 em bagaço de cana ou farelo de trigo apresentaram atividade CMCase máxima a 60°C e pH 5 e atividade máxima de FPase a 50°C e pH 6,0.
- As CMCases presentes nos extratos enzimáticos de *Streptomyces* sp. M23 obtidos de bagaço de cana e farelo de trigo foram estáveis a 50° C, retendo 85% da

atividade até 8 horas de incubação, mas não a 60°C, quando perderam cerca de 50% de atividade após meia hora.

- As FPases presentes nos extratos enzimáticos de *Streptomyces* sp. M23 obtidos de bagaço de cana e farelo de trigo também foram estáveis a 50°C, retendo 86% de atividade por até duas horas para o sobrenadante obtido do bagaço, e 84% após 5 horas para o do farelo de trigo. Já a 60°C, após 2 horas, o sobrenadante do bagaço de cana manteve cerca de 38% da atividade inicial enquanto que o do farelo de trigo reteve apenas 30 %.

- Os zimogramas indicaram que as endoglucanases presentes nos dois sobrenadantes podem ser diferentes, com uma banda comum de massa molecular de 42 kDa, e outra de 100 kDa para o bagaço de cana e 70 kDa para o farelo de trigo.

- Os resultados obtidos para a hidrólise do bagaço de cana de açúcar utilizando os sobrenadantes aqui produzidos não foram favoráveis, porém são ainda preliminares, e novos experimentos devem ser conduzidos para avaliar a real eficiência dos mesmos na produção de açúcares redutores a partir de material lignocelulósico visando a produção de etanol.

- Os resultados aqui obtidos indicam que a estirpe M23 é promissora, tendo sido capaz de produzir CMCase a partir de substratos de baixo custo em quantidades bem superiores às aquelas obtidas anteriormente por diversas outras estirpes isoladas de solo e ambientes brasileiros.

Referências

ABDULLA, H. M. & EL-SHATOURY, S. A. **Actinomycetes in rice straw decomposition.** Waste Management, 27, 850–853, 2007.

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.** Carbohydr. Polymer., 57, 67-72, 2004.

AGUIAR, C. L & MENEZES, T. J. B. **Produção de celulases e xilanase por *Aspergillus niger* IZ-9 usando fermentação submersa sobre bagaço de cana de açúcar.** Boletim do Ceppa, 18(1), 57-70, 2000. Disponível em: <<http://ojs.c3sl.ufpr.br/ojs2/index.php/alimentos/article/viewFile/1125/926>>. Acesso em 29. dez 2008.

ALANI, F.; ANDERSON, W. A. & MOO-YOUNG, M. **New isolate of *Streptomyces* sp. with novel thermoalkalotolerant cellulases.** Biotechnol. Lett., 30(1), 123-126, 2008.

ANDERSON, A. S & WELLINGTON, E. M. H. **The taxonomy of *Streptomyces* and related genera.** Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 51, 797-814, 2001.

ARISTIDOU, A. & PENTILLÄ, M. **Metabolic engineering applications to renewable resource utilization.** Curr. Opin. Biotechnol., 11, 187-198, 2000.

BALTZ, R. H. **Antimicrobials from Actinomycetes Back to the Future.** Microbe, 2 (3), 125-131, 2007.

BASTOS, V. D. **Etanol, alcoolquímica e biorrefinarias.** BNDES Setorial, 25, 5-38, 2007. Disponível em <<http://www.bndes.gov.br/conhecimento/bnset/set2501.pdf>>. Acesso em 29 nov. 2008.

BÉGUIN, P. & AUBERT, J. **The biological degradation of cellulose.** FEMS Microbiol. Rev., 13, 25-58, 1994.

BHAT, M. K. & BHAT, S. **Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications.** Biotechnol. Adv., 15 (3/4), 583-620, 1997.

BHAT, M. K. **Cellulases and related enzymes in biotechnology. Research review paper.** *Biotechnol. Adv.*, 18, 355–383, 2000.

BON, E. P. S.; GÍRIO, F. & PEREIRA JUNIOR, N. **Enzimas na produção de etanol.** In: **Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado.** 1ª ed. Rio de Janeiro. Bon, E. P. S.; Corvo, M. L.; Vermelho, A. B.; Paiva, C. L. A; Ferrara, M. A. & Coelho, R. R. R. (eds.). 2008. Interciência Brasil. pp. 241-271

BRECCIA, J. D.; CASTRO, G. R.; BAIGORI, M. D.; SINERIZ, F. **Screening of xylanolytic bacteria using a colour plate method.** *J. Appl. Bacteriol.*, 78 (5), 469-472, 1995.

