UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA

CARACTERIZAÇÃO DE CELULASES E XILANASES PRODUZIDAS POR *Streptomyces sp.* CULTIVADO EM RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS.

CAROLINA CÂNDIDA DE QUEIROZ BRITO CUNHA

Orientador: Prof. Dr. Luiz Artur Mendes Bataus
Coorientadora: Profª. Dra. Fabrícia Paula de Faria

Goiânia-Go, 2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA

CAROLINA CÂNDIDA DE QUEIROZ BRITO CUNHA

CARACTERIZAÇÃO DE CELULASES E XILANASES PRODUZIDAS POR *Streptomyces sp.* CULTIVADO EM RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Artur Mendes Bataus
Coorientadora: Profª. Dra. Fabrícia Paula de Faria

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Universidade Federal de Goiás como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biologia.

Goiânia-Go, 2012

Trabalho realizado nos Laboratórios de Biotecnologia de Fungos, Enzimologia e Engenharia Genética do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás, com o apoio financeiro da CNPq.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Artur Mendes Bataus

Coorientadora: Profª. Dra. Fabrícia Paula de Faria

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Márcio José Poças

Profª. Dra. Kátia Flávia Fernendes

Suplente:

Prof. Dr. Cirano José Ulhoa

Prof. Dr. Guilherme Rocha Lino

“Viver é um desafio constante. Para uns é um jogo, para outros é carregar a espada da luta no fio do destino. Sempre chega a hora de descobrir que a vida é mais do que supúnhamos. Por entre os choques da realidade profunda e as lições do dia-a-dia, conquistamos as vantagens da maturidade e entendemos que tudo valeu a pena.”

(Luiz Gaspareto)

Dedico este trabalho à minha mãe Vander Lúcia e ao meu pai Romeu, ao meu esposo Fabryne, a minha irmã Catarina, meu cunhado Alexandre que foram sempre meu porto seguro, minha força e exemplo a ser seguido sempre e meus avós (Domervila, Geraldo, Nair e Oliveira) que sempre foram muito importantes em nossas vidas e estarão sempre no meu coração. Ao meu sogro, sogra, minhas cunhadas e aos meus familiares amo todos vocês.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que sempre me deu forças para que eu seguisse em frente para alcançar meus objetivos.

Ao meu orientador, Artur, um agradecimento especial pela oportunidade em mim confiada, pela paciência, pelo carinho, compreensão e a força que me trouxe até aqui. Muito obrigada por tudo.

À minha coorientadora, Fabrícia, obrigada pela calma, tranquilidade e por me auxiliar sempre que foi necessário, contribuiu muito para que eu pudesse conquistar esse objetivo, foi muito bom poder contar com você.

Ao professor Ivan, pela ajuda nos experimentos, discussão dos resultados, e a quem sempre serei grata por tudo que faz por mim e por ter sua amizade

À Professora Rosália pela simpatia.

À Professora Kátia e sua equipe, por me receber sempre com muito carinho e pelas dicas que me foram preciosas.

Ao professor Cirano e sua equipe, pelo auxilio e ajuda no desenvolvimento do trabalho, pelos equipamentos cedidos para que eu pudesse obter meus resultados.

À minhas amigas que sem elas nada disso teria acontecido, Lilian, Marcela, Ana Flávia e Láys, vocês fizeram a diferença, obrigada pela força, pela oportunidade, pelo carinho, pelos lanches e pela amizade de vocês. Amo muito vocês.

Aos amigos, Rogério, Thiago, Renata, Karina, Elvia, Valdirene (Val), obrigada por estarem sempre ao meu lado, o companheirismo de vocês.

À Gleiziene e ao Igo (secretária da pós-graduação em Biologia) obrigada pela documentação necessária, ajuda e simpatia.

Às pessoas que passaram pela minha vida deixando suas marcas, ajuda ou ensinamentos, e que de alguma forma sempre serão especiais.

A CNPq pela bolsa de estudos concedida.

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

Lista de Figuras	i
Lista de Tabelas	iii
Lista de Abreviaturas	iv
Resumo	vi
Abstract	vii
1. INTRODUÇÃO	**01**
1.1. Bactérias Filamentosas	01
1.1.1. Caracterização Morfológica	03
1.1.2. Moléculas de Interesse Biotecnológico	05
1.1.3. Classificação dos Actinomycetos	07
1.2. Biocombustíveis	07
1.2.1. Cana-de-açúcar	09
1.2.2. Lignocelulose	10
1.2.3. Celulose	12
1.2.4. Hemiceulose	14
1.2.4.1. Xilana	15
1.2.5. Lignina	16
1.3. Hidrólise Enzimática da Celulose e Hemicelulose	18
1.3.1. Celulases	18
1.3.2. Xilanases	21
1.4. Aplicação Biotecnológica de Xilanases e Celulases	22
2. OBJETIVOS	**25**
2.1. Objetivo Geral	25
2.2. Objetivo Especifico	25

3. MATERIAIS **26**

3.1. Linhagem da Bactéria *Streptomyces sp* 26

3.2. Substratos Lignocelulósicos 26

3.3. Meios de Cultura 26

3.4. Substratos para Determinação das Atividades Enzimáticas 27

3.5. Soluções 28

3.6. Cromatografia de Camada Delgada 32

4. MÉTODOS **33**

4.1. Obtenção de Isolados de *Streptomyces sp*. a partir de BCA 33

4.2. Seleção dos Isolados Produtores de celulases em Placa 33

4.3. Análise da Produção de Avicelase, CMCase, FPase e Xilanse pelos Isolados Cultivados em Resíduos Lignocelulósicos 33

4.4. Determinação das Atividades Celulolíticas e Xilanolíticas pelo Método dos Açúcares Redutores 34

4.5. Caracterização Bioquímica de um Conjunto de enzimas extracelulares 36

4.6. Zimograma 37

4.7.Pré-tratamento do BCA 37

4.8. Hidrólise enzimática do BCA pré-tratado 37

4.9. Cromatografia de camada delgada 39

4.10. Análise Filogenética 39

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO **40**

5.1. Obtenção dos Isolados 40

5.2. Escolha do Isolado e do Meio de Cultura para Obtenção da Maior Produção de Celulases e Xilanases 41

5.3. Cinética da Produção de Celulases e Xilanases pelo I3 43

5.4. Dosagem de Protease 47

5.5. Zimograma 47

5.6. Caracterização Parcial da Atividade Celulolítica e Xilanolítica do sobrenadante de cultura 49

5.7. Estudo da Termoestabilidade 57

5.8. Efeito dos Íons Métalicos e do EDTA sobre a Atividade do Sobrenadante de Cultura60

5.9. Identificação Taxonômica do Isolado I3 62

5.10. Sacarificação de Substratos Lignocelulósicos por Hidrólise Enzimática 64

5.11. Hidrólise Enzimática 64

6. CONCLUSÕES 68

7. PERSPECTIVAS 69

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 70

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Classificação hierárquica dos actinomicetos baseada na filogenética. As análises dos dados de sequências de 16S rDNA (WILLIAMS et al., 1989). 2

Figura 2. As formas dos Actinomicetos (WILLIAMS et al., 1989). 4

Figura 3. Morfologia de esporos do gênero Streptomyce (WILLIAMS et al., 1989). 4

Figura 4. Distribuição Energética no Brasil (A) e no Mundo (B) (NASS et al., 2007). 8

Figura 5. Representação esquemática da composição e arranjo da celulose, hemicelulose e lignina na parede celular dos vegetais (ROSSETO, 2011). 12

Figura 6. Estrutura da celulose (adaptado de SANDGREN et al., 2005). 13

Figura 7. Esquema de uma fibra de celulose (Adaptado de COWLING, 1963). 14

Figura 8. Estrutura do ácido ferúlico esterificado para unidades de arabinose e de arabinoxilana. (modificado de BUANAFINA, 2009). 16

Figura 9. Estrutura de lignina (RUIZ-DUEÑAS & MARTÍNEZ, 2009 - parcialmente reproduzido). 17

Figura 10. Representação esquemática da amorfogênese das fibras de celulose mediada por CBMs (ARANTES & SADDLER, 2010). 19

Figura 11. O modelo de sinergia das endoglicanases e celobiohidrolase / exocellulases durante a hidrólise da celulose (ROSSETO, 2011). 21

Figura 12. Experimento de atividade em placa. 41

Figura 13. Produção de celulases e xilanases pelos isolados I3, I7 e I12 cultivados em diferentes fontes de carbono. 42

Figura 14. Cinética de produção de celulase avaliada pelo ensaio de Avicelase. 43

Figura 15. Cinética de produção de celulase avaliada pelo ensaio de CMCase. 44

Figura 16. Cinética de produção de celulaseavaliada pelo ensaio de FPase. 45

Figura 17. Cinética de produção de Xilanase. 46

Figura 18. Zimograma para CMCase. 47

Figura 19. Zimograma para Xilanases..... 48

Figura 20. A) Efeito do pH na atividade da Avicelase. B) Efeito da temperatura sobre atividade da Avicelase. 50

Figura 21. A) Efeito do pH na atividade da CMCase. B) Efeito da temperatura na atividade de CMCase. 52

Figura 22. A) Efeito do pH na atividade da FPase. B) Efeito da temperatura na atividade FPase..... 54

Figura 23. A) Efeito do pH na atividade da Xilanase. B) Efeito da temperatura na atividade Xilanase. 56

Figura 24. Termoestabilidade da atividade de Avicelase às temperaturas de 50°C e 60°C. Atividade Relativa expressa em relação à atividade original (100%). 57

Figura 25. Termoestabilidade do sobrenadante CMCase às temperaturas de 50°C e 60°C. Atividade Relativa expressa em porcentagem com a porcentagem da atividade original (100%). 58

Figura 26. Termoestabilidade da atividade de FPase nas temperaturas de 50°C e 60°C. Atividade Relativa expressa em relação à atividade original (100%). 59

Figura 27. Termoestabilidade do sobrenadante Xilanase às temperaturas de 50°C e 60°C. Atividade Relativa expressa em porcentagem da atividade original (100%). 60

Figura 28. Árvore gerada utilizando o algoritimo de Neighbour-Joining com base na sequência 16S rDNA, mostrando as relações entre as diferentes espécies de *Streptomyces*. O nos nós da árvore representam Bootstrap. 63

Figura 29. Aspecto morfológico do Streptomyces sp. I3 cultivado em meio sólido. Visão do miélio aéreo (A) e do micélio substrato (B). 64

Figura 30. Cromatografia de camada delgada com placa sílica-gel... 67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Efeito de diferentes íons metálicos nas atividades de Avicelase, CMCase, FPase e Xilanase do I3. 61

Tabela 2. Dosagem das enzimas presentes no sobrenadante de cultura da bactéria *Streptomyces sp* e do fungo *A. níger*..... 65

Tabela 3. Concentração final de glicose e xilose obtida após hidrólise do BCA (2%). 65

LISTA DE ABREVIATURAS

ART	açúcares redutores totais
Avicel	celulose microcristalina
Avicelase	atividade enzimática contra Avicel
BCA	bagaço de cana-de-açúcar
CBH	celobiohidrolase
CBM	módulode ligação de carboidratos
CMC	carboximetilcelulose
CMCase	atividade enzimática contra CMC
cDNA	ácido desoxirribonucléico complementar
Da	dalton
DP	grau de polimerização
DNS	ácido 3,5-dinitrosalicílico
EGL	Endoglicanase
EL	extrato de levedura
FC	fonte de carbono
FN	fonte de nitrogênio
FPase	atividade enzimática contra papel filtro
FT	farelo de trigo
FS	fermentação submersa
g	velocidade de sedimentação em unidade gravitacional
h	horas
HSV-1	vírus tipo I da herpes simples
IPC	Índice de produção de celulases
I3	isolado de número três
I4	isolado de número quatro
I7	isolado de número sete
I12	isolado de número doze
Kb	Quilobase
MES	ácido N-morfolinoetanolsulfônico
MM	meio mínimo
MMi	meio mineral
pb	pares de base

PHB	poli-β-hidroxibutirato
pH	potencial de hidrogênio
p/v	peso por volume
q.s.q.	quantidade suficiente para
rpm	rotação por minuto
scAvicel	sobrenantes de cultura com atividade máxima de Avicelase
scCMC	sobrenantes de cultura com atividade máxima de CMCase
scFP	sobrenantes de cultura com atividade máxima de FPase
scXilana	sobrenantes de cultura com atividade máxima de Xilana
SDS	duodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida
TEMED	N,N,N’,N’-tetrametil etilenodiamina
Tris	tri(hidroximetil) aminometano
U	unidade de atividade enzimática (quantidade de enzima capaz de formar 1 μmol de produto por minuto nas condições do experimento)
V	volts
v/v	volume por volume

RESUMO

Uma linhagem de Actinomiceto, isolada do bagaço de cana-de-açúcar (BCA), identificada como *Streptomyces sp* foi selecionada pela sua capacidade de produzir celulases. A produção de celulases foi analisada por fermentação submersa (FS) pelo cultivo do isolado em meio mínimo (MM) contendo BCA, farelo de trigo (FT) ou carboximetilcelulose (CMC) como fonte de carbono, e extrato de levedura (EL) como fonte de nitrogênio. Os resultados demostraram que o FT foi o melhor indutor da produção de CMCases (2,0 $U.mL^{-1}$). Com o objetivo de analisar a cinética de produção de celulases e xilanases pelo isolado, este foi inoculado em meio mínimo contendo 0,5% (w/v) FT e mantido por 12 dias a 45°C sob agitação constante de 180 rpm. A maior produção de Avicelase foi observada após 264 h de cultivo (5,646 UmL^{-1}), de CMCase após 144 h (3,872 UmL^{-1}), de FPase após 144 h (0,0947 UmL^{-1}) e de Xilanase após 288 h (92,40 UmL^{-1}). Os sobrenantes de cultura com atividade máxima de Avicelase, CMCase, FPase e Xilanase foram analisados quanto ao pH e temperatura ótimos das respectivas enzimas. Os resultados obtidos demonstraram que a maior atividade de Avicelase foi detectada em pH 7,0 a 35°C; CMCase apresentou melhor atividade em pH 4,5 a 75°C; FPase apresentou melhor atividade em pH 5,5 a 45°C e Xilanase apresentou melhor atividade em pH 5,5 a 70°C. Quanto à termoestabilidade, as enzimas presentes mantiveram mais de 70% da atividade inicial após 2 h de incubação a 50°C. O perfil de proteínas analisado por zimograma demonstrou que o isolado secretou um conjunto de celulases (37, 21 e 17 KDa) e xilanases (39, 21, 18 e 17 KDa) quando cultivado em FT por 144 h. No ensaio de sacarificação de BCA o complexo enzimático foi capaz de liberar 19% de glicose e 62,9% de xilose.

ABSTRACT

An actinomycete strain, isolated from cane sugar bagasse (CSB), identified as *Streptomyces sp* was selected for its ability to produce cellulases. The production of cellulases was analyzed by submerged fermentation by cultivation on minimal medium (MM) containing CSB, wheat bran (WB) or carboxymethylcellulose (CMC) as carbon source, and yeast extract (YE) as nitrogen source. The results show that WB was the best inducer of CMCases (2.0 $U.mL^{-1}$). Aiming to analyze the production of cellulases and xylanases kinetics, the isolate was inoculated in minimal medium containing 0.5% (w/v) WB and maintained for 12 days at 45°C under constant agitation of 180 rpm. The highest yield of Avicelase was observed after 264 h of cultivation (5.646 Uml^{-1}), after 144 h for CMCase (3.872 Uml^{-1}), after 144 h for FPase (0.0947 Uml^{-1}) and after 288 h for Xylanase (92.40 Uml^{-1}). Culture supernatants with maximum activity of Avicelase, CMCase, Fpase and Xylanase were analyzed for optima pH and temperature of the respective enzymes. The highest enzyme activities were detected at pH 7.0 at 35°C for Avicelase, pH 4.5/75°C for CMCase, pH 5.5/45°Cfor FPase and pH 5.5/70°C for Xylanase. The enzymes retained more than 70% of the initial activity after 2 h incubation at 50°C. The profile proteins analyzed by zymogram demonstrated a set of secreted cellulases (37, 21 and 17 kDa) and xylanases (39, 21, 18 and 17 kDa) when grown on FT for 144 h. The saccharification assay with CSB as substrate showed that the enzyme complex was able to release 19% of glucose and 62.9% of xylose.

1. INTRODUÇÃO

Existe um grande interesse pela diversidade microbiológica como fonte de recursos para obtenção de novos produtos. O impacto dos processos microbiológicos é difícil de ser avaliado, dado a ampla variedade desses produtos e processos, cuja elaboração envolve direta ou indiretamente a ação de microrganismos. Bactérias, fungos e leveduras estão entre os principais microrganismos utilizados em processos biotecnológicos, para a produção de produtos comerciais avaliados em bilhões de dólares em todo o mundo (STEELE e STROWER, 1991). Exemplo deste processo é a fermentação, importante na fabricação de bebidas alcoólicas e laticínios, bem como a biorremediação de efluentes por meio da degradação de compostos organoclorados e aromáticos (SPAIN, 1995; LEE et al., 1998). Fármacos (PATEL, 1998), aditivos alimentares (STEELE e STROWER, 1991), enzimas (STEELE e STROWER, 1991; PANDEY, 1995) e biopolímeros (PIRET e DAMAIN, 1988) estão entre os produtos biotecnológicos mais importantes produzidos por estes microrganismos.

1.1. BACTÉRIAS FILAMENTOSAS

Actinomicetos são bactérias Gram positivas, aeróbias cujo DNA apresenta alto conteúdo de guanina + citosina (maior que 50%), que geralmente formam filamentos ramificados, frequentemente sob a forma de micélio, em algum estágio de seu desenvolvimento. São geralmente quimiorganotróficos, exibindo uma estrutura que varia desde simples bastonetes e cocos até uma organização micelial complexa (HOLT et al., 1994; YOKOTA, 1997). Segundo o Manual de Bergey, os actinomicetos estão agrupados em 48 gêneros, divididos em 8 diferentes grupos (Figura 1) (HOLT et al., 1994).

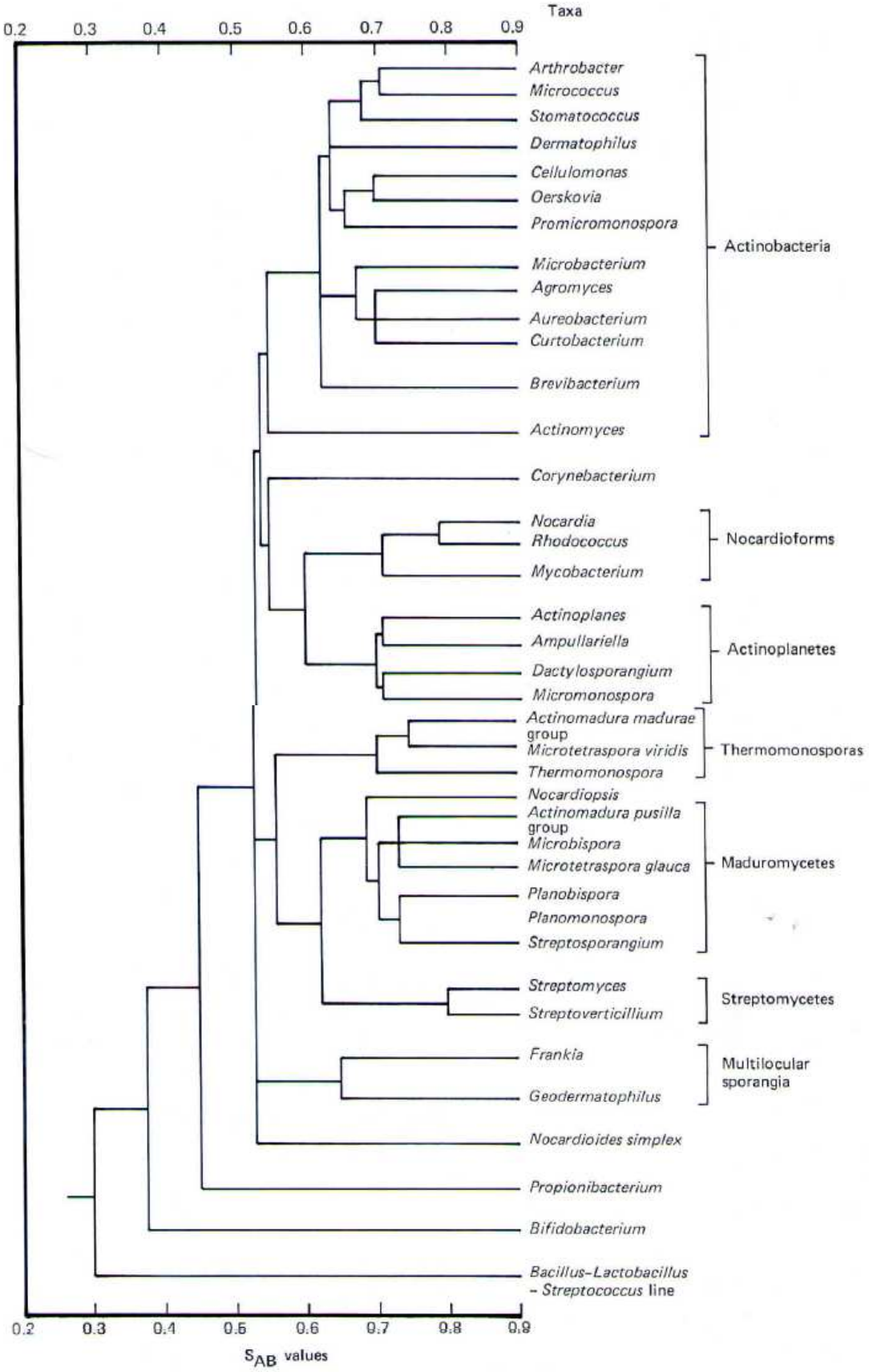


Figura 1. Classificação hierárquica dos actinomicetos baseada na filogenética. As análises dos dados de sequências de 16S rDNA. (WILLIAMS et al., 1989)

1.1.1. **Caracterização Morfológica**

Entre as bactérias Gram positivas, os actinomicetos exibem grande diferenciação morfológica baseada no grau de organização dos filamentos, conhecidos como hifas (VOBIS, 1997). As hifas são geralmente ramificadas e se parecem morfologicamente às hifas de fungos, porém são mais estreitas com diâmetro de 0,5 a 1,0 μm e dimensão análoga à bacteriana (ALEXANDER, 1997). Estas hifas podem penetrar no substrato, formando o micélio substrato, também conhecido como micélio primário ou vegetativo.