CAMASSOLA, M. & DILLON, A. J. P. **Production of cellulases and hemicellulases by *Penicillium echinulatum* grown on pretreated sugar cane bagasse and wheat bran in solid-state fermentation.** *J. Appl. Microbiol.*, 103, 2196–2204, 2007.

CAO, Y. & TAN, H. **Effects of cellulase on the modification of cellulose.** *Carbohydr. Res.*, 337, 1291–1296, 2002.

CÉSAR, T. & MRSA, V. **Purification and properties of the xylanase produced by *Thermomyces lanuginosus*.** *Enzym. Microb. Tech.*, 19, 289-296, 1996.

CHEN, M.; XIA, L. & XUE, P. **Enzymatic hydrolysis of corncob and ethanol production from cellulosic hydrolysate.** *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, 59, 85–89, 2007.

CHUM, H. L. & OVEREND, R. P. **Biomass and renewable fuels.** *Fuel Process. Tech.*, 71, 187–195, 2001.

COELHO, R. R. R. & DROZDOWICZ, A. **The occurrence of actinomycetes in a cerrado soil in Brasil.** *Revue d' Ecologie & Biologie du Sol*, 15, 459-473, 1975.

COELHO, R. R. R & NASCIMENTO, R. P. **Seleção de actinomicetos produtores de enzimas de interesse biotecnológico.** In: **Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado.** 1 ed. Rio de Janeiro. Bon, E. P. S.; Corvo, M. L.; Vermelho, A. B.; Paiva, C. L. A; Ferrara, M. A. & Coelho, R. R. R. (eds.). 2008. Interciência Brasil. pp. 71-94

CONAB. 2008. **Cana de açúcar Safra 2008 – Segundo levantamento, Agosto / 2008**. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/cana.pdf>> Acesso em: 13 nov. 2008.

CONNELL, N. D. **Expression systems for use in actinomycetes and related organisms**. Curr. Opin. Biotechnol., 12, 446-449, 2001.

DA VINHA, F. N. M.; NASCIMENTO, R.P. & COELHO, R.R.R. **Bioprospecção de actinomicetos celulolíticos de ambientes canavieiros**. In: 10^o Encontro Nacional de Microbiologia Ambiental (ENAMA), Goiânia. 2006.

DE AZEREDO, L. A. I.; DE LIMA, M. B.; COELHO, R. R. R. & FREIRE, D. M. G. **A low-cost fermentation médium for thermophilic protease production by Streptomyces sp. 594 using feather meal and corn steep liquor**. Curr. Microbiol., 53, 335-339, 2006.

DEMIRBAS, A. **Progress and recent trends in biofuels**. Progr. Energ. Combust. Sci., 33, 1-18, 2007.

DIENES, D.; EGYHÁZI, A. & RÉCZEY, K. **Treatment of recycled fiber with Trichoderma cellulases**. Ind. Crop. Prod., 20, 11-21, 2004.

FRANCO, M. N. 2007. 64 f. **Identificação molecular de duas possíveis espécies novas de actinomicetos isoladas em solo de Mata Atlântica, Rio de Janeiro, Brasil (Streptomyces sp)**. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização) - Fundação Técnico-Educacional Souza Marques. Rio de Janeiro, 2007.

GEORGE, S. P.; AHMAD, A. & RAO, M. B. **Studies on carboxymethyl cellulase produced by an alkalothermophilic actinomycete**. Bioresource Technol., 77, 171–175, 2001.

GHOSE, T. K. **Measurement of cellulase activities**. Pure Appl. Chem., 59 (2), 257-268, 1987.

GRAD, P. **Biofuelling Brazil. An overview of the bioethanol success story in Brazil**. Refocus, 7(3), 56-59, 2006.

GRAY, K. A.; ZHAO, L.; Emptage, M. **Bioethanol**. Curr. Opin. Chem. Biol., 10, 141-146, 2006.

GRIGOREVSKI-LIMA, A. L. ; DA VINHA, F. N. M. ; SOUZA, D. T. ; BISPO, A. S. R. ; BON, E. P. S. ; COELHO, R. R. R. & NASCIMENTO, R. P. ***Aspergillus fumigatus* thermophilic and acidophilic endoglucanases.** Appl Biochem Biotechnol, 2009. Article In press.

GRIGOREVSKI-LIMA, A. L.; NASCIMENTO, R. P.; BON, E. P. DA S.; COELHO, R. R. R. ***Streptomyces drozdowiczii* cellulase production using agro-industrial by-products and its potential use in the detergent and textile industries.** Enzym. Microb. Tech., 37, 272–277, 2005.