Depois de algum tempo de crescimento, este micélio pode crescer verticalmente formando o micélio secundário ou aéreo (LOCCI, 1976; LOCCI e SHARPLES, 1984; VOBIS, 1997). Este pode estar ausente em alguns gêneros como *Micromonospora* e *Actinoplanes* (VOBIS, 1997). Algumas formas não desenvolvem um micélio verdadeiro e em alguns gêneros como em *Nocardia*, o micélio substrato se fragmenta em formas que variam de cocos a bacilos (LOCCI, 1976). As células dos actinomicetos possuem uma organização procariótica típica, contendo uma variedade de inclusões como grânulos de polifosfatos, polissacarídeos e poli-β-hidroxibutirato (PHB) (LOCCI e SHARPLES, 1984). Na membrana plasmática encontram-se lipídeos, como as menaquinonas, que de acordo com a variação do comprimento e grau de insaturação de C3 da cadeia isoprenil lateral são utilizados para fins taxonômicos (MINNIKIN e O'DONNELL, 1984).

Os actinomicetos possuem uma diversidade muito grande em suas estruturas reprodutivas, sendo a formação do esporo um dos critérios mais importante de caracterização (ENSIGN, 1978; VOBIS, 1997). Os actinomicetos podem ser divididos em dois grupos principais: os esporoactinomicetos e as nocardioformas (Figura 2). No primeiro caso, a esporulação ocorre em partes definidas do micélio, porém no segundo, a hifa se fragmenta em elementos semelhantes a cocos e bastonetes (LOCCI e SHARPLES, 1984). Os esporos podem ser produzidos individualmente ou em cadeias curtas. Podem ser imóveis (aplanósporos ou conídia) ou móveis (planósporos ou zoósporos), neste caso equipados com flagelos, o que lhes permite o movimento na água. Os esporos quando produzidos em estruturas especializadas denominadas esporângio, são denominados esporangiósporos (VOBIS, 1997). Devido à presença de uma bainha filamentosa, que dá a forma da estrutura da superfície dos esporos, pode-se classificá-los como lisos, filamentosos, rugosos, espinhosos e verrugosos (Figura 3) (DIETZ e MATHEWS, 1971; LOCCI e SHARPLES, 1984).

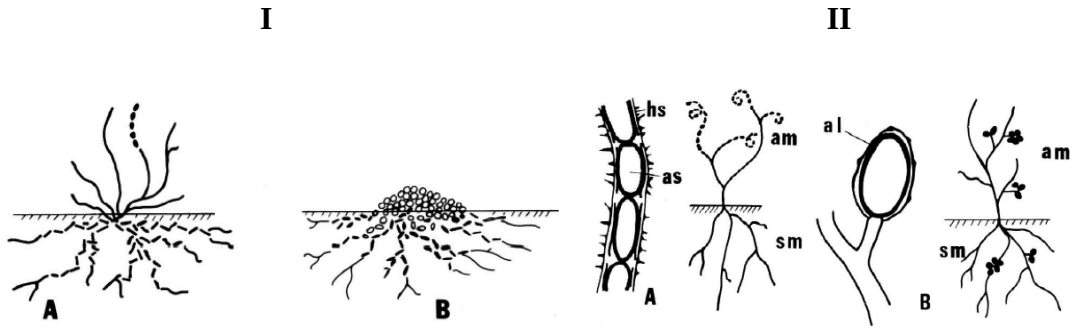


Figura 2. As formas dos Actinomicetos. I- Actinomicetos Nocardioformas: A) A espécie Nocardia possui micélio aéreo e substrato fragmentados, B) A espécie Rhodococcus possui micélio substrato fragmentado e o micélio aéreo possui segmentos arredondados. II- Sporoactinomicetos: A) Streptomyces tem cadeia de esporos sobre o micélio aéreo (am), que estão normalmente ausentes no micélio substrato (sm). Esses esporos são artrósporos (as), segmentos regulares de hifas com uma parede espessa de esporo envolto por uma bainha hidrfóbica (hs) que pode apresenta espinhos ou pêlos. B) Thermomonospora podem ter espinhos individuais (al) sobre micélio aérea e substrat (WILLIAMS et al., 1989)o.

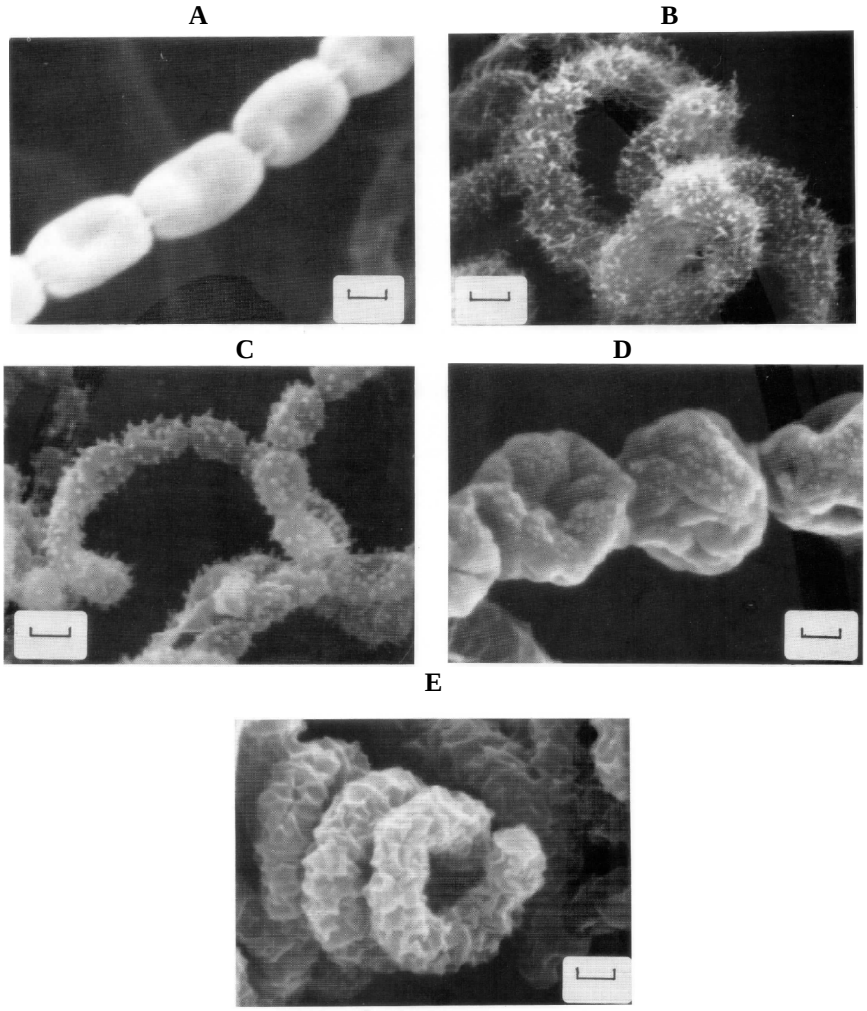


Figura 3. Morfologia de esporos do gênero Streptomyce: A) lisos, B) peludos, C)espinhosos, D) verrugosos e E) rugosos. Microscopia eletrônica de varredura (0,25 µm - A e D; 0,5 µm – B, C e E) (WILLIAMS et al., 1989)

As colônias dos actinimicetos podem estar aderidas ou soltas no meio sólido e sua consistência varia de pastosa até extremamente dura. O espectro de cores destas colônias varia muito, incluindo branco, amarelo, laranja, rosa, vermelho, púrpura, azul, verde, marrom e preto. As colônias podem estar completamente compactas ou ainda apresentar zonas diferentes de crescimento em anéis concêntricos, com orientação radial ou frequentemente uma combinação das duas. O tamanho da colônia depende da espécie, idade e condições de crescimento (VOBIS, 1997).

A maioria dos actinomicetos vive no solo como saprófitas, sendo constantemente encontrados em ambientes naturais ou modificados pelo homem (ARAI, 1997). São encontrados em associações parasíticas ou simbióticas com plantas ou animais (WILLIAMS et al., 1984). Podem ser encontrados em resíduos lignocelulósicos, são importantes na decomposição de matéria orgânica e são os procariontes economicamente mais importantes e valiosos da biotecnologia. Os actinomicetos preferem pH neutro a alcalino e são capazes de sobreviver em elevadas temperaturas, o que favorece o crescimento dos mesmos no solo em resíduos lignocelulósicos (VINHA et al., 2011).

1.1.2. **Moléculas de interesse biotecnológico**

Entre os actinomicetos, o gênero *Streptomyces* em particular, tem sido estudado devido sua importância biotecnológica. São procariotos que apresentam diversificada produção de antibióticos clinicamente importantes. Cerca de 70% ou mais dos antibióticos naturais conhecidos são produzidos por bactérias do gênero *Streptomyces* (LI et al., 2000; QUIRÓS et al., 2000).

Os *Streptomyces* possuem um potencial de degradação de vários polímeros encontrados no solo tais como hemicelulose, pectina, queratina, quitina e lignina. Algumas espécies de *Streptomyces* atacam a celulose e a lignina, tem grande importância na produção de etanol e produtos químicos a partir de subprodutos da área agroflorestal (GOODFELLOW e WILLIAMS, 1983).

Vários antagonistas microbianos têm sido investigados como potenciais antifúngicos e agentes de controle biológico de doenças de plantas. Muitas espécies de actinomicetos, especialmente aqueles pertencentes ao gênero *Streptomyces*, são bem conhecidos como agentes de biocontrole que inibem a ação de fungos patogênicos em plantas (OG et al, 2008; SILVA SOUSA et al., 2008). É bem conhecido que *Streptomyces sp.* pode produzir compostos industrialmente úteis, uma variedade de antibióticos, como metabólitos secundário (EL-TARABILY et al., 2000; AUGUSTINE et al., 2005; EL-TARABILY, 2006; POHANKA, 2006). Alguns actinomicetos podem proteger as raízes de plantas por inibir o desenvolvimento de patógenos fúngicos, produzindo enzimas que degradam a parede celular fúngica ou produzir compostos antifúngicos (GOODFELLOW e WILLIAMS 1983). O gênero *Streptomyces* é importante na produção de antibióticos, o mais novo antibiótico obtido apartir dos metabólitos secundários do *Streptomyces sp.* NEAU-x211 foi denominado de Neaumycin (HUANG, et al., 2012).

Na agricultura, os *Streptomyces* possuem um papel importante no controle biológico de alguns fitopatógenos (GOMES et al., 2000). Resultados promissores com *S. viridificans* mostraram sua capacidade em produzir altos níveis de qutinase, a qual pode ser utilizada para hidrolisar quitina, um dos principais componentes da parede celular dos fungos (GUPTA et al., 1995).

Outros produtos de interesse biotecnológico também são produzidos por *Streptomyces*. Enzimas purificadas a partir dessas bactérias são utilizadas na produção de alimentos e vitaminas (HOLT et al., 1994).

Drogas também foram descritas como substâncias produzidas por algumas espécies de *Streptomyces*. Substâncias que apresentam atividade antiviral contra o vírus tipo I do herpes simples (HSV – 1), já foram obtidas de culturas de *Streptomyces* (HAYASHIA et al., 2000).

O gênero pode apresentar espécies patogênicas. A sarna de batata é uma doença grave que acomete principalmente batatas, outras plantas hospedeiras para sarna incluem rabanete, beterraba, cenoura e nabo. A doença é causada por bactérias Gram-positivas do gênero *Streptomyces*. Embora este gênero seja onipresente no solo, a maioria dos *Streptomyces* não são agentes patogênicos de plantas. *Streptomyces sarna* (sinônimo, *S. scabiei*) é a espécie mais bem descrita causadora da sarna (WANNER, 2007).

1.1.3. **Classificação dos Actinomycetos**

Os progressos em biologia molecular e filogenética molecular têm aumentado a quantidade de informações, disponibilizando-as para a classificação de microrganismos relativamente próximos (PETERES et al., 2000; ROBERTS & CRAWFORD, 2000). A aplicação de técnicas moleculares para amostras ambientais tem permitido a análise de diversidade microbiana, sem a necessidade de cultivá-las. Procedimento de cultivo pode inevitavelmente favorecer o crescimento de alguns membros, enquanto outros são inibidos ou não cultiváveis. As técnicas de cultivo subestimam a diversidade presente nos diferentes ambientes. Marcadores moleculares genéticos são poderosas ferramentas para análise de relações genéticas e diversidade. Métodos genotípicos têm sido aplicados para identificar isolados microbianos revelando a macrodiversidade entre espécies e microdiversidade em populações clonais (MARTIN et al., 2000).

As análises de sequências de proteínas e ácidos nucléicos têm sido empregadas para determinar as relações filogenéticas entre os diferentes grupos de actinomicetos e gênero relacionados. Devido às potenciais aplicações dos metabolitos secundários produzidos por estes microrganismos, principalmente por *Streptomyces* (SALAMONI, 2005).

A análise de 16S rDNA provou ser uma ferramenta muito importante na sistemática de *Streptomyces*, bem como útil na atribuição a espécie recentemente isolada. Existe um interesse crescente no isolamento de novas espécies de *Streptomyces*, pois são potentes produtores de metabólitos secundários ativos (MELLOULI et al., 2003).

1.2. **BIOCOMBUSTÍVEIS**

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar com cerca de sete milhões de hectares de área plantada, seguido por Índia, Tailândia e Australia. Esta cultura é totalmente aproveitada, desde a produção de açúcar e álcool até a utilização dos subprodutos como bagaço, palha e vinhaça (RIPOLI et al., 2004). Pesquisas utilizando o bagaço e a palha da cana visam o emprego destes subprodutos, ricos em fibras como a celulose, na produção de etanol, chamado então de biocombustível de segunda geração (POMPEU, 2010).

Espera-se que o etanol de 2ª geração produzido a partir da biomassa celulósica seja comercializado, com a visão de complementar a produção do etanol de 1ª geração e substituir

gradativamente as fontes de combustível fóssil na matriz energética mundial (GNANSOUNOU & DAURIAT, 2010).

A importância do etanol celulósico está na capacidade de uso de matéria prima renovável a baixo custo (SOLOMON et al, 2007; MACEDO et al., 2008; GOLDEMBERG & GUARDABASSI, 2009).

A insuficiência de combustíveis fósseis e as mudanças climáticas geradas pela emissão de gases de efeito estufa tem resultado em ações governamentais a favor do uso de biocombustíveis (PLANO NACIONAL DE AGROENERGIA 2006-2011). A produção de energia a partir da biomassa atende a vários requisitos de sustentabilidade. No aspecto ambiental promove o sequestro de carbono, gera um menor nível de emissões dos gases do efeito estufa e apresenta um menor ciclo de produção, com o processo quase que inteiramente controlado pelo homem. Os impactos sócio-econômicos positivos estão relacionados com a geração e a possibilidade de complementar a demanda energética global (Figura 4) (GOLDEMBERG, 2007; MACEDO et al., 2008; OMETTO & ROMA, 2010).

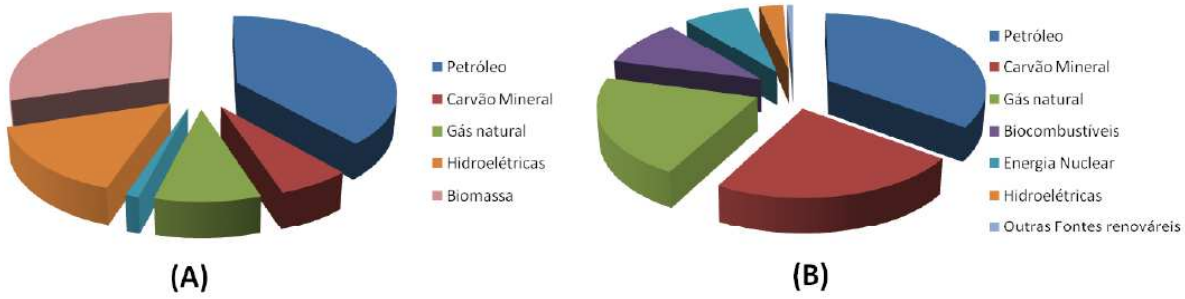


Figura 4. Distribuição Energética no Brasil (A) e no Mundo (B) (NASS et al., 2007).

No Brasil, o álcool derivado da cana-de-açúcar tem se apresentado competitivo nestas avaliações, podendo ainda ter vantagens do potencial uso do bagaço de cana para a produção de etanol de 2ª geração e a possibilidade de integração em uma cadeia produtiva consolidada (POMPEU, 2010).

O etanol de 2ª geração, produzindo a partir de material lignocelulósico pode seguir duas rotas tecnológicas: (i) a rota bioquímica, com aplicação de catalisadores ou enzimas para hidrólise da biomassa e a subsequente fermentação microbiana e (ii) a rota termoquímica, por meio do processo de gaseificação, seguido da síntese catalítica dos gases emitidos (BROWN, 2005). No entanto, a rota enzimática representa um estágio mais avançado de

desenvolvimento científico-tecnológico assim como uma maior capacidade de integração nas instalações industriais de 1ª geração. Diferentemente do etanol da sacarose, o etanol celulósico precisa de um pré-tratamento físico-químico para disponibilizar a celulose às enzimas hidrolíticas na etapa de sacarificação. Com este intuito podem ser usados agentes ácidos, básicos ou solventes (MOSIER et al., 2005).

Após o pré-tratamento, os carboidratos componentes da celulose e hemicelulose são hidrolisados para formar monossacarídeos (glicose e xilose, principalmente). Os açúcares são assim fermentados por leveduras ou bactérias para produção de etanol. O produto obtido pode seguir o processo convencional do etanol de 1ª geração onde é concentrado em colunas de destilação e purificado podendo ser usadas tecnologias como a preevaporação (KALYANI et al., 2008), ou osmose reversa (HSU & TAN, 1993).

Atualmente os processos de fermentação e produção de etanol dão conta de três categorias principais de tipos de biomassa: açúcares (da cana-de-açúcar, beterraba e frutas), amido (milho, mandioca e batatas) e celulose (madeira e resíduos da agricultura de modo geral), sendo que somente o primeiro pode ser convertido a bioetanol diretamente (LIN & TANAKA, 2006).

A maior parte do bioetanol produzido mundialmente deve-se ao emprego da sacarose da cana-de-açúcar (no Brasil) e do amido de milho (nos Estados Unidos) (SUKUMARAM et al., 2009). Entretanto, as previsões do aumento de demanda de energia são alarmantes. As tecnologias atuais que empregam principalmente cana-de-açúcar e milho na produção de bioetanol serão insuficientes para gerar toda a energia necessária (HANH-HAGERDAL et al., 2006). Além disso, a busca por fontes que não sejam importantes como alimento para o homem tem ganhado força e deve se tornar uma realidade (TAVARES, 2010).

1.2.1. **Cana-de-açúcar.**

A cana-de-açúcar é uma gramínea cultivada em regiões tropicais e subtropicais, possui propriedade de sintetizar e armazenar sacarose (entre 14 a 24%) em seus tecidos de reserva (NOGUEIRA & VENTURINI FILHO, 2005).

A planta é composta por duas partes: uma subterrânea (rizoma e raízes) e outra área (colmo, folhas e folhas). O colmo é constituído de nós e entrenós e possui um sistema com duas fases, a fase insolúvel, também chamada de fibra, constituída por celulose, hemicelulose e lignina e a fase solúvel cujo caldo contém água e substâncias orgânicas, dentre as quais a

sacarose. A função do colmo é de suportar a parte aérea, conduzir água e nutrientes do solo para as folhas onde os açúcares são sintetizados, transportar estes carboidratos para as outras partes da planta e armazenar sacarose e outras substâncias (NOGUEIRA & VENTURINI FILHO, 2005).

Depois de colhida, a cana é transportada para a indústria, onde é lavada, picada e seu caldo é extraido. O caldo passa por peneiras e tratamento químico para regular o pH. Em seguida, é aquecido a 105°C, passando depois pelo processo de purificação para a retirada de resíduos. É decantado e, por meio da evaporação, é concentrado, recebendo o nome de xarope. Para a produção de açúcar, o xarope passa pelo processo de cristalização por cozimento ou por resfriamento. Dos cristalizadores, o açúcar passa para a fase centrifugação e, em seguida, pela secagem. O açúcar é então transferido para sacos de 50 quilos.