GUEVARA, C. & ZAMBRANO, M. M. **Sugarcane cellulose utilization by a defined microbial consortium.** FEMS Microbiol. Lett., 255, 52–58, 2006.

HAICHAR, F. Z.; ACHOUAK, W.; CHRISTEN, R.; HEULIN, T.; MAROL, C.; MARAIS, M. F. ; MOUGEL, C.; RANJARD, L.; BALESSENT, J.; BERGE, O. **Identification of cellulolytic bacteria in soil by stable isotope probing.** Environ. Microbiol., 9 (3), 625–634, 2007.

HAKI, G. D. & RAKSHIT, S. K. **Developments in industrially important thermostable enzymes: a review.** Bioresource Technol., 89 (1), 17-34, 2003.

HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. (eds). ***Streptomyces and related genera.*** In: Berguey's Manual of Determinative Bacteriology. 9^a ed. Baltimore. Williams & Wilkins. pp. 667-669. 1994

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. 1985. **Genetic manipulation of *Streptomyces*, a Laboratory Manual.** The John Innes Institute, Norwich, United Kingdom.

IGARASHI, K.; WADA, M.; & SAMEJIMA, M. **Activation of crystalline cellulose to cellulose III results in efficient hydrolysis by cellobiohydrolase.** FEBS J., 274, 1785–1792, 2007.

JANG, H. D. & CHEN, K. S. **Production and characterization of thermostable cellulases from *Streptomyces* transformant T3-1.** World J. Microbiol. Biotechnol., 19, 263-268, 2003.

JECU, L. **Solid state fermentation of agricultural wastes for endoglucanase production.** Ind. Crop. Prod., 11, 1–5, 2000.

JOSHI, C. P. & MANSFIELD, S. D. **The cellulose paradox - simple molecule, complex biosynthesis.** *Curr. Opin. Plant Biol.*, 10, 220–226, 2007.

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 Biochem*, 40, 3519-3525, 2005.

KENNEDY, A. C. **Bacterial diversity in agroecosystems.** *Agr. Ecosyst. Environ.*, 74, 65-76, 1999.

KHALIL, A. I. **Production and characterization of cellulolytic and xylanolytic enzymes from the ligninolytic white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* grown on sugarcane bagasse.** *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 18, 753-759, 2002.

JORGENSEN, H & OLSSON, L. **Production of cellulases by *Penicillium brasilianum* IBT 20888 - Effect of substrate on hydrolytic performance.** *Enzym. Microb. Tech.*, 38, 381–390, 2006.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. 2004. *Microbiologia de Brock*. 10ª ed. São Paulo: Prentice Hall, 608 pp.

MANDELS, M. & WEBER, J. **The production of cellulases.** *Adv. Chem*, 95, 391-414, 1969.

MCNEIL, M. M. & BROWN, J. M. **The medically important aerobic actinomycetes: epidemiology and microbiology.** *Clin. Microbiol. Rev.* 7 (3): 357-417, 1994.

MILLER, L. **Use of a dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar.** *Anal. Chem.*, 31, 426-428, 1959.

MINCER, T. J.; JENSEN, P. R.; KAUFFMAN, C. A.; FENICAL, W. **Widespread and persistent populations of a major new marine actinomycete taxon in ocean sediments.** *Appl. Environ. Microbiol.*, 68 (10), 5005-5011, 2002.

MONCIARDINI, P.; SOSIO, M.; CAVALETTI, L.; CHIOCCHINI, C.; DONADIO, S. **New PCR primers for the selective amplification of 16S rDNA from different groups of actinomycetes.** *FEMS Microbiol Ecol.*, 42 (3), 419-429, 2002.

MOREIRA, J. R. & GOLDENBERG, J. **The alcohol program**. Energy Policy. 27: 229-245, 1999.

MOREIRA, B. Carro flex representou 87,2% do total vendido em 2008. **O Estado de São Paulo**, São Paulo, 8 jan. 2009. Disponível em <http://www.estadao.com.br/economia/not_eco304266,0.htm>. Acesso em: 13 jan. 2009.

NASCIMENTO, R. P. ; ALVES JUNIOR, N. ; PEREIRA JR., 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***. Lett. Appl. Microbiol., 2009. *Article In press*.

OCHI, K.; HOSOYA, Y. **Genetic mapping and characterization of novel mutations which suppress the effect of a relC mutation on antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2)**. J Antibiot, 51(6), 592-595, 1998.

PALMAROLA-ADRADOS, B.; CHOTEBORSKÁ, A.; GALBE, M. ZACCHI, G. **Ethanol production from non-starch carbohydrates of wheat bran**. Bioresource Technol., 96, 843–850, 2005.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V. T. **Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. A review**. Bioresource Technol., 74, 69-80, 2000.