Para a obtenção do álcool, o caldo é fermentado, após tratamento de purificação por meio da pasteurização. A fermentação ocorre em tanques, obtendo-se teor alcoólico de 7 a 10%, passando, a se chamar vinho. O vinho é então resfriado e centrifugado para separar as leveduras, passando, em seguida, para as colunas de destilação. O álcool resultante hidratado, a 96° GL. O anidro passa por outro processo de desidratação para chegar a 99,7°GL (ÚNICA, 2012).

1.2.2. Lignocelulose

Lignocelulose é o nome dado ao material presente na parede celular da maioria das plantas terrestres, constituídos de celulose embebido numa matriz amorfa de hemicelulose e lignina (Figura 5) (MARTINEZ et al., 2009).

Estes três tipos de polímeros são fortemente ligados um ao outro e representam mais de 90% do peso seco da célula vegetal. A quantidade de cada polímero varia de acordo com a espécie, época de colheita e, também, ao longo de diferentes partes da mesma planta. Em geral, resinosas (gimnospermas como Pinus e Cedrus) possuem maior teor de lignina do que folhosas (angiospermas como o eucalipto e carvalho). O teor de hemicelulose, no entanto, é superior em gramíneas. Em média, lignocelulose consiste de 45% de celulose, 30% dos hemicelulose e 25% de lignina (GLAZER & NIKAIDO, 2007).

Materiais lignocelulósicos podem também incluem resíduos agrícolas (palhas, espigas, bagaços, cascas), resíduos industriais (serragem, resíduos de fábrica de papel, resíduos da

indústria de alimentos), resíduos sólidos urbanos e resíduos domésticos (lixo e esgoto) (MTUI, 2009).

Lignocelulose é a principal fonte mundial de matéria orgânica renovável e das propriedades químicas dos seus componentes fazem-se um material de grande valor biotecnológico. Portanto, anos atrás, o conceito de biorefinaria de lignocelulose surgiu, e recebeu crescente atenção devido ao potencial de conversão deste material, tais como compostos químicos, substratos de fermentação, como matéria-prima e biocombustíveis (RAGAUSKAS et al., 2006; DEMIRBAS, 2008).

O crescimento acentuado do consumo mundial de energia proveniente de recursos fósseis agravou o problema da poluição atmosférica pela emissão de gases relacionados com o efeito de estufa. Por esta razão, além do elevado custo do petróleo e do esgotamento eminente desses recursos em poucas décadas a partir de agora, a obtenção de combustíveis a partir de fontes renováveis, como biomassa lignocelulósica, tem despertado grande interesse no últimos anos. Atualmente, acredita-se que o etanol, como a principal forma de bioenergia, é uma das melhores alternativas ao uso de combustíveis fósseis (WANG et al., 2011).

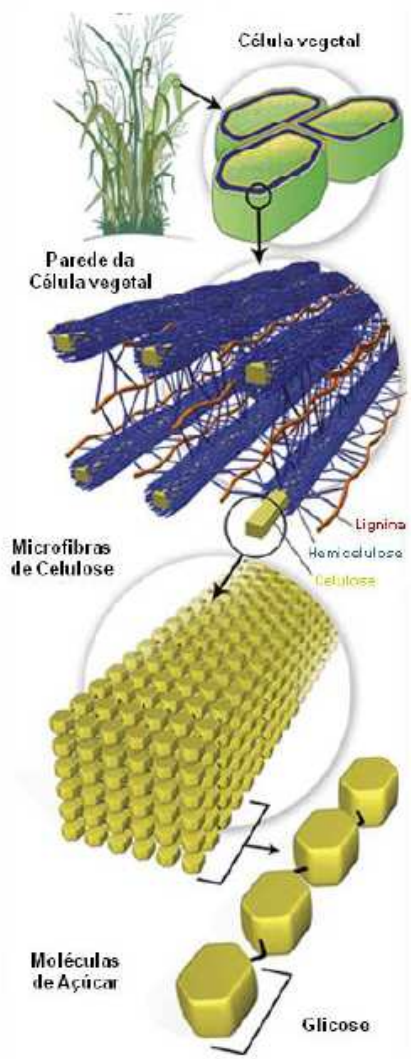


Figura 5. Representação esquemática da composição e arranjo da celulose, hemicelulose e lignina na parede celular dos vegetais (ROSSETO, 2011).

Dentro deste contexto, as novas tecnologias têm sido desenvolvidas para a obtenção de eficientes combustíveis a partir de bimassa lignocelulósicos e os países desenvolvidos e em desenvolvimento têm concentrado esforços em pesquisas que visam a obtenção dos chamados biocombustíveis, como o bioetanol e biodiesel, bem como a sua introdução e prevalência no mercado (HAMELINCK et al., 2005; PRASAD et al., 2007).

1.2.3. Celulose

Celulose, o principal polissacarídeo da parede de células vegetais, é um polímero de resíduos D-glicose unidos por ligações β-1,4 contendo de 8000-12.000 unidades, conferindo à célula proteção osmótica e resistência mecânica (CHELLAPANDI & HIMANSHU, 2008).

É um dos principais constituintes da parede celular das plantas (33% do peso seco da planta), em combinação com a lignina, hemicelulose e pectina. A celulose foi primeiramente isolada e caracterizada pelo químico francês Anselme Payen em 1838 (BAYER & LAMED, 1992; RUEGGER et al., 2001).

A cadeia termina com um carbono anomérico livre e é chamada de extremidade redutora, a outra extremidade em que o carbono anomérico não se encontra disponível é denominada extremidade não redutora (Figura 6) (SANDGREN et al., 2005).

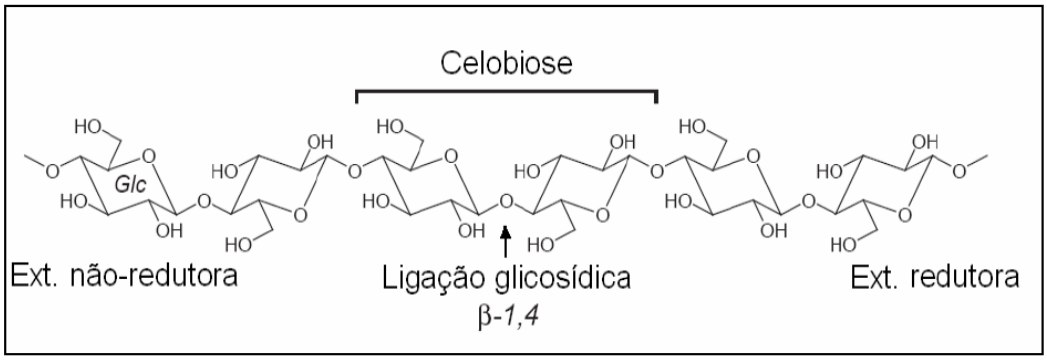


Figura 6. Estrutura da celulose mostrando a extremidade redutora e não redutora, a ligação das unidades de glicose por ligações glicosídicas β-1,4 e a celobiose formada pela a união de duas unidades de glicose (adaptado de SANDGREN et al., 2005)

Após a síntese da cadeia de celulose, o polímero se aglutina em microfibrilas de celulose altamente cristalina mantidas juntas por ligações hidrogênio, interações hidrofóbicas e forças de Van der Waals. Esta embalagem altamente organizada da cadeias de celulose torna-a muito mais resistente à hidrólise. A largura das microfibras depende da fonte da celulose (NIEDUSZYNSKI & PRESTON, 1970).

Em plantas, a unidade de microfibra é de cerca de 3 nm de largura e contém cerca de 35 cadeias de celulose, mas essas muitas vezes são hermeticamente embaladas em pacotes maiores, de 20-100 nm (HILDEN et al, 2003; PERSSON et al, 2004). O comprimento da microfibrilas, ou seja, o grau de polimerização (DP), varia dependendo da fonte, a partir de 2000 unidades de glicose, em paredes primárias até 15.000, ou mais, nas paredes secundárias. As regiões altamente cristalinas de celulose na parede celular vegetal são separadas por regiões menos ordenadas, "amorfas". A cristalinidade da celulose varia de 50% a 90%, também dependendo da fonte (HON, 1994) (Figura 7).

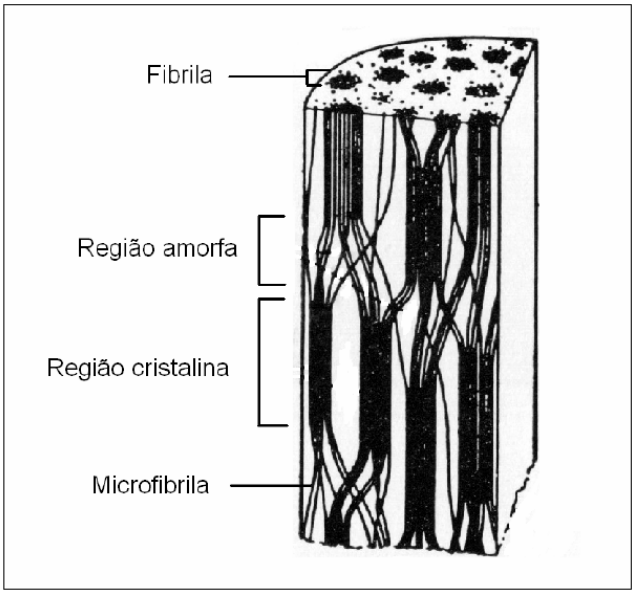


Figura 7. Esquema de uma fibra de celulose. É mostrada a estrutura de uma fibrila, microfibrila e as regiões cristalinas e amorfa da celulose (Adaptado de COWLING, 1963).

1.2.4. Hemicelulose

Hemicelulose é o segundo grupo de polissacarídeo mais abundante na parede celular da planta e é composta de heteropolissacarideos não cristalinos. Inicialmente classificou as hemicelulose como a fração de polissacarídeo da parede celular vegetal facilmente hidrolisado, uma classificação imprecisa a qual foi utilizada durante muito tempo. Depois, a classificação da hemicelulose foi redefinida, com base nas propriedades químicas dos seus componentes (SANCHEZ, 2009).

A hemicelulose encontra-se associada à celulose e à lignina na parede das células vegetais. A hemicelulose contribui, em geral, com 15 – 30% da biomassa vegetal sendo que em alguns tecidos de gramíneas e em xilanas de cereais podem representar até 50% (EBRINGEROVA et al., 2005).

A hemicelulose representa um grupo de heteropolissacarídeos contendo diferentes resíduos de carboidratos (D-xilose, D-manose, D-glicose, ácido D-galacturônico, ácido D-glicorônico, D-galactose, L-arabinofuronose e L-ramnose), sendo geralmente formada por 2 a 6 açúcares diferentes unidos por ligações do tipo β-1,4 (SANCHEZ, 2009). As hemiceluloses são classificadas, de acordo com a identidade dos principais açúcares presentes, como glicanas, xilanas, mananas, galactanas e galacturanas (BASTAWDE, 1992; THOMPSON, 1983). Hemiceluloses de madeira dura ou de “hardwood” contêm mais xilanas, enquanto que

hemiceluloses de madeira mole ou de “softwood” contém principalmente glicomananas (EBRINGEROVA et al., 2005).

1.2.4.1. Xilana

A xilana constitui o principal componente da hemicelulose, um complexo de carboidratos poliméricos incluindo xilana, xiloglicana (heteropolímero de D-xilose e D-glicose), glicomanana (heteropolímero de D-glicose e D-manose), galactoglicomanana (heteropolímero de D-galactose, D-glicose e D-manose)e arabinogalactana (heteropolímero de D-galactose e arabinose) (SHALLOM & SHOHAM, 2003). A xilana é um importante polissacarídeo estrutural nas células de plantas e é o segundo mais abundante na natureza, sendo responsável por aproximadamente um terço de todo carbono orgânico renovável na terra (PRADE, 1995). A xilana é encontrada na interface entre a lignina e a celulose onde é importante na ligação das fibras e na integridade da parede celular (BEG et al., 2001).

A cadeia principal de xilana é formada por unidades de 1,4-β-D-xilanopiranosil que podem ser substituídas em vários graus com ácido glicurônico, 4-O-metil-D-glicuronopiranosil, α-L-arabinofuranose e grupamento acetil. A xilana apresenta ainda pequenas quantidades de ácido ferúlico e p-cumárico ligados aos seus resíduos de L-arabinose (KULKARNI et al., 1999). Dependendo das ramificações presentes na cadeia central, as xilanas podem ser denominadas como arabinoxilanas, glicuronoxilanas, glicuronoarabinoxilanas ou homoxilanas (Figura 8). Xilanas de diferentes fontes apresentam considerável variação em sua composição e estrutura. Por exemplo, elas apresentam aproximadamente 15 a 30% do conteúdo da parede celular em madeira dura, onde existe como metilglicoronoxilana, e de 7 a 10% em madeira macia, onde existe como arabino-4-O-metilglicoronaxilana. O grau de polimerização geralmente varia de 150 a 200 resíduos de β-xilopiranose em madeira dura e de 70 a 130 resíduos em madeira mole (KULKARNI et al., 1999; SINGH et al. 2009).

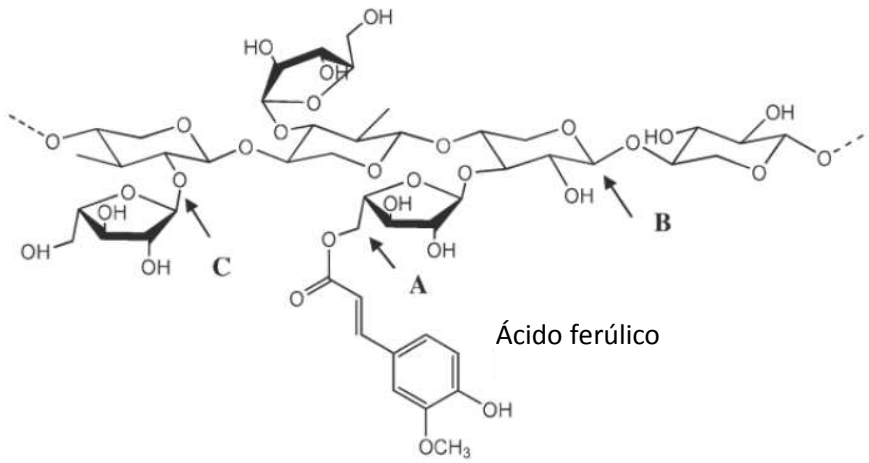


Figura 8. Estrutura do ácido ferúlico esterificado para unidades de arabinose e de arabinoxilana. A: ácido ferúlico ligado a O-5 de cadeia arabinose de arabinoxilano; B: β -1,4-ligado na espinha dorsal da xilana; C: β -1,2 -L arabinose (modificado de BUANAFINA, 2009).

A xilana do tipo O-acetil-4-O-metilglicoronoxilana consiste de pelo menos 70 resíduos de xilopiranose com ramificações ligadas ao C-2 a cada dez resíduos de xilose em média, pelo ácido glicorônico (WOODWARD, 1984). Essa xilana é altamente acetilada, sendo que a acetilação ocorre mais usualmente no C-3 do que no C-2 (BEG et al., 2001). Os grupos acetil são responsáveis pela solubilidade parcial da xilana em água, sendo facilmente removidos quando ela é sujeita à extração alcalina (SUNNA & ANTRANIKIAN, 1997).

1.2.5. Lignina

A lignina é um polímero abundante na parede celular de plantas vasculares e na natureza, depois da celulose. Aproximadamente 20% do carbono total fixado por fotossíntese em ecossistemas de terra é incorporado na lignina (HAMMEL & CULLEN, 2008).

A lignina encontra-se ligada a celulose e hemicelulose formando um lacre físico, constituindo dessa forma, uma barreira impenetrável na parede celular da planta, servindo de suporte estrutural, conferindo impermeabilidade e resistência contra o ataque microbiano e estress oxidativo. Consiste de um heteropolímero amorfo, não solúvel em água, formado basicamente de unidades de fenil propano. Possui na sua estrutura 9 átomos de carbono derivados de álcool cinamil substituído, que são cumaril, coniferil e álcool siringil. As ligninas são altamente ramificadas, não cristalinas, com estrutura e composição química variando de acordo com a fonte de origem (SANCHEZ, 2009).

A associação de lignina e hemicelulose ocorre por ligações covalentes, como ligações de éster de benzilo com o grupo carboxila do ácido 4-O-metil-d-glicurônico em xilana e mananas (KUHAD et al., 1997) e também através de ligações não covalentes. Estas interações formam uma rede densa e organizada que rodeia a celulose através ligação de extensas hidrogênio (Figura 9) (WESTBYE et al., 2007). Esta rede protege a celulose sendo uma das razões para a recalcitrância da biomassa. Estes complexos carboidratos de lignina representam um obstáculo para os processos de bioconversão de lignocelulose porque a lignina dificulta a hidrólise mediada por enzima, uma vez que atua como uma barreira física, restringindo o acesso de enzimas aos carboidratos (MOONEY et al., 1998). A lignina pode também interagir com enzimas por meio de interações hidrofóbicas, resultando em ligação não produtiva (SUTCLIFFE & SADDLER, 1986).

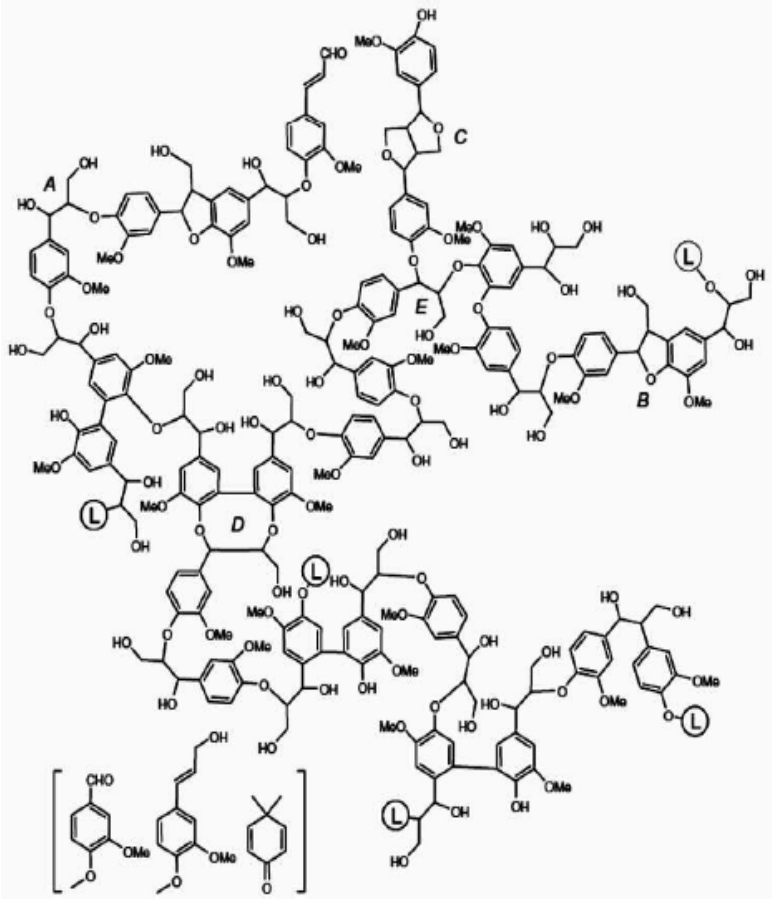


Figura 9. Estrutura de lignina. Subestruturas: β-O-4 '(A); fenilcoumaran (B); pinoresinol (C) e dibenzodioxocina (D). L contendo círculos indicam ligações com cadeias de lignina adicionais.Parênteses indicam outras estruturas menores, tais como vanilina, álcool e coniferílico (RUIZ-DUEÑAS & MARTÍNEZ, 2009 - parcialmente reproduzido).

1.3. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA CELULOSE E HEMICELULOSE

Vários microrganismos produzem um complexo de enzimas envolvidas na degradação da fração de celulose e hemicelulose da biomassa vegetal. As celulases e xilanases são as enzimas responsáveis pela hidrólise enzimática destes polissacarídeos e são produzidas por microrganismos encontrados em diversos grupos taxonômicos, em sua maioria eubactérias e fungos filamentosos, desempenhando papel importante na biosfera e participando do ciclo do carbono por meio da reciclagem da celulose e da xilana (revisto por LYND et al., 2002).

Materiais lignocelulósicos representam uma fonte importante de produtos químicos, tais como o açúcares redutores, álcool e outros produtos que podem ser obtidos por hidrólise enzimática química. Hidrólise catalisada por enzima de biomassa lignocelulósica fornece melhores rendimentos, sem a geração de produtos secundários (DEMIRBAS, 2008). Degradação enzimática da biomassa vegetal por microorganismos é realizada por um mistura complexa de enzimas, entre as quais celulases e hemicelulases se destacam, cuja ação resulta em hidratos de carbono livres, que podem ser hidrolisados à sacarídeos solúveis que podem ser ainda metabolizados, além ligninases, que promovem a despolimerização da lignina. (DILLON, 2004)

1.3.1. Celulases

Na natureza existem muitos microrganismos, fungos e bactérias, que produzem enzimas que são capazes de catalisar a hidrólise da celulose. Esses microrganismos podem ser encontrados em restos de plantas e no solo, ou seja, onde a degradação de material vegetal ocorre (BAYER et al., 1998ª). Os organismos celulolíticos podem ser classificados em duas subcategorias diferentes, dependendo de como organizam suas enzimas (TOMME et al, 1995).