PARADKAR, A.; TREFZER, A.; CHAKRABURTTY, R.; STASSI, D. ***Streptomyces* genetics: a genomic perspective**. Crit. Rev. Biotechnol., 23 (1), 1-27, 2003.

PAREKH, M.; FORMANEK, J. & BLASCHEK, H. P. **Pilot scale production of butanol by *Clostridium beijerinckii* BA 101 using a low-cost fermentation medium based on corn steep water**. Appl. Microbiol. Biotechnol., 51, 152-157, 1999.

PARK, C.; KAWAGUCHI, T.; SUMITANI. J.; TAKADA, G.; IZUMORI, K.; ARAI, M. **Cloning and sequencing of a exoglucanase gene from *Streptomyces* sp. M23, and its expression in *Streptomyces lividans* TK-24**. J. Biosci. Bioeng., 99(4), 434-436, 2005.

PETKOVIC, H.; CULLUM, J.; HRANUELI, D.; HUNTER, I. S.; PERIC-CONCHA, N.; PIGAC, J.; THAMCHAIPENET, A.; VUJAKLIJA, D.; LONG, P. F. **Genetics of *Streptomyces rimosus*, the oxytetracycline producer.** Microbiol. Mol. Biol. Rev., 70(3), 704–728, 2006.

PETROVA, S. D.; BAKALOVA, N. G. & KOLEV, D. N. **Properties of two endoglucanases from a mutant strain *Trichoderma* sp. M7.** Biotechnol. Lett., 24, 2107- 2111, 2002.

PRASAD, S.; SINGH, A. & JOSHI, H. C. **Ethanol as an alternative fuel from agricultural, industrial and urban residues: a review.** Resour. Conservat. Recycl., 50, 1–39, 2007.

PUPPIM DE OLIVEIRA, J. A. **The policymaking process for creating competitive assets for the use of biomass energy: the Brazilian alcohol programme.** Renew. Sustain. Energ. Rev., 6, 129-140, 2002.

RAMÍREZ, P. & COHA, J. M. **Degradación enzimática de celulosa por actinomicetos termófilos: aislamiento, caracterización acción de la actividad celulolítica.** Rev. Peru. Biol., 10(1), 67-77, 2003.

ROSILLO-CALLE, F. & CORTEZ, L. A. B. **Towards proalcool II – A review of the Brazilian Bioethanol Programe.** Biomass & Bioenergy, 14 (2), 115-124, 1998.

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.** Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 54, 1323–1328, 2004.

SEMÊDO, L. T. A. S.; GOMES, R. C.; BON, E. P. S.; SOARES, R. M. A.; LINHARES, L. F.; COELHO, R. R. R. **Endocellulase and exocellulase activities of two *Streptomyces* strain isolated from a forest soil.** Appl. Biochem. Biotechnol., 84, 267–76, 2000.

SHIRLING, E. B. & GOTTLIEB. **Methods for characterization of *Streptomyces* species.** Int. J. Syst. Bacteriol., 16 (3): 313-340, 1966.

SUN, Y. & CHENG, J. **Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review.** *Bioresource Technol.*, 83, 1–11, 2002.

TADEI, A.; RODRIGUEZ, M. J.; VILCHEZ, C. C. **Isolation and identification of *Streptomyces* spp. from Venezuelan soils: Morphological and biochemical studies. I.** *Microbiol Res.*, 161, 222-231, 2006.

TEERI, T. T. **Crystalline cellulose degradation: new insight into the function of cellobiohydrolases.** *Tibtech May.*, 15, 160 – 167, 1997.

THONGEKKAEW, J.; IKEDA, H.; MASAKI, K. & IEFUJI, H. **An acidic and thermostable carboxymethyl cellulase from the yeast *Cryptococcus* sp. S-2: Purification, characterization and improvement of its recombinant enzyme production by high cell-density fermentation of *Pichia pastoris*.** *Protein Expr. Purif.*, 60, 140–146, 2008.

VOLFF, J. N. & ALTENBUCHNER, J. **Genetic instability of the *Streptomyces* chromosome.** *Mol. Microbiol.*, 27(2), 239–246, 1998.

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

WARD, A. C. & BORA, N. **Diversity and biogeography of marine actinobacteria.** *Curr. Opin. Microbiol.*, 9, 279–286, 2006.

ZHANG, H.; LEE, Y. K.; ZHANG, W. & LEE, H. K. **Culturable actinobacteria from the marine sponge *Hymeniacidon perleve*: isolation and phylogenetic diversity by 16S rRNA gene–RFLP analysis.** *Antonie van Leeuwenhoek*, 90, 159–169, 2006.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)