A primeira classe de microrganismos celulolíticos tem enzimas celulolíticas que são organizados em complexos multienzimáticos chamados Celulossomas (BAYER et al., 1998b). Vários tipos diferentes de enzimas, com diferentes tipos de especificidades catalíticas, por exemplo, endoglucanases e celobiohidrolases, podem ser complexado juntos. O celulossoma bacteriano típico é composto de 50 moléculas de proteínas com massa molecular (MM) de 2-6 KDa (BAYER et al., 1998b).

A segunda classe de organismos celulolíticos são os que produzem enzimas que agem de forma independente. Embora a maioria da degradação da celulose seja realizado por

bactérias e fungos, celulases também têm sido isoladas de mexilhão (XU et al., 2000), cupins (WATANABE et al., 1998), lagostas (BYRNE et al., 1999) e plantas, por exemplo, Arabidopsis (planta da mesma família da couve e da mostarda) (WILLIAMSON et al., 2002).

A hidrólise enzimática da celulose em açúcares solúveis é um processo que envolve a ação de um complexo multienzimático denominado sistema celulolítico. As enzimas do sistema celulolítico foram classificadas com base no modo de catálise sobre a fibra de celulose (DAROIT, 2007).

As celulases são compostas por pelo menos dois domínios distintos: um domínio catalítico e um domínio de ligação ao carboidrato (CBM). O CBM é o responsável pela adesão das enzimas na fibra de celulose entre outras funções como: concentração de enzima na superfície do substrato; direcionar e identificar/selecionar o substrato; e o desmembramento do substrato cristalino não hidrolisável (Figura 10) (JORGENSEN et al., 2007)

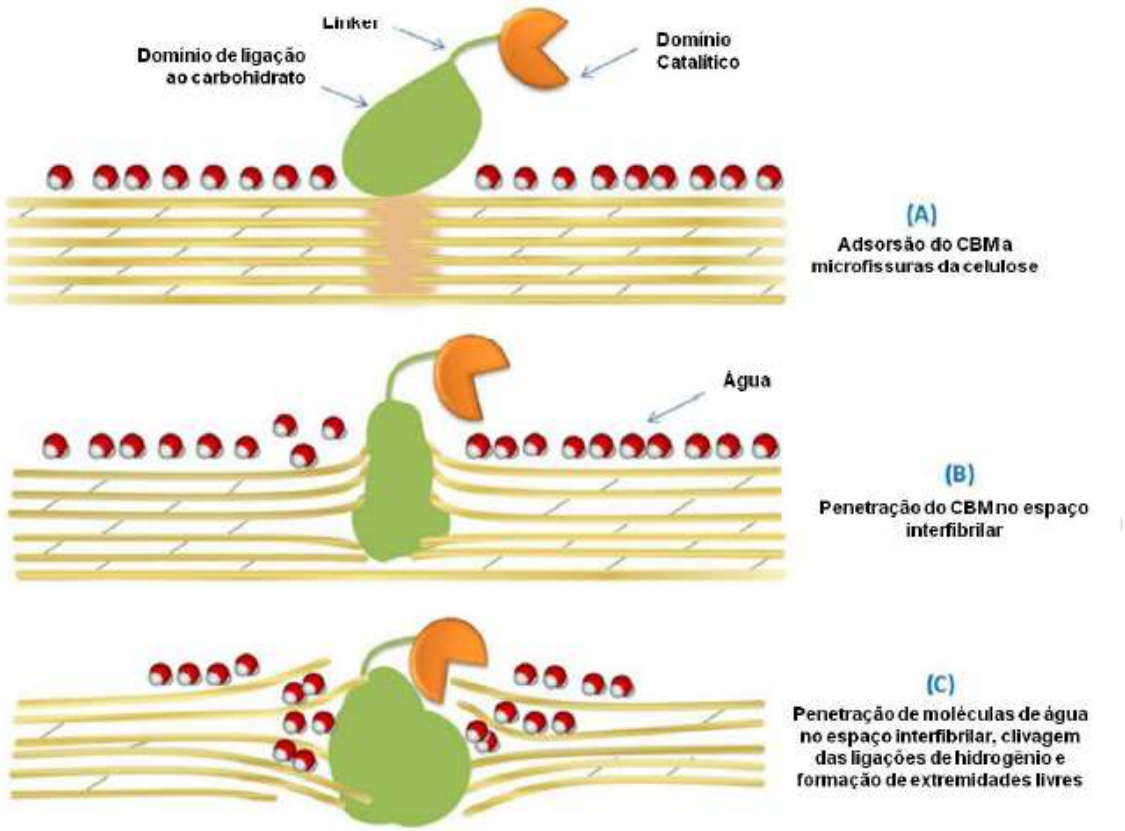


Figura 10. Representação esquemática da amorfogênese das fibras de celulose mediada por CBMs (ARANTES & SADDLER, 2010).

Ascomicetos têm grande importância para degradação de celulose e decomposição de resíduos vegetais no solo (SANDGREN & HIBERG, 2005). Um sistema baseado em enzimas celulolítica "livres", que agem sinergicamente para completar degradação celulose, é tipicamente produzido por fungos e bactérias aeróbias. Este sistema de enzima incluem três tipos de celulases (Figura 11):

i. Endoglicanases (EG, endo-1,4-β-glicanase ou endocelulases ou CMCase, EC 3.2.1.4): hidrólises aleatórias, clivam ligações β-1,4 glicosídicas internas em sítios amorfo nas cadeias de celulose, fornecendo mais extremidades para ação das celobiohidrolases;

ii. Exoglicanases ou celobiohidrolases (CBH, exo-1,4-β-glicanase ou exocelulases ou celobiohidrolase ou Fpase EC 3.2.1.91): atuam na extremidade redutora (CBH I) ou não redutora (CBH II) da cadeia de celulose, liberando celobiose;

iii. β-glicosidases (1,4-β-glicosidases ou celobiase, EC 3.2.1.21): hidrolisam a celobiose ou celo-oligossacáridos em glicose e também estão envolvidos em reações de transglicosilação de ligações β-glicosídicas de conjugados de glicose (COUGHLAN & LJUNGDAHL, 1988).

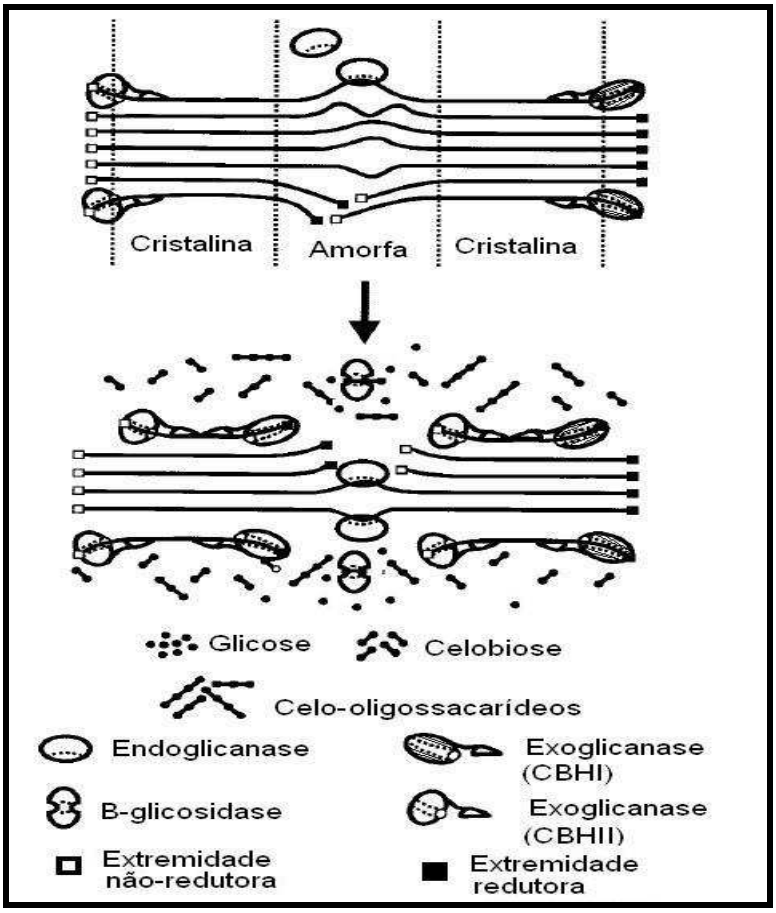


Figura 11. O modelo de sinergia das endoglicanases e celobiohidrolase / exocellulases durante a hidrólise da celulose. Neste modelo, as endoglicanases fazem cortes internos na parte amorfa das microfibrilas celulose e, assim, fornecem novas cadeias terminais para as exoglicanases hidrolisar a celulose.

1.3.2. **Xilanases**

Devido à heterogeneidade da xilana, sua hidrólise requer a ação de um complexo sistema enzimático, composto por enzimas como: β-xilosidases, endoxilanases, α-arabinofuranosidases, α-glucuronidases, acetil-xilana esterases, ácido fenólico esterases e p-cumárico esterases. Todas estas enzimas atuam cooperativamente para converter a xilana em unidades de xilose (SUNNA & ANTRNIKIAN, 1997)

As endoxilanases formam o maior grupo de enzimas hidrolíticas envolvidas na degradação da xilana e hidrolisam as ligações glicosídicas do tipo β-1,4 dentro da cadeia de xilana, produzindo xilo-oligossacarídeos, os quais sãoconvertidos em xilose pela β-D-xilosidase (BIELY et al, 1985).

As endo-β-D xilanases (1,4- β-D-xilana xilanohidrolase, EC 3.2.1.8) que agem aleatoriamente na cadeia principal de xilana para produzir xilooligossacarídeos de vários tamanhos, são subdivididas em quatro tipos: endoxilanases que atuão nos resíduos L-

arabinofuranosídeos e produzem somente xilobioses e xilose como produtos finais; endoxilanases que podem hidrolisar a cadeia principal de xilana nos pontos de ramificação produzindo principalmente xilobiose, xilose e arabinose e endoxilanases que atuam nos pontos de ramificação e produzem arabinose e xiloologossacarídeos de tamanhos intermediários. A atividade das endoxilanases contribui para a atuação de outras enzimas do complexo xilanolítico, pois a presença de grandes quantidades de substituintes dificulta a formação do complexo enzima-substrato (FERREIRA, 2004).

1.4. APLICAÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE XILANASES E CELULASES

As hidrolases compreendem aproximadamente 75% do total de enzimas comercializadas, incluindo celulases, amilases e hemicelulases, constituindo o segundo maior grupo, após as proteases. As endoxilanases constituem as principais hemicelulases comerciais, atraindo atenção devido ao seu potencial para uso em diversas aplicações, cobrindo os três setores do mercado de enzimas industriais: têxtil, alimentício e rações para animais. Outras aplicações menos documentadas incluem: fermentação da cerveja; na extração de café e na preparação de café solúvel; em detergentes; na produção de polissacarídeos farmacologicamente ativos para o uso como agentes antimicrobianos ou antioxidantes (MELO, 2010).

Enzimas xilanolíticas de microrganismos têm atraído grande atenção nas ultimas décadas, particularmente, por causa do seu uso biotecnológico em vários processos industriais, tais como alimentos, indústria de polpa de celulose e papel, combustíveis líquidos e gasosos, solventes, xaropes e açúcar (FERREIRA, 2004).

A utilização de enzimas em rações animais é um setor de relevante importância no agronegócio, sendo que as xilanases usadas juntamente com glicanases, pectinases, celulases, proteases, amilases, fitases, galactosidases e lipases degradam a porção de arabinoxilana presente na reação, reduzindo a viscosidade do material bruto e aumentando a digestibilidade da ração (POLIZELI et al., 2005)

Na indústria têxtil, as xilanases livre de celulases, podem ser utilizadas nos processos de maceração do linho, da juta e do sisal e refinamento de polpa para a produção de tecido como a viscose. Nestes processos as enzimas são usadas com o objetivo de facilitar a separação das fibras de celulose da matriz celular e remoção da lignina (MILAGRES & PRADE, 1994).

Uma das principais aplicações das endoxilanases é na indústria de papel e de celulose na etapa de branqueamento da polpa da celulose para a produção de papel (NADIA, 2010). A aplicação de xilanases em uma etapa anterior ao branqueamento convencional consiste na hidrólise da xilana, facilitando a remoção da lignina que se encontra ligada a ela através da desestruturação e rompimento das ligações físico-químicas (POLIZELI et al., 2005).

As xilanases, também, são usadas na extração de café, formulação de detergentes e na produção de polissacarídeos com atividade farmacológica para o uso como agentes antimicrobianos e/ou antioxidantes (COLLINS et al., 2005).

As celulases são utilizadas na fabricação de detergentes, na indústria têxtil para descoramento, amaciamento e bioestonagem, indústria de extração de óleos vegetais e na alimentação animal como aditivo para silagem e em dietas para monogástricos. Nestas dietas, a celulase, em associação com a xilanase, valoriza cereais ricos em polissacarídeos não amídicos e ainda diminuem problemas de sua administração a estes animais (DILLON, 2004).

As principais aplicações industriais de celulases estão na indústria de tecidos, onde são empregadas nas fases de fiação, tingimento e acabamento do tecido, bem como em detergentes domésticos para lavanderia para melhorar a maciez e brilho do tecido. Além disso, são usadas em rações animais para melhorar a qualidade nutricional e digestibilidade, no processamento de sucos de frutas, e na cozinha, enquanto tinta de papel é mais um aplicativo emergente. Uma área desafiadora, onde as celulases teria um papel central é a boconversão de biomassa celulósica renovável em produtos químicos (IBRAHIM et al., 2007).

Pela finalidade dada ao bagaço de cana-de-açúcar no processo de produção do etanol, por ser um produto descartado nas indústrias de sacarificação e por possuir bons nutrientes para o desenvolvimento de microrganismos, objetiva-se, então, isolar microrganismos específicos para o substrato. Como em geral a eficiência dos microrganismos no processo de hidrólise está na dependência, não somente das condições de cultivo, mas também do substrato utilizado, viu-se nessa fibra a capacidade potencial para isolar enzimas mais efetivas na sua própria hidrólise.

Assim, o presente trabalho iniciou-se como resposta à necessidade de pesquisa tecnológica relacionada com o elevado custo das enzimas celulases e xilanases, um dos maiores obstáculos para a efetiva inclusão do etanol celulósico na matriz energética mundial. Como estratégia, visando à economicidade do processo, adotou-se a alternativa da

fermentação em estado líquido como tecnologia para a produção enzimática e a utilização de resíduos lignocelulósicos como fonte de carbono e suporte para o microrganismo fermentativo produzir seu complexo enzimático, posteriormente a utilização deste complexo no processo de hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar.

O presente trabalho visou a prospecção de novos microrganismos produtores de celulases e xilanases. Buscou-se o isolamento de novos Actinomicetos, visto que estes têm sido descritos na literatura cientifica como bons produtores das enzimas desejadas.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Isolamento de microorganismos capazes de hidrolisar biomassa lignocelulolítica. Estudar a produção e caracterizar as de celulases e xilanases destes microoganismos quando cultivados em meio contendo resíduos agroindustriais.

2.2. Objetivos Específicos

- Obtenção de isolados de *Streptomyces sp* a partir do bagaço de cana-de-açúcar;
- Seleção dos isolados de *Streptomyces sp* produtores de celulases termoestáveis;
- Cultivar o isolado escolhido em meio contendo diferentes fontes de carbono visando obter a maior produção de enzimas celulolíticas;
- Analisar a cinética de produção e secreção de Avicelases, CMCases, FPases e Xilanases;
- Analisar o perfil de celulases e xilanases secretadas;
- Avaliar a eficiência da sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar quando hidrolisado com o extrato enzimático obtido.

3. MATERIAIS

3.1. LINHAGEM DA BACTÉRIA *Streptomyces sp.*

A linhagem da bactéria *Streptomyces sp*. utilizada no presente trabalho foi isolada do bagaço de cana-de-açúcar seco de usinas do estado de GO cedido pelo Prof. Dr. Américo José dos Santos Reis, da Escola de Agronomia da Universidade Federal de Goiás e estocado no laboratório de biotecnologia de fungos da Universidade Federal de Goiás- UFG.

3.2. SUBSTRATOS LIGNOCELULÓSICOS

Para a produção de enzimas, a bactéria *Streptomyces sp*. foi cultivada em meio MM suplementado com os seguintes substratos lignocelulósicos: bagaço de cana-de-açúcar (BCA),carboximetilcelulose (CMC) e farelo de trigo (FT). O BCA e o FT, cedidos pela Profª Drª Fabrícia Paula de Faria, do laboratório de biotecnologia de fungos da UFG, foram lavado, seco e moído em moinho de facas com granulometria de 20 mesh.

3.3. MEIOS DE CULTURA

As soluções foram preparadas com água bidestilada e quando necessário foram esterilizadas por autoclavagem (125°C, 1,3 atm e 15 min) ou filtração em membrana com poros de 0,2 µm (Millipore®). As soluções foram agrupadas de acordo com a metodologia na qual foram empregadas.

3.3.1. Meio Mínimo (CARVALHO, 2003)

KH_2PO_4	9,000 g/L
K_2HPO_4	1,500 g/L
$MgSO_4.7H_2O$	0,200 g/L
$CaCl_2$	0,050 g/L
$MnSO_4.7H_2O$	0,010 g/L
$ZnSO_4.7H_2O$	0,001 g/L

pH 7.0

3.3.2. Meio Mínimo (NASCIMENTO et al., 2008)

$FeCl_3$ (0,03%)	1,000 mL
$CaCl_2.2H_2O$	0,050 g/L
$MgSO_4.7H_2O$	0,100 g/L
NaCl	0,010 g/L
KCl	0,010 g/L
NH_4Cl	0,300 g/L
H_3PO_4 (85%)	1,800 g/L
EL	0,070 g/L

1,000 mL de solução traço:

$MnSO_4$	2,200 g/L
$ZnSO_4$	0,500 g/L
H_3BO_3	0,500 g/L
$CuSO_4$	0,016 g/L
Na_2MoO_4	0,025 g/L
$CoCl_2.6H_2O$	0,046 g/L
Ágar	7,200 g/L

pH 7,0

3.4. SUBSTRATOS PARA DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS

Na dosagem da atividade xilanolítica foi utilizada a xilana “oat-spelt” (xilana extraída de aveia - Sigma®). Na dosagem da atividade celulolítica foram utilizados os seguintes substratos: celulose-micro-cristalina (CMC de baixa viscosidade - Sigma®), celulose semi-cristalina (Avicel – Sigmacell - Sigma®) e papel de filtro Whatman nº 1.

3.5. SOLUÇÕES

As soluções foram preparadas com água bidestilada e quando necessário foram esterilizadas por autoclavação (120°C, 1,3 atm, 15 min). As soluções foram agrupadas de acordo com metodologia na qual foram empregadas.

3.5.1. Solução para determinação da atividade enzimática

3.5.1.1. Solução de Ácido Dinitrosalicílico –DNS

Ácido 3,5-Dinitrosalicílico	0,75% (p/v)
NaOH	1,40% (p/v)
Tartarato de Sódio e Potássio	21,60% (p/v)
Fenol	0,54% (p/v)
Metabissulfito de Sódio	0,58% (p/v)

Inicialmente, o DNS e o NaOH foram dissolvidos em água bidestilada. Posteriormente adicionou-se o tertarato de sódio e potássio, o fenol aquecido a 50°C e o metabissulfito de sódio. A solução final foi titulada com HCl 0,1M utilizando fenolftaleína como indicador.

3.5.1.2. Tampão Citrato de Sódio 0,05M

Ácido cítrico	50mM
Citrato de sódio	50mM

3.5.1.3. Tampão Fosfato de Sódio 0,05M

Fosfato de sódio monobásico	50mM
Fosfato de sódio dibásico	50mM

3.5.1.4. Tampão Tris-HCl

Tris-HCl	50mM

HCl 50mM

3.5.1.5. Tampão Glicina

Glicina 50mM

NaOH 50mM

Uma solução é adicionada na outra até atingir o pH desejável.

3.5.1.6. Solução de Xilana “oat-spelt” 1% (p/v)

A xilana “oat-spelt” foi dissolvida em tampão citrato de sódio 50mM pH 4,8 após aquecimento da solução em microondas durante 1min, agitação manual e repouso durante 1 min. Este procedimento foi repetido três vezes e após, a solução foi submetida a centrifugação a 11.000 g durante 10 min. O sobrenadante foi estocado a -20°C e utilizado para a dosagem da atividade enzimática.

3.5.1.7. Solução de Carboximetilcelulose (CMC)

CMC 4,0% (p/v)

A solução foi preparada em tampão citrato de sódio 50mM pH 4,8, sendo aquecida no microondas até solubilização completa do soluto.

3.5.1.8. Solução de Avicel

Avicel 1,0% (p/v)

A solução foi preparada, no momento do uso, com água destilada sob agitação.

3.5.2. Soluções para Eletroforese de Proteínas em Gel Desnaturante de Poliacrilamida (SDS-PAGE)

3.5.2.1. Acrilamida: Bis-acrilamida (39:1)

Acrilamida	39,0% (p/v)
Bis-acrilamida	1,0% (p/v)

A solução foi filtrada em papel filtro e estocada ao abrigo da luz a 4°C.

3.5.2.2. Tampão de Amostra (2x)

Tris-HCl pH 6,8	0,2M
SDS	4,0% (v/v)
β-mercaptoetanol	4,0% (v/v)
Glicerol	0,4% (v/v)
Azul de bromofenol	0,1% (p/v)

3.5.2.3. Tampão de Corrida – Tris-Glicina (5x)

Trizma-base	1,51% (p/v)
Glicina	7,20% (p/v)

No momento do uso, foi adicionado SDS para a concentração final de 0,1% (p/v).

3.5.3. **Revelação das Proteínas por Coloração com Azul de Coomassie**

3.5.3.1. Solução Corante

Azul de Coomassie (R-250)	0,1% (p/v)
Metanol	45,0% (p/v)
Ácido Acético Glacial	10,0% (p/v)
Água Destilada (q.s.p.)	

3.5.3.2. Solução Descorante

Metanol	30% (v/v)

Ácido Acético Glacial 7% (v/v)

Água destilada (q.s.p.)

3.5.4. **Solução para o Zimograma para xilanase e celulase**

3.5.4.1. Solução de Xilana "oat-splet"

A solução de xilana a 2% foi preparada em água bidestilada.

3.5.4.2. Tampão MES (Ácido 2 – [N-Morfolino] etanosulfônico)

MÊS (USB®) 50mM

pH 6.0

A solução foi preparada no momento do uso com água bidestilada.

3.5.5. Revelação das Proteínas por Coloração com Azul de Coomassie

3.5.5.1. Solução Corante

Azul de Coomassie (R- 250) 0,1% (p/v)

Metanol 45,0% (p/v)

Ácido Acético Glacial 10,0% (p/v)

Água destilada (q.s.p)

3.5.5.2. Solução Descorante

Metanol 30% (v/v)

Ácido Acético Glacial 7% (v/v)

Água destilada (q.s.p)

3.5.5.3. Marcador de massa molecular para proteínas

Foram utilizadas proteínas de massa molecular conhecidas (GE):

97 KDa – Fosforilase b

66 KDa – Albumina

45 KDa – Ovalbunima

30 KDa - Anidrase carbônica

20.1 KDa – Inibidor de tripsina

14,4 KDa – α-Lactoalbunima

3.6. Cromatografia de Camada Delgada

3.6.1. **Fase fixa**

Placa de sílica-gel (DC-Fertigfolien ALUGRAM® Xtra SIL G/UV_{254})

3.6.2. **Fase móvel**

Butanol	4 (p/v)
Metanol	2 (p/v)
Água	1 (p/v)

3.6.3. **Solução Reveladora**

Ácido fosfórico (85%)	7,5 mL
Anilina	1,0 mL
Difenilamina	1,0 g
Acetona	50,0 mL

4. MÉTODOS

4.1. Obtenção de isolados de *Streptomyces sp* a partir de BCA.

Para a obtenção dos isolados, 50 g de BCA foram homogeneizados com 450 mL de solução salina 0,9% sob agitação mecânica em vórtex. A mistura foi submetida à centrifugação (3.000 g, 10 min) e o sobrenadante foi diluído sereadamente até $1x10^{-9}$, em solução salina, plaqueado em meio mínimo suplementado com CMC 0,5% (SANCHEZ et al., 2009) e incubado a 45°C por 4 dias.

4.2. Seleção em placa dos isolados produtores de celulases.

Os isolados obtidos foram selecionados de acordo com a atividade enzimática determinada pelo teste de atividade em placa de acordo com o protocolo descrito a seguir: os isolados foram inoculados em placas contendo meio mínimo, suplementado com 0,5% de CMC (Sigma) e incubados a 45°C por 4 dias.

Para a revelação dos halos de atividade, foi adicionada a solução de vermelho Congo a 0,1% e as placas foram agitadas suavemente durante 10 min. Então, a solução de vermelho Congo foi descartada, as placas lavadas com solução de NaCl 1 M até o aparecimento dos halos, posteriormente adicionou solução de HCl 0,1 M sobre a solução de NaCl para melhor visualização dos halos. A atividade enzimática foi visualizada como um halo claro ao redor da cultura (CHELAPANDI & HIMANSHU, 2008). Para avaliar o melhor produtor de celulases foi mensurado o índice de produção de celulases (IPC), o diâmetro do halo de hidrólise foi dividido pelo diâmetro da colônia.

4.3. Análise da produção de CMCases, FPases, Avicelases e Xilanases pelos isolados cultivados em resíduos lignocelulósicos

Esporos (10^6 mL^{-1}) dos isolados selecionados pelo protocolo de atividade em placa foram inoculados em meio mínimo (MM) suplementado com 0,5% de CMC, 0,5% BCA ou 0,5% FT e mantidos a 45°C por 144 h sob constante agitação de 180 rpm. Após 144 h de cultivo, a cultura foi submetida à centrifugação (3.000 g por 15 min) e o sobrenadante de cultura foi analisado quanto à atividade de CMCase.

Esporos ($10^6.mL^{-1}$) do isolado que produziu maiores níveis de CMCase foram inoculados em Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de MM suplementado com 0,5% de FT e mantidos a 45°C por 12 dias sob agitação constante de 180 rpm. Amostras foram coletadas a cada 24 h e analisadas quanto a atividade de Avicelase, CMCase, FPase e Xilanase.

4.4. Determinação das Atividades Xilanolítica e Celulolítica pelo Método dos Açúcares Redutores (MILLER, 1959).

As atividades enzimáticas de xilanase, celulase total (FPase), endoglicanase (CMCase), exoglicanase (CBH), foram avaliadas segundo metodologia proposta por Miller (1959), Ghose (1987) e Adney e Baker (1996). A quantificação do teor de açúcares redutores liberados foi ensaiada pelo método do ADNS e os substratos utilizados foram: xilana "oat spelt, papel de filtro, CMC e avicel respectivamente. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como aquela que libera um µmol do açúcar redutor correspondente por min nas condições do experimento. Os ensaios de atividade enzimática da primeira bateria de experimentos foram realizados em triplicata.

4.4.1 Determinação da Atividade Xilanolítica

Este ensaio foi realizado utilizando-se como substrato a solução de xilana "oat spelt" 1% (p/v). Adicionou-se 50 µL da amostra em 450 µL do substrato seguindo-se incubação a 50 ºC por 5 min. A quantificação do teor de açúcares redutores liberados foi ensaiada pelo método do DNS, foi adicionado 750 µL de DNS, as amostras foram fervidas por 5 min e realizada a leitura espectrofotométrica a 540 nm. Os resultados foram expressos em unidades enzimáticas, definidas como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 µmol de açúcar redutor por minuto nas condições do experimento. Para a determinação da atividade de xilanase pelo método de DNS, primeiramente foi realizada uma curva padrão de xilose nas concentrações de 0,3 a 4,2 mg/mL.

4.4.2. Determinação da Atividade Celulolítica

4.4.2.1. FPase

Expressa a atividade de celulase total, utilizando papel de filtro Whatman nº 1 (1 cm x 6 cm – 50 mg) como substrato.

A atividade de FPase foi determinada homogeneizando-se 500 µL de amostra, 500 µL de tampão citrato pH 4.8 e uma tira de papel de filtro (1x6 cm). A solução foi mantida a 50ºC por 1 h e, em seguida, a reação foi interrompida em banho de água fria. A quantificação do teor de açúcares redutores liberados foi ensaiada pelo método do DNS, foi adicionado 500 µL de DNS, as amostras foram fervidas por 5 min e realizada a leitura espectrofotométrica a 540 nm.

4.4.2.2. CMCase

Expressa a atividade de endoglicanase, utilizando CMC 1% como substrato.

A atividade de CMCase foi determinada homogeneizando-se 250 µL de amostra e 250 µL da solução de CMC 4%. A solução foi mantida a 50 ºC por 1 h e em seguida, a reação foi interrompida em banho de água fria. A quantificação do teor de açúcares redutores liberados foi ensaiada pelo método do DNS, foi adicionado 500 µL de DNS, as amostras foram fervidas por 5 min e realizada a leitura espectrofotométrica a 540 nm.

4.4.2.3. Avicelase

Expressa a atividade de exoglicanase, utilizando avicel 1 % como substrato.

A atividade de Avicelase foi determinada homogeneizando-se 250 µL de amostra e 500 µL da solução de Avicel 1%. A solução foi mantida a 50 ºC por 1 h sob agitação constante e, em seguida, a reação foi interrompida em banho de água fria. Em seguida, a solução foi submetida a centrifugação a 11.200 g durante 10 min a 4°C. Para a quantificação do teor de açúcares redutores liberados, 250 µL do sobrenadante foram homogeneizados com 700 µL de ADNS, as amostras foram fervidas por 5 min e realizada a leitura espectrofotométrica a 540 nm.

4.4.2.4. Curva padrão

A curva padrão para os testes de FPase e CMCase foi estabelecida utilizando-se glicose nas concentrações de 1-20 µmoles/mL. A curva padrão para o teste de Avicelase

foram estabelecida utilizando glicose nas concentrações de 0,15 a 1,5 mg/mL. As leituras foram utilizadas para fazer um gráfico (Absorbância X Concentração de glicose). Obtendo-se assim a equação da reta que foi utilizada nos cálculos de atividade enzimática.

4.4.3. Dosagem protéica

A concentração de proteínas das amostras foi determinada por método colorimétrico conforme descrito por Bradford (1976). A curva de calibração padrão foi determinada utilizando Albumina Sérica Bovina (BSA-Sigma®). Neste método, 100 µL de amostra foram homogeneizado com 1 mL de Reagente de Bradford e, após incubação a temperatura ambiente por 15 min, a quantidade de proteína foi determinada por leitura de absorbância em espectrofotômetro no comprimento de onda de 595 nm.

4.4.4. Dosagem da protease total

A dosagem de protease foi expressa utilizando azocaseína 0,25% como substrato.

O ensaio de protease foi determinado homogeneizando-se 20 µL de amostra, 40 µL do substrato (azocaseína 0,25%) e 40 µL de tampão Tris HCl p H 8,5 (50mM). A solução foi mantida a 37 ºC por 30 min. Posteriormente foi adicionado 100 µL de TCA 10% e a solução foi incubada a 4 °C por 10 min. Em seguida, a solução foi submetida a centrifugação a 2500 g durante 20 min a 4°C, posteriormente transferiu-se 100 mL para placa de Elisa e adicinou-se 100 µL de NaOH (0,1M). A quantidade de protease foi determinada por leitura de absorbância no comprimento de onda de 450 nm.

4.5. Caracterização bioquímica de um conjunto de enzimas extracelulares.

O sobrenadante do meio de cultura foi utilizado como fonte de enzimas. A influência da temperatura sobre as atividades de Avicelase, CMCase, FPase e Xilanase foi determinada realizando-se os ensaios enzimáticos na faixa de temperatura entre 20 º C a 100 º C em pH 4,8.

A influência do pH sobre a atividade de Avicelase, CMCase, FPase e Xilanase foi determinada realizando-se os ensaios enzimáticos na faixa de pH de 3,0-7,0, com os seguintes tampões (0,05 $molL^{-1}$) incubados a 45ºC: Citrato de sódio 3,0-6,0; Fosfato de sódio 7,0 e 8,0; Tris-HCl 9,0 e Glicina-NaOH 10,0 .

Para o estudo da termoestabilidade das enzimas, o sobrenadante do meio de cultura foi pré-incubado a 50°C e 60º C por 0,5, 1, 2, 3, 4, 6 e 8 h. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados expressos em valores médios.

A influência de íons metálicos nas atividades de Avicelase, CMCase, FPase e Xilanase foi avaliada. Os ensaios foram realizados nas melhores condições de cada atividade, sendo adicionandos aos ensaios cloretos dos íons (alumínio, bário, cálcio, potássio, magnésio, sódio, manganês e amônia) para uma concentração final de 10 mM. A influência do EDTA também foi analisada nas mesmas condições.

4.6. Zimograma.

Para as análises de Zimograma, as amostras foram dialisadas por 24 h contra água, liofilizadas e aplicadas (0,5 U) em gel desnaturante contendo 10% de poliacrilamida. Para a atividade de CMCase adicionou-se ao gel 0,2%(p/v) de CMC (Sigma) e para a atividade de xilanase 0,1% (p/v) de xilana oat spelt (Sigma). Após a corrida, os géis foram incubados por 1 hora em triton X-100 a 1% em temperatura ambiente. Para a atividade de xilanase, os géis foram incubados por 1 h em triton X-100 a 2,5% em temperatura ambiente. Incubou-se por 12 horas a 50°C em tampão citrato de sódio 50 mM (pH 4,8) para a atividade de CMCase e por 2 horas a 50°C em tampão MÊS 50 mM (pH 6,0) para a atividade de Xilanase, sendo os géis submersos em solução de 0,1% de Vermelho Congo por 20 min. Os géis foram lavados com NaCl 1M até a visualização de bandas de atividade. Para determinação da massa molecular foi utilizado marcador de massa molecular sendo o gel corado utilizando o método de coloração de prata (BLUM, 1999).

4.7. Pré-tratamento do BCA

Os ensaios de sacarificação enzimática foram realizados utilizando BCA pré-tratado por explosão a vapor, o BCA cedido pela profª Drª. Fabrícia Faria de Paula do laboratório de biotecnologia de fungos foi exposto à uma temperatura de 180°C durante 5 minutos.

4.8. Hidrólise enzimática do BCA pré-tratado.

As reações de hidrólise enzimática da fração de hemicelulose do BCA foram realizadas utilizando o sobrenadante de cultura do *Streptomyces sp.* cultivado em FT

suplementado com a β-glicosidade do fungo *Aspergillus niger* cedido pelo aluno (Douglas E.P. Pereira) de mestrado da Profª Fabrícia Faria de Paula da UFG.

As reações de hidrólise foram realizadas em Erlenmeyer de 125 mL contendo BCA pré-tratado a 2 % e tampão citrato de sódio 50 mM, pH 5 para um volume final de 10 mL.

4.8.1. Reação I

A reação I foi mantida a 50 ºC por 48 h sob constante agitação de 120 rpm, todos os extratos enzimáticos foram adicionadas no início da reação. Após esse período a amostra foi filtrada sob pressão em papel de filtro, sendo o filtrado analisado quanto à concentração de açúcar redutor e glicose.

4.8.2. Reação II

A reação II foi mantida a 70 ºC por 2 h e posteriormente a 50°C por 46 h sob constante agitação de 120 rpm. Durante as 2 h iniciais da reação somente o sobrenadante de cultura contendo maior atividade para CMCase foi adicionado, posteriormente o sobrenadante contendo maior atividade de Xilanase e o sobrenadante contendo β-glicosidade foram adicionados. Após esse período a amostra foi filtrada sob pressão em papel de filtro, sendo o filtrado analisado quanto a concentração de açúcar redutor e glicose.

Para a determinação da concentração de xilose liberada nas reações de hidrólise enzimática, o valor de glicose foi subtraído do valor de açúcar redutor. Para o cálculo do rendimento de hidrólise enzimática da fração de xilana residual no BCA pré-tratado por explosão a vapor considerou-se os valores teóricos de 6 a 8 % (KOVACS *et al*., 2009).

4.8.3. Dosagem de açúcar redutor e glicose

A quantificação do teor de açúcar redutor foi ensaiada pelo método do ADNS incubando-se 50 µL da amostra, 450 µL de tampão citrato de sódio (pH 4,8 50 mM,) e 750 µL de ADNS, sendo a reação fervida por 5 min e realizada a leitura espectrofotométrica a 540 nm. Para a determinação do teor de açúcar redutor, primeiramente foi realizada uma curva padrão de concentração de xilose variando entre 0,3 a 4,2 mg/mL e de acordo com esta as absorbâncias foram convertidas em mg/mL de açúcar redutor liberados.

O teor de glicose nas amostras foi determinado utilizando o kit de glicose oxidase (DOLES Reagentes ®) seguindo as orientações do fabricante.

4.9. Cromatografia de Camada Delgada

Cromatografia de camada delgada foi realizada em placa de sílica-gel (DC-Fertigfolien ALUGRAM® Xtra SIL G/UV_{254}); 2,5 μL de glicose (1%), celobiose (1%) e xilose (1%) foram utilizados como marcadores, 10 μL das reações I e II foram adicionados para análise dos produtos formados. Para leitura, a placa foi vaporizada com a solução reveladora e submetida à secagem em estufa a 100°C até a total visibilidade de bandas.

4.10. Análise Filogenética

A identificação filogenética foi feita utilizando o método taxonômico molecular baseado na sequencia do gene 16S rDNA. O gene 16S rDNA foi amplificado utilizando-se o oliginucleotídeos universais 27F (5′ AGA GTT TGA TCG TGG CTC AG 3′) e 1492R (3′ GGT TAC CTT GTT ACG ACT T 5′), o produto da reação de PCR foi precipitado e submetido a sequenciamento pelo método de Sanger.

A sequência obtida foi utilizada para fazer uma busca por homologia no GenBank utilizando-se a ferramenta BLAST. As sequências que apresentaram maior similaridade foram alinhadas utilizando o programa Clustal X. O resultado do alinhamento foi utilizado para fazer uma análise filogenética utilizando o programa PAUP 10B.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Obtenção dos isolados.

Com o objetivo de isolar microrganismos capazes de hidrolisar resíduos agroindustriais, realizamos a seleção de bactérias celulolíticas previamente associadas com BCA seco. Uma vez que enzimas termoestáveis são úteis na produção de etanol, optou-se por trabalhar com uma temperatura mais elevada para permitir o isolamento de bactérias termofílicas.

Os microrganismos que estavam previamente associados ao BCA foram obtidos após lavagem do BCA com solução salina, com posterior plaqueamento em meio mínimo contendo CMC. Foram obtidos 13 isolados com atividade celulolítica. Após observação das características morfológicas concluiu-se que se tratava de quatro isolados de aspectos distintos: 3, 4, 7 e 12.

Os quatro isolados apresentavam morfologia típica de *Streptomyces* (aspecto da colônia, a produção de esporos e a produção de agarase). Os isolados foram plaqueados em MM suplementado com CMC 0,5% e incubados a 45°C por 4 dias. Após incubação a placa foi corada com vermelho congo para observação dos halos de hidrólise (Figura 12). O isolado 3 (I3) apresentou índice de produção de celulases (IPC) igual a 3,5, o isolado 4 (I4) apresentou IPC igual a 2,3, o isolado 7 (I7) apresentou IPC igual a 4,5, enquanto o isolado 12 (I12) apresentou IPC igual a 2,6. Diante destes resultados, os isolados 3, 7 e 12 foram selecionados para a análise de produção de celulases por fermentação submersa.

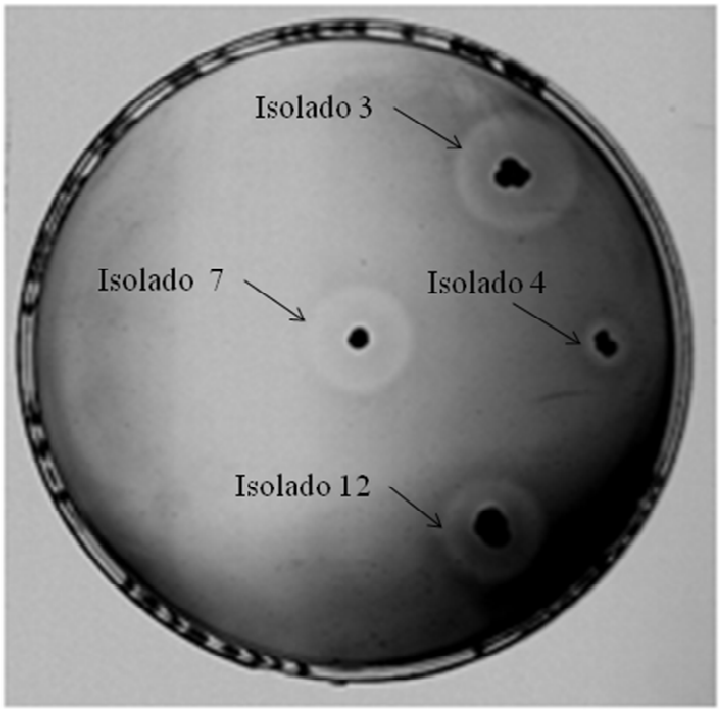


Figura 12. Experimento de atividade em placa. Os isolados 3, 4, 7 e 12 foram cultivados em MM com 0,5% de CMC, e os halos de hidrólise revelados após coloração com vermelho congo.

5.2. Escolha do isolado e do meio de cultura para obtenção da maior produção de celulases e xilanases.

A literatura científica relata que a produção de celulases e xilanases é influenciada pela constituição do meio de cultura. Vários autores mostraram que o tipo de fonte de carbono, bem como a concentração, influencia na produção de celulases por diferentes microrganismos (VINHA et al., 2011; NADIA et al., 2010; LIMA et al., 2005; CHELLAPANDI & HIMANSHU, 2008; MELO, 2010; e MERYANDINI et al., 2006).

Para a análise do melhor produtor de celulases, os isolados foram cultivados em diferentes resíduos lignocelulósicos por fermentação submersa. Os três isolados selecionados foram cultivados em MM contendo BCA, CMC ou FT. Após 4 dias, o sobrenadante de cultura foi analisado pela determinação das atividades de Avicelase, CMCase, FPase e Xilanase.

A figura 13 mostra a atividade enzimática produzida pelos isolados testados. O I3 apresentou os maiores níveis de atividade enzimática quando cultivado nas fontes de carbono testadas. A maior produção de celulases e xilanases foi obtida pelo cultivo do I3 em FT, seguido de CMC e BCA.

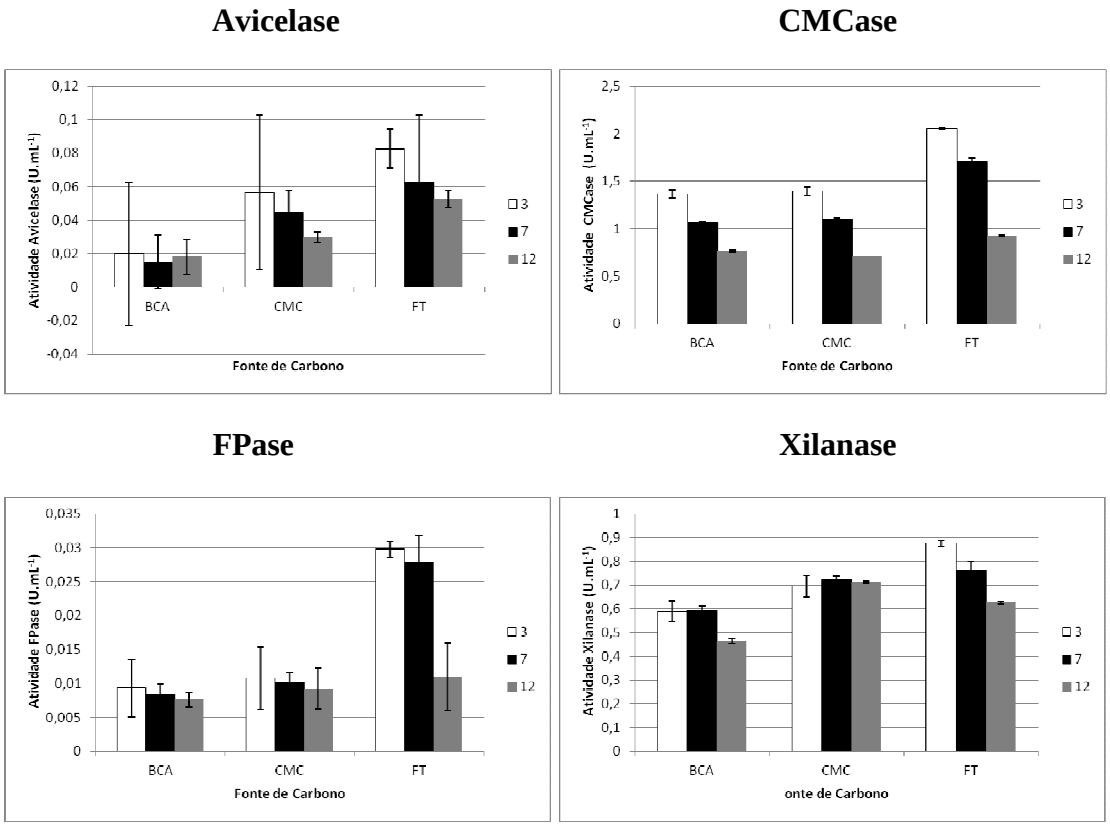


Figura 13. Produção de celulases e xilanases pelos isolados I3, I7 e I12 cultivados em diferentes fontes de carbono. Os isolados foram cultivados durante 6 dias, a 45°C a 120 rpm, em MMi suplementado com 0,5% de BCA, CMC e FT.

Várias fontes de carbono foram utilizadas em estudos envolvendo a produção de celulases. Alguns estudos mostraram que a maior produção de celulases foi obtida quando o FT foi utilizado como fonte de carbono pela bactéria *Streptomyces sp* (NASCIMENTO *et al* 2008; VINHA *et al.*, 2011) *S. viridobrunneus* (VINHA *et al* 2011). O mesmo ocorreu na produção de celulases por *S. drozdowiczii* (LIMA *et al* 2005). Estes resultados demonstram a importância de se avaliar a fonte de carbono na produção de enzimas, especialmente celulases.

No estudo realizado por Nadia et al. (2010) a produção de xilanase foi analisada em cultura de *S. lividans* em MM suplementado com FT ou caldo de milho. No estudo do *Streptomyces spp.* SKK1-8 foi crescido em meio contendo xilana (MERYANDINI et al., 2006), a mesma fonte utilizada por Nascimento et al. (2003) no cultivo do *S. malaysiensis*.

5.3. Cinética da produção de celulases e xilanases pelo I3

Para estudar a influência do tempo de cultivo na produção de celulases e xilanases pelo I3 cultivado em FT, este foi crescido em MM com 0,5% de FT por 12 dias a 45°C, sob agitação constante de 120 rpm. A produção das celulases e xilanases foi avaliada no sobrenadante de cultura a cada 24 h.

A produção da Avicelase apresentou dois picos de atividade, após o 2º e 11º dias de cultivo, sendo a maior produção de Avicelase observado após 11 dias (5,646 UmL^{-1}) (Figura 14).

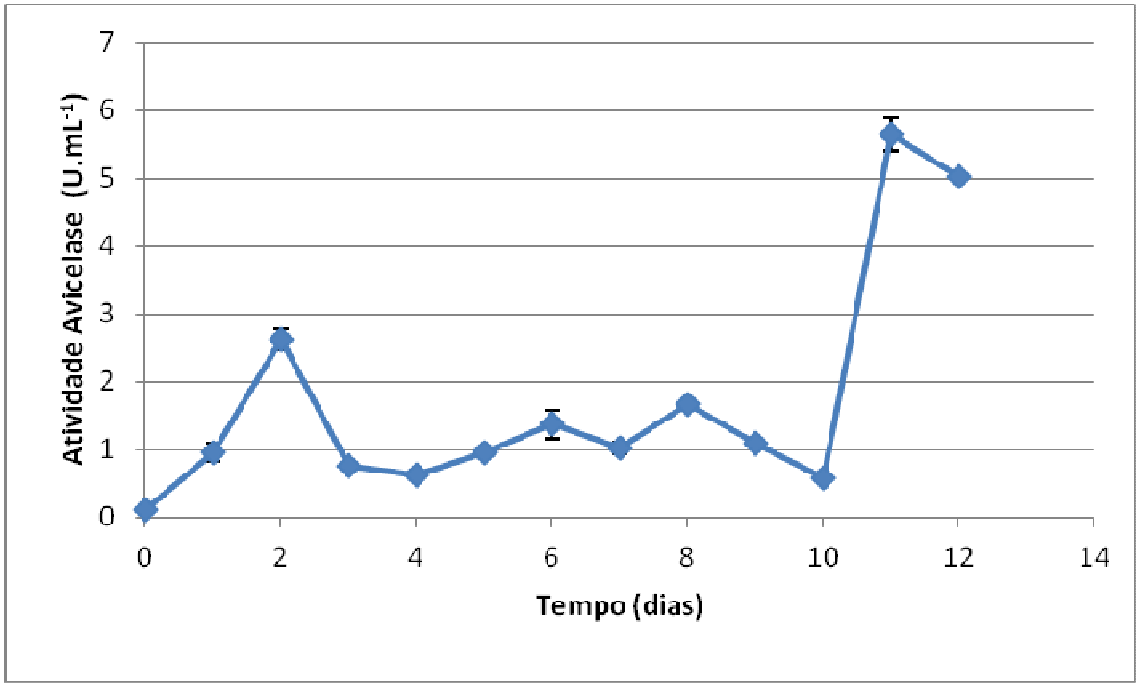


Figura 14. Cinética de produção de celulase avaliada pelo ensaio de Avicelase (tampão citrato de sódio pH 4.8 a 50°C) pelo isolado I3 crescido em MMi suplementado com 0.5% FT, a 45 °C por 12 dias sob constante agitação de 120 rpm.

A produção da CMCase apresentou dois picos de atividade, após 6º e 10º dias de cultivo, sendo a maior atividade de CMCase observada no sexto dia (3,872 UmL^{-1}) (Figura 15).

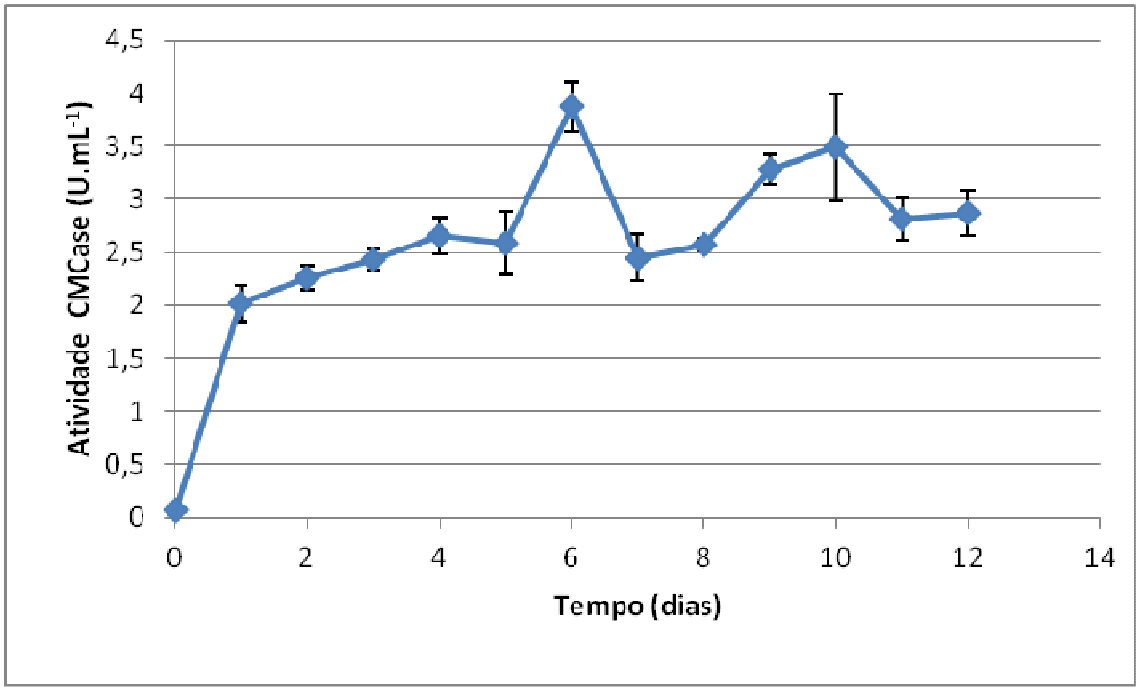


Figura 15. Cinética de produção de celulase avaliada pelo ensaio de CMCase (tampão citrato de sódio pH 4.8 a 50°C) pelo isolado I3 crescido em MMi suplementado com 0.5% FT, a 45 °C por 12 dias em constante agitação de 120 rpm.

A produção de FPase foi maior após o sétimo dia de incubação (0,0947 $U.mL^{-1}$) (Figura 16). Essa característica é semelhante ao pico de atividade da CMCase (fig 12). Os ensaios de celulases (Avicelase, CMCase e FPase) apresentam picos de atividade em diferentes dias o que sugere que o sobrenadante de cultura do I3 apresenta mais de uma celulase.

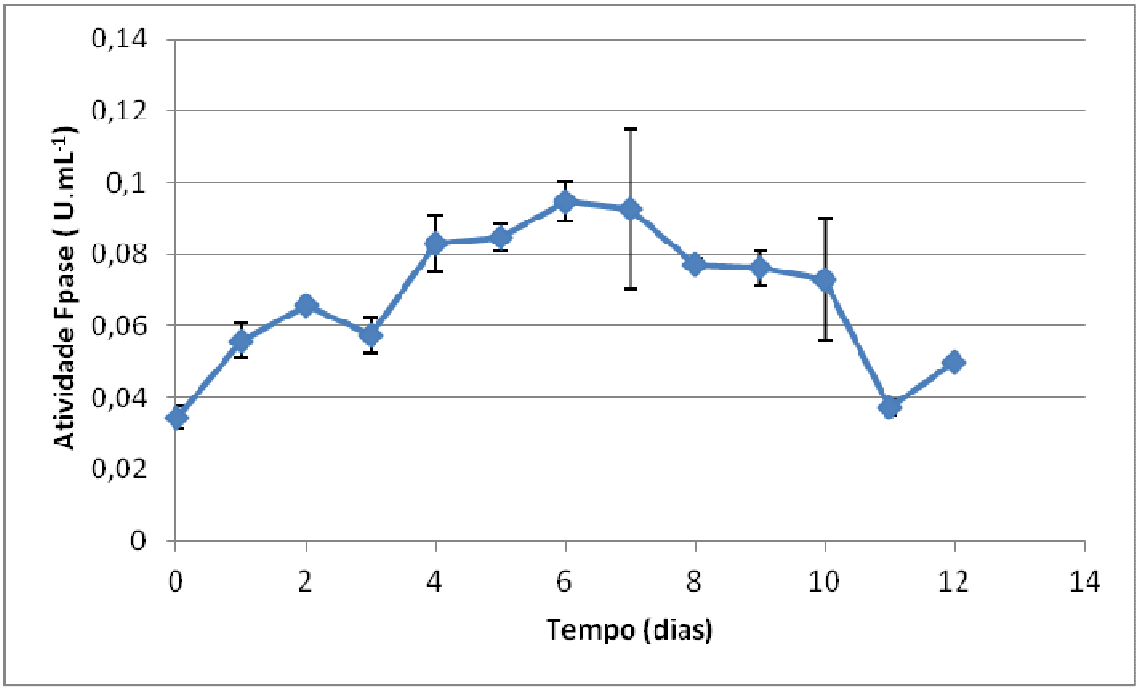


Figura 16. Cinética de produção de celulaseavaliada pelo ensaio de FPase (tampão citrato de sódio pH 4.8 a 50°C) pelo isolado I3 crescido em MMi suplementado com 0.5% FT, a 45 °C por 12 dias em constante agitação de 120 rpm.

Dentre os resultados obtidos no experimento de cinética de produção de celulases pelo isolado I3 destacou-se a produção de CMCase quando se comprara com os resultados obtidos por outros autores utilizando *Streptomyces*. A produção de CMCase pelo *S. malaysiensis* foi de 0.72 UmL^{-1} (NASCIMENTO *et al.*, 2008) e o *S. viridobrunneus* produziu 2.0 UmL^{-1} (VINHA *et al.*, 2011). No trabalho realizado por Alani et al. (2008) o *Steptomyces sp* obteve sua atividade máxima de Avicelase, CMCase e FPase após 120 horas de incubação. Outros autores também relatam tempos de incubação semelhantes aos descritos nesse trabalho (SÊMEDO et al., 2000;. JANG & CHEN, 2003).

Diversos trabalhos relatam a baixa atividade em papel de filtro justificando este fato pela dificuldade de acesso das enzimas ao substrato, uma vez que a área superficial é muito menor que a dos demais substratos utilizados. Por outro lado, a CMC é solúvel, favorecendo o incremento da atividade celulolítica. De Castro e colaboradores (2007) observaram atividade de FPase de 0,028 $U.mL^{-1}$ e CMCase de 0,32 $U.mL^{-1}$ para *Aspergillus niger* cultivado na presença de BCA. Silva & Brandellu (2007) obtiveram atividades de FPase de 0,04 $U.mL^{-1}$ e CMCase de 0,4 $U.mL^{-1}$ para o *Aspergillus phoenci.* Oliveira (2008) obteve uma atividade de Avicelase de 0,19 $U.mL^{-1}$ com o *Humicola grisea* var. *thermoidea*.

Melo (2010) estudou a produção de celulases pelo fungo *H. grisea* cultivado em meio contendo palha de arroz, sabugo de milho, BCA ou FT. As maiores atividades foram obtidas quando cultivado em 3% de BCA e FT (FPase 0,17 $U.mL^{-1}$, CMCase: 3,54 $U.mL^{-1}$, após 192 e 240 h respectivamente). A maior atividade de Avicelase foi obtida quando cultivado em 3% de BCA (0,195 $U.mL^{-1}$) após 48 h.

Na Figura 17 está demonstrada a produção de xilanase. Pode-se observar a presença de um pico de atividade no 2º e um ponto no 12º dias de cultivo, sendo que o maior pico foi observado após 12 dias de incubação (92,40 $Um.L^{-1}$).

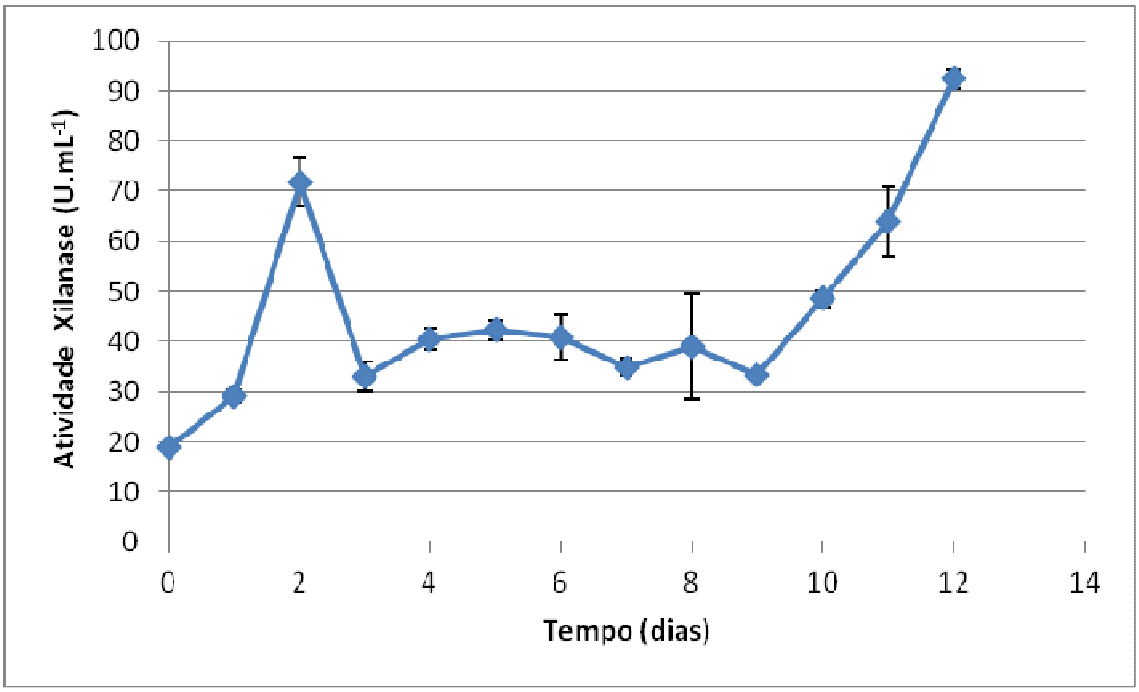


Figura 17. Cinética de produção de Xilanase (tampão citrato de sódio pH 4.8 a 50°C)pelo isolado I3 crescido em MMi suplementado com 0.5% FT, a 45 °C por 12 dias em constante agitação de 120 rpm.

Segundo Nadia *et al.* (2010) os maiores níveis de produção de xilanase foram detectados em cultura de *S. lividans* cultivado por cinco dias em pH 7 a 30 °C (9,84 $U.mL^{-1}$). Antonopoulos *et al.* (2001) estudaram a produção de xilanases extracelulares produzidas por *S. Albus*, sendo a maior atividade obtida após 120 h (11,97 $U.mL^{-1}$) de incubação.

No trabalho de Melo (2010) foi avaliada a produção de xilanases pelo fungo *H. grisea* cultivado em meio contendo palha de arroz, sabugo de milho, BCA e FT. A maior produção de xilanase foi verificada quando o fungo foi cultivado em 3% de FT (Xilanase 23,75 $U.mL^{-1}$) após 216 h de cultivo.

5.4. Dosagem de Protease

Para estudar a presença de proteases secretadas pelo isolado I3 foi analisado o sobrenadante de cultura do isolado cultivado por seis e doze dias. Os ensaios não determinaram a presença de proteases nessas amostras analisadas.

5.5. Zimograma

O perfil de CMCase secretadas pelo isolado I3 foi analisado aplicando-se o sobrenadante de cultura do isolado cultivado por seis dias em géis de zimograma contendo CMC como substrato. O perfil de xilanases secretadas pelo isolado I3 foi analisado aplicando-se o sobrenadante de cultura do isolado cultivado por doze dias em géis contendo xilana "oat spelt" como substrato. No zimograma para CMCase observa-se três bandas com atividade com massas moleculares estimadas de 37, 21 e 17 KDa (Figura 18). A proteína de 37 KDa foi a que apresentou o halo de hidrólise mais intenso no zimograma. No zimograma para xilanases observou-se quatro bandas com atividade de xilanase com massas moleculares estimadas de 39, 21, 18 e 17 KDa (Figura 19).

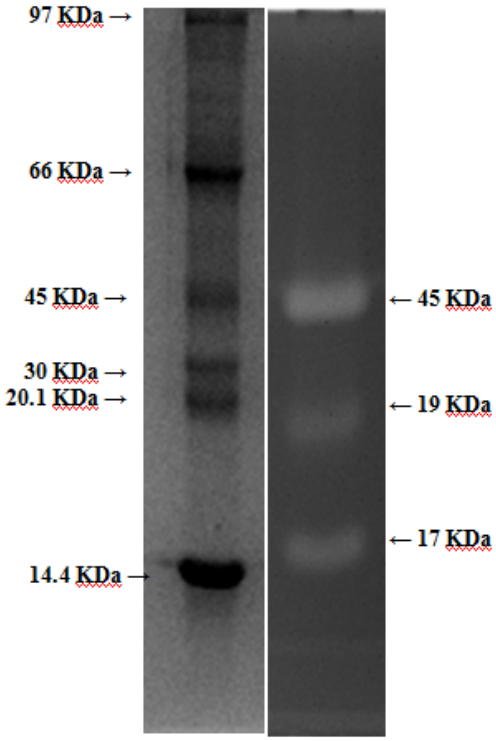


Figura 18. Zimograma para CMCase em gel de SDS-PAGE contendo 10% de poliacrilamida e 0,2% de CMC. Sobrenadante de cultura do isolado I3 contendo 0,5 U de atividade de CMCase. O gel contendo os marcadores de MM foi corado utilizando o metodo de coloração por azul coomassie.

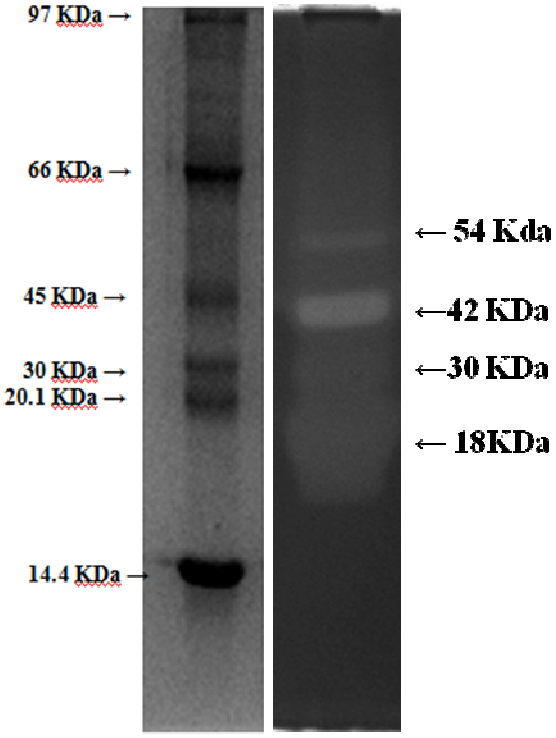


Figura 19. Zimograma para xilanases em gel de SDS-PAGE contendo 10% de poliacrilamida e 0,1% de xilana "oat spelt". O sobrenadante de cultura analisado continha 0,5 U de xilanase. O gel contendo os marcadores de MM foi corado utilizando o metodo de coloração por azul coomassie.

A produção de múltiplas celulases é comum na natureza, especialmente em Actinomicetos (NASCIMENTO *et al.*, 2008, VINHA, *et al* 2010). Os dados demonstrados no zimograma sugerem que no mínimo três celulases e quatro xilanases estão sendo secretadas por este isolado, estes dados corroboram os resultados dos testes de atividade enzimática, que mostraram diferentes picos de atividades.

Análises de zimograma do sobrenadante de cultura do *S. viridobrunneus SCPE-09* confirma esta característica, a estirpe foi cultivada em 2,0% de FT por cinco dias e o sobrenadante de cultura apresentou duas bandas de atividade contra CMC com massas moleculares estimadas de 37 e 119 KDa. Do mesmo modo, Nascimento *et al*. (2008) observaram três bandas de atividade contra CMC (51, 115 e 178 kDa) no sobrenadante de cultura de *S. malaysiensis* cultivado em 0,5% de grão de cevada. No trabalho de Siqueira (2010) observou-se a produção de xilanases quando os fungos filamentosos foram crescidos em presença de BCA e engaço de bananeira, essa característica foi confirmada na análise de zimograma, o sobrenadante contendo BCA apresentou 3 bandas com massas variando de 26 a 66 KDa e o sobrenadante contendo engaço de bananeira apresentou 5 bandas com massas variando de 26 a 97 KDa.

5.6. Caracterização parcial da atividade celulolítica e xilanolítica do sobrenadante de cultura.

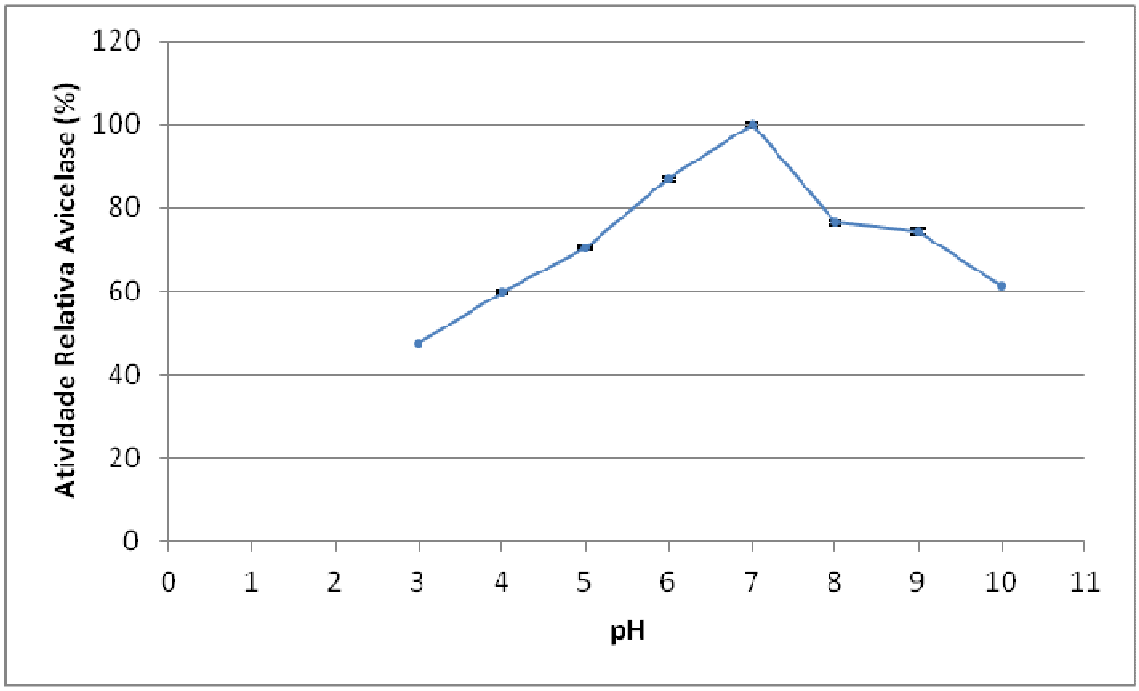
A influência do pH (pH de 3 a 10) e da temperatura (temperatura de 20 a 80°C) na atividade das avicelases, CMCases, FPases e xilanases secretadas pelo isolado I3 foi avaliada. Nestas análises utilizou-se os sobrenadantes de cultura do isolado I3 cultivado em MMi suplementado com 0,5% de FT por 6 dias.

No gráfico da Figura 20A pode-se concluir que a maior atividade de Avicelase foi obtida em pH 7,0. É importante observar que mais de 70% dessa atividade é mantida na faixa de pH entre 5,0 a 9,0. Essa característica é bastante interessante sob o ponto de vista biotecnológico, visto que essa enzima poderia saer utilizada em uma ampla faixa de pH, desde levemente ácido a levemente básico.

Segundo Walter & Schremph (1995) o *S. reticuli* manteve 75% a 90 da sua atividade a um pH de 5,0 e 4,5, respectivamente, além disso, a enzima apresentou-se estável a um pH variando de 4 a 9.

O gráfico da Figura 20B demonstra a influência da temperatura sobre a atividade de Avicelase, e revela que o sobrenadante apresentou maior atividade nas temperaturas de 35°C e 50°C, sendo a maior atividade verificada a 35°C. Pode-se observar que nas temperaturas de 60 a 80°C ocorreu a manutenção de aproximadamente 40% da maior atividade. A existência de dois picos de atividade, com temperaturas bem diferentes, sugere novamente a presença de mais de uma celulase no sobrenadante de cultura, corroborando os dados do zimograma e da cinética de produção (Figura 18).

A



B

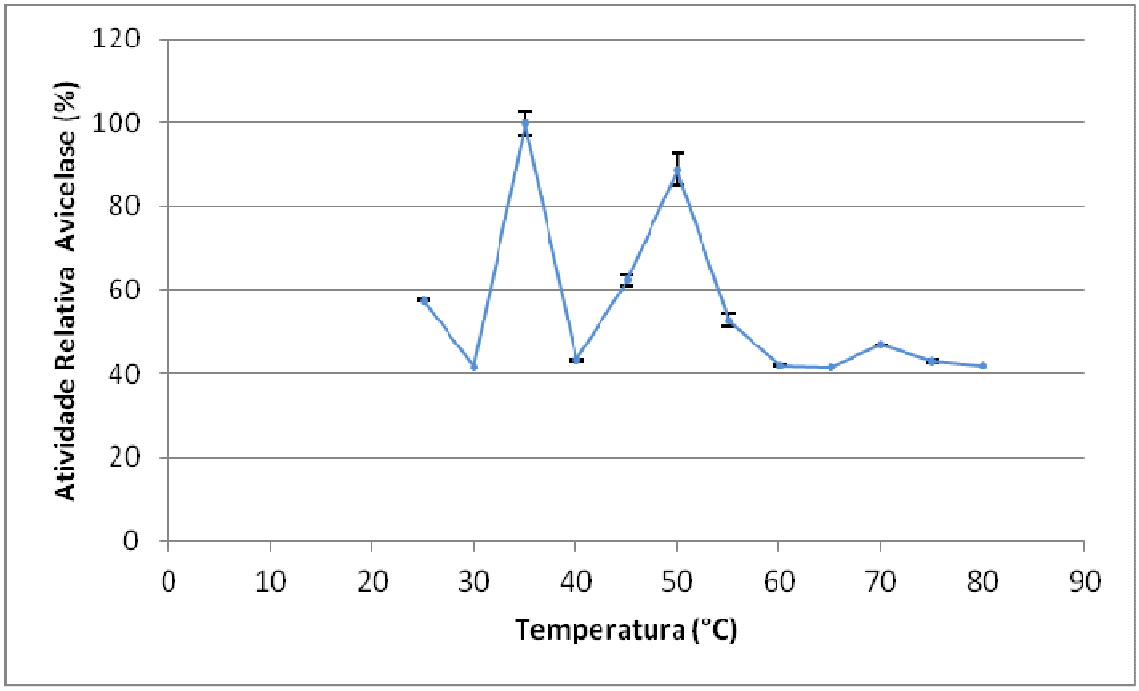
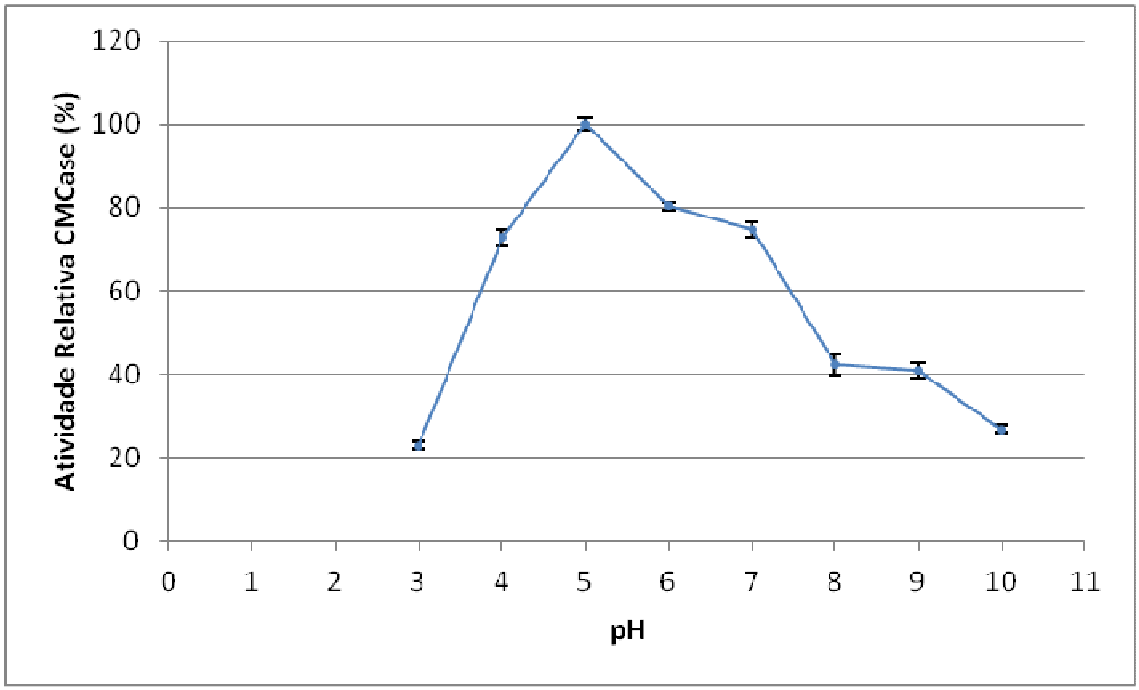


Figura 20. A) Efeito do pH na atividade da Avicelase (50 °C) secretada pelo I3 cultivado em FT. A concentração iônica para todos os tampões foi de 0.05 mol L-1: citrato de sódio (pH 3 a 6), fosfato de sódio (pH 7 e 8), Tris-HCl (pH 9) e glicina-NaOH (pH 10). B) Efeito da temperatura sobre atividade da Avicelase (pH 7) secretada pelo I3 cultivado em FT. Atividade foi expressa em relação à maior atividade.

O gráfico da figura 21A pode-se concluir que o melhor pH para a atuação da CMCase é 5. Também é possível observar a manutenção de mais de 70% da atividade na faixa entre 4,0 e 7,0, novamente mostrando um potencial de ser utilizado em diferentes processos biotecnológicos. Esta enzima tolera um pH mais elevado do que as celulases relatadas por George e colaboradores (2001) produzidas pelo *Streptomyces sp.* alcalofílico que manteve apenas 31% da atividade a pH 7. A capacidade de retenção da atividade a pH elevado é uma propriedade potencialmente útil em processos de deslignificação alcalina.

O gráfico da figura 21B demonstra a influência da temperatura na atividade das CMCases, pode-se observar que a enzima apresenta atividade alta nas temperaturas de 35, 45-50°C e 70°C, sendo que a maior atividade foi obtida a 70°C. Os três picos de atividade confirmam a presença de multiplas celulases no sobrenadante de cultura, fato este que parece ser comum nos *Streptomyces* (NASCIMENTO *et al.*, 2008, VINHA *et al.*, 2010).

A



B

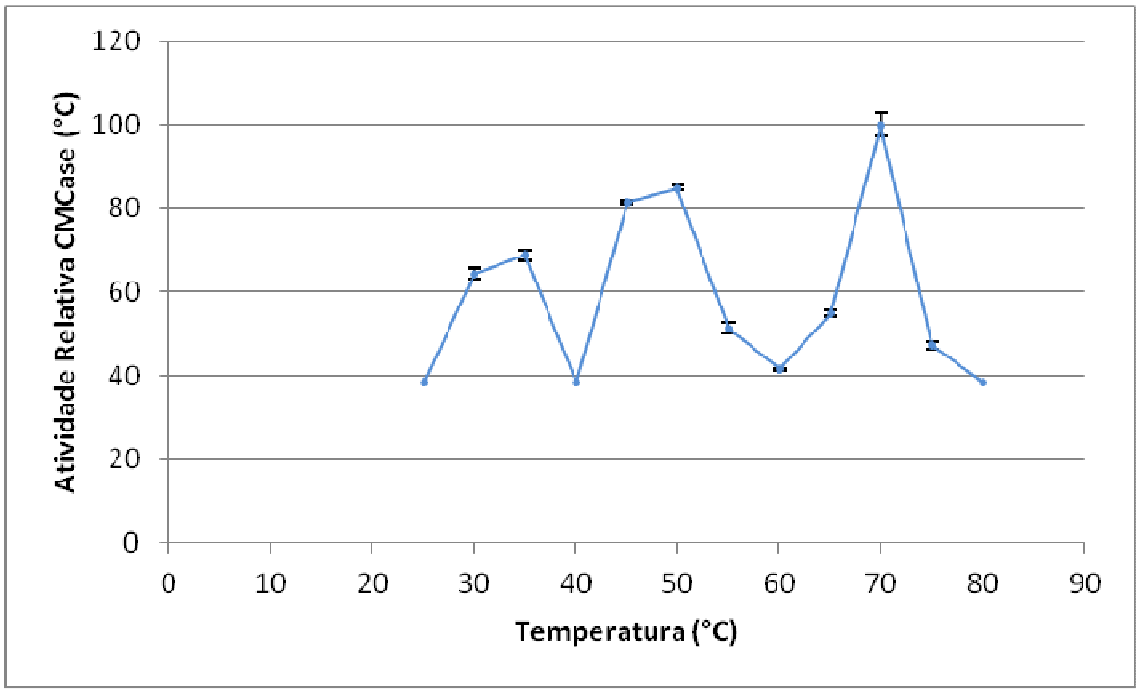


Figura 21. A) Efeito do pH na atividade da CMCase (50 °C) produzida pelo I3 crescido em meio MM suplementado com 0,5% de FT. A concentração iônica para todos os tampões foi de 0.05 molL^{-1}: citrato de sódio (pH 3 a 6), fosfato de sódio (pH 7 e 8), Tris-HCl (pH 9) e glycina-NaOH (pH 10). B) Efeito da temperatura na atividade de CMCase (pH 5) produzida pelo I3 crescido em meio MMi suplementado com 0,5% de FT. Atividade residual é expressa em porcentagem da atividade máxima.

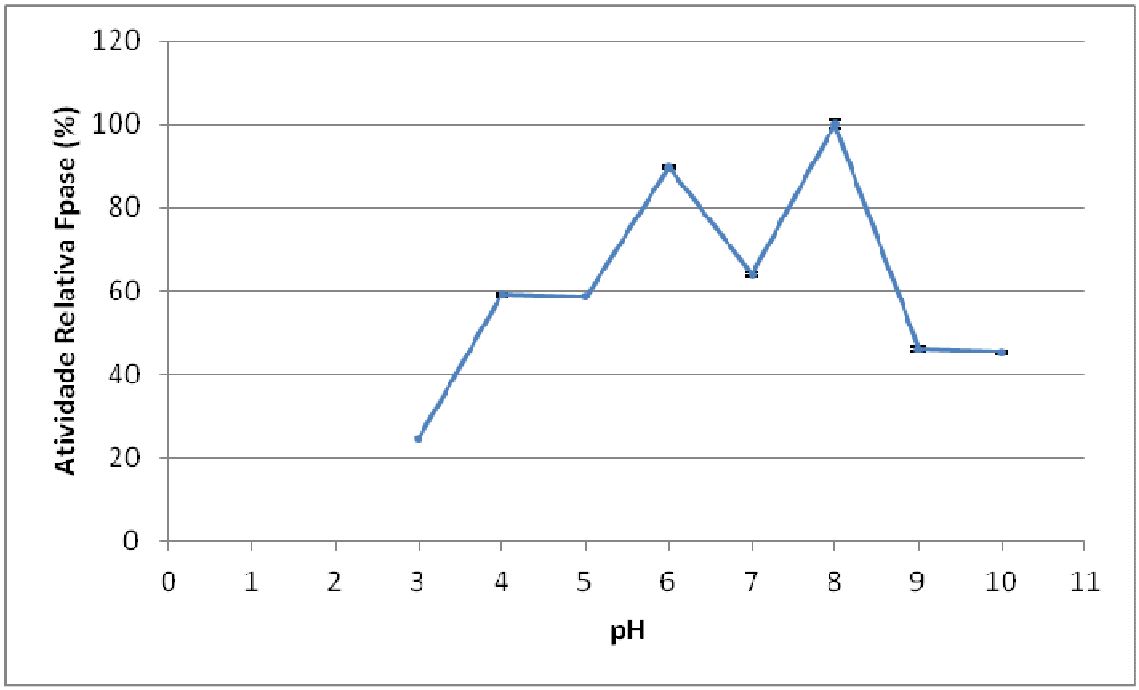
Os dados de pH e temperatura para a atividade de CMCase obtidos nesse trabalho são semelhantes aos descritos por outros autores (JANG & CHEN, 2003, SCHREMPF *et al.*, 1995, GEORGE *et al.*, 2001). O perfil de temperatura do extrato bruto de *S. viridobrunneus* SCPE-09 cultivado em presença de FT e CMC apresentou máxima atividade a 50°C e reteve 80 e 45% da maior atividade em 40 e 60°C, respectivamente. Nascimento e colaboradores (2008) observaram que a CMCase produzida por *S. malaysiensis* é termofílica, mantendo quase 100% de atividade após pré-incubação nas temperaturas de 40°C e 60°C.

Os resultados da influência do pH sobre a atividade CMCase também são similares ao descritos por outros autores. Vinha ecolaboradores (2011) estudaram o extrato de *S. viridobrunneus*, eles observaram que a atividade é mantida ao longo de uma ampla faixa de pH (3,0-8,0), com maior atividade em pH 5,0. Há poucos relatos na literatura sobre a atividade CMCase em um intervalo de pH muito amplo. A maioria dos relatos para *Streptomyces* citam a atividade em pH alcalino (SEMÊDO *et al.*, 2004, JANG & CHEN, 2003, GEORGE *et al.*, 2001, HOSHIRO *et al.*, 1999). Nascimento e colaboradores (2008) demonstraram que sobrenadante de cultura de *S. malaysiensis* apresenta atividade de CMCase na faixa de pH 2,0-9,0, com atividade máxima observada a pH 4,0 .

A Figura 22A mostra claramente dois picos de atividade de FPase (pH 6,0 e 8,0), podendo ter um terceiro na faixa de pH entre 4,0-5,0. A maior atividade foi obtida em pH 8,0. Na faixa entre pH 4,0 e 8,5 pode-se observar a manutenção de mais de 60% da maior atividade medida. A existência de dois picos de atividade bem definidos confirma a existência de um sistema múltiplo de celulases. Os dados sugerem que uma das FPases pode ser caracterizada como alcalina.

A figura 22B mostra que a temperatura influencia muito a atividade das FPases, revelando uma maior atividade a 45°C. Um possível segundo pico de atividade ocorreria a 65°C, com aproximadamente 50% da atividade do pico maior.

A



B

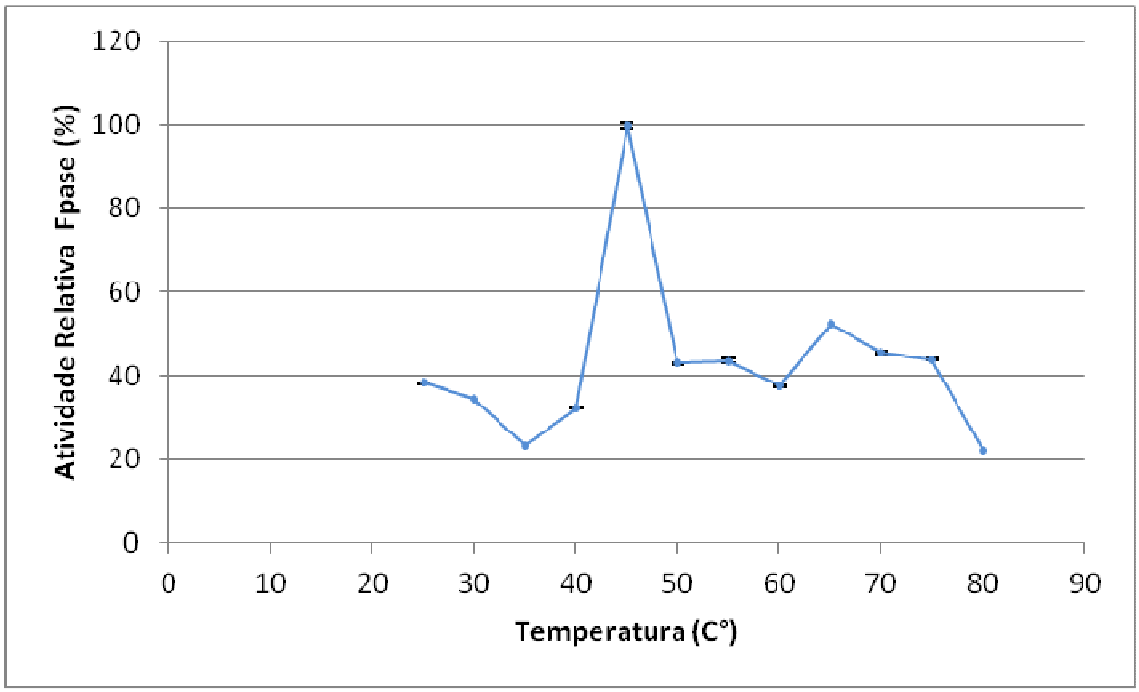


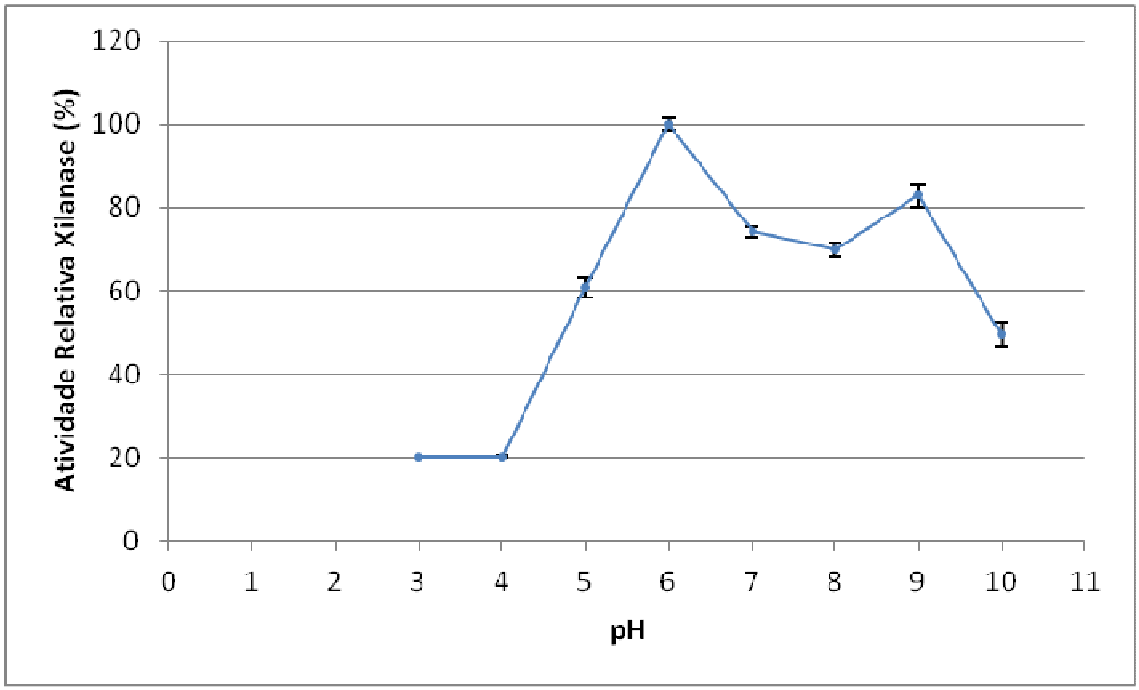
Figura 22. A) Efeito do pH na atividade da FPase (50 °C) produzida pelo I3 crescido em meio MMi suplementado com 0,5% de FT. A concentração iônica para todos os tampões foi de 0.05 mol L-1 0.05 molL^{-1}: citrato de sódio (pH 3 a 6), fosfato de sódio (pH 7 e 8), Tris-HCl (pH 9) e glycina-NaOH (pH 10). B) Efeito da temperatura na atividade FPase (pH 8) produzida pelo I3 crescido em meio MMi suplementado com 0,5% de FT. Atividade residual é expressa em porcentagem da atividade máxima.

A figura 23A mostra a existência de dois picos de atividade de xilanase (pH 6,0 e 9,0). A maior atividade foi obtida em pH levemente ácido. O segundo pico ocorre numa faixa mais alcalina, sendo observada aproximadamente 80% da atividade do primeiro pico. Aproximadamente 60% da atividade de xilanase é mantida na faixa de pH entre 5,0 e 9,5, portanto o sobrenadante de cultura possui uma ampla faixa de estabilidade e poderia ser utilizado em processos bioquímicos que ocorrram em valores de pH, com perfis ácidos e básicos.

A Figura 23B demonstra a influência da temperatura sobre a atividade de xilanase. Os dados mostram que esse extrato pode ser utilizado na faixa entre 30 e 70°C. A maior atividade foi obtida a 70°C, entretanto as atividades medidas entre 35-45°C e a 55°C, sugerem outros picos de atividade. Esses possíveis picos poderiam ser resultado da ação sinergística de mais de uma enzima com características semelhantes. Os diferentes picos de atividade para o perfil de temperatura confirma a possível presença de mais de uma xilanase no sobrenadante de cultura

.

A



B

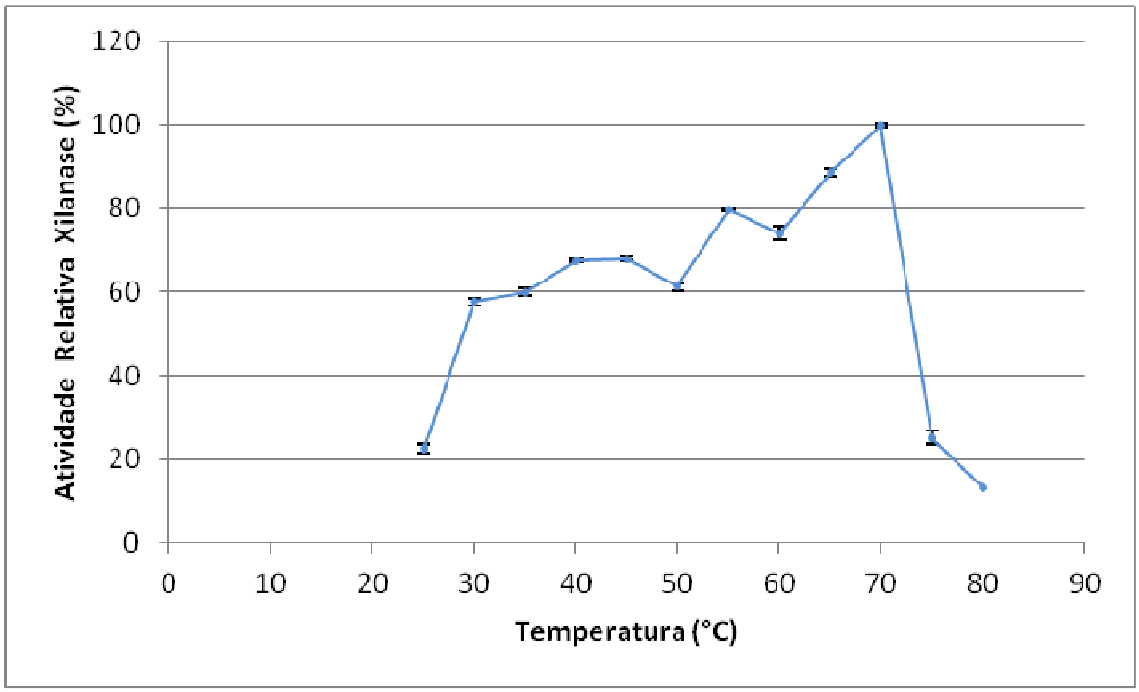


Figura 23. A) Efeito do pH na atividade da Xilanase (50 °C) produzida pelo I3 crescido em meio MMi suplementado com 0,5% de FT. A concentração iônica para todos os tampões foi de 0.05 mol L^{-1}: citrato de sódio (pH 3 a 6), fosfato de sódio (pH 7 e 8), Tris-HCl (pH 9) e glicina-NaOH (pH 10). B) Efeito da temperatura na atividade Xilanase (pH 5,5) produzida pelo I3 crescido em meio MMi suplementado com 0,5% de FT. Atividade é expressa em relação à maior atividade.

5.7. Estudo da termoestabilidade

Celulases termoestáveis são consideradas muito interessantes para aplicações biotecnológicas. Meia-vida de 7 horas a 60°C, ou 3 h, a 70°C têm sido citados na literatura para algumas espécies de *Actinomicetos* (Georg, *et al*. 2001). Enzimas do extrato bruto de *S. drozdowiczii* foram capazes de reter 100% de atividade quando incubadas a 50°C durante 1 h, e 40% após 2 h, mas apenas 20% após 8 h de incubação (Lima *et al.* 2005).

Na figura 24 está demonstrada a termoestabilidade da atividade de Avicelase. Após 60 minutos de incubação foram mantidos 90% e 60% da atividade a 50°C e 60°C, respectivamente. Após 2 horas de incubação as enzimas mantiveram 60% de sua atividade inicial a 50°C e 60°C. Após 8 horas de incubação as enzimas retiveram sua atividade em 45% de sua atividade inicial tanto a 50°C quanto a 60°C. Nenhum dado foi encontrado na literatura de Actinomycetos que pudesse ser comparado aos dados de termoestabilidade de Avicelase e FPase aqui estudados.

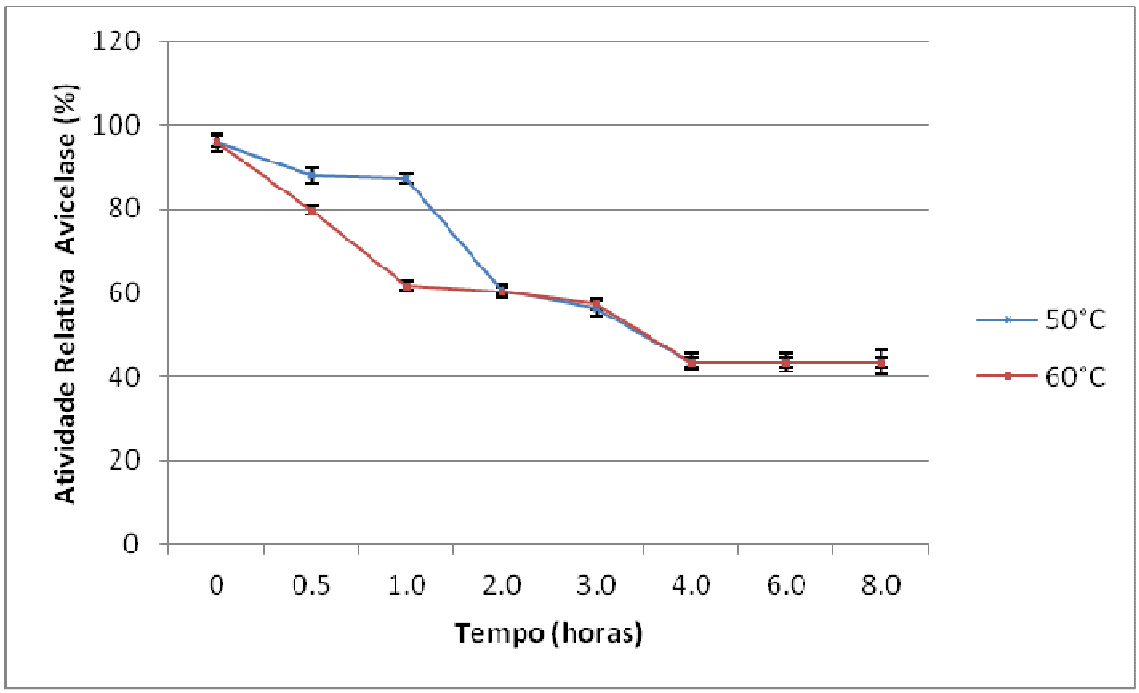


Figura 24. Termoestabilidade da atividade de Avicelase às temperaturas de 50°C e 60°C. Atividade Relativa expressa em relação à atividade original (100%).

No teste para CMCase as enzimas do sobrenadante apresentaram perfis diferentes a 50°C e 60°C. Após 30 minutos de incubação a atividade relativa aumentou 5% a 50°C, já a 60°C a atividade caiu a 78% da inicial. Após 2 horas de incubação a atividade a 50°C reteve 83% da atividade máxima, enquanto que a 60°C reteve 60% da atividade máxima. Após 4 horas de incubação as enzimas mantiveram 70% da atividade inicial (50°C) e apenas 40% (60°C). Após 8 horas de incubação a 50°C e 60°C a atividade caiu para 35% da atividade inicial (Figura 25).

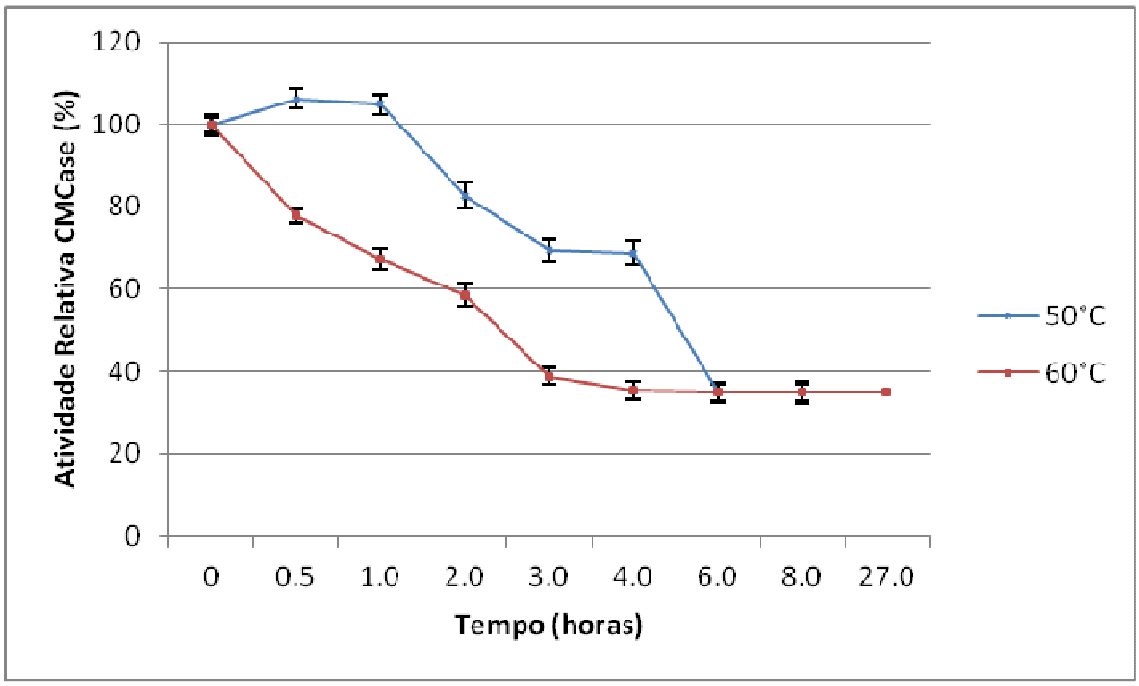


Figura 25. Termoestabilidade do sobrenadante CMCase às temperaturas de 50°C e 60°C. Atividade Relativa expressa em porcentagem com a porcentagem da atividade original (100%).

No teste para FPase as enzimas tiveram um perfil de estabilidade semelhante para as duas temperaturas. Após 2 horas de incubação o extrato reteve mais 60% da sua atividade inicial a 50°C e 60°C. Após 4 horas reteve aproximadamente 25% da atividade inicial e após 8 horas permaneceu os 25% da atividade inicial (Figura 26).

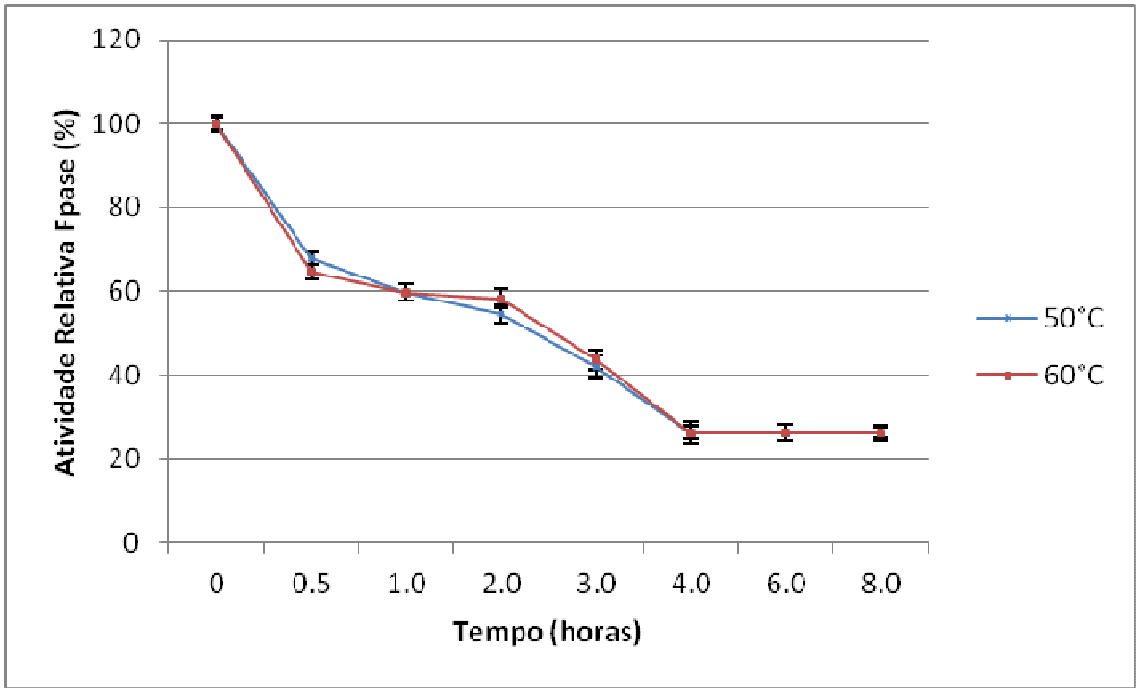


Figura 26. Termoestabilidade da atividade de FPase nas temperaturas de 50°C e 60°C. Atividade Relativa expressa em relação à atividade original (100%).

No teste para Xilanase as enzimas tiveram um excelente perfil de estabilidade após 4 horas 70% da sua atividade inicial a 50°C e 80% a 60°C, após 8 horas mantiveram 75% da atividade a 50°C e 55% da atividade à 60°C (Figura 27).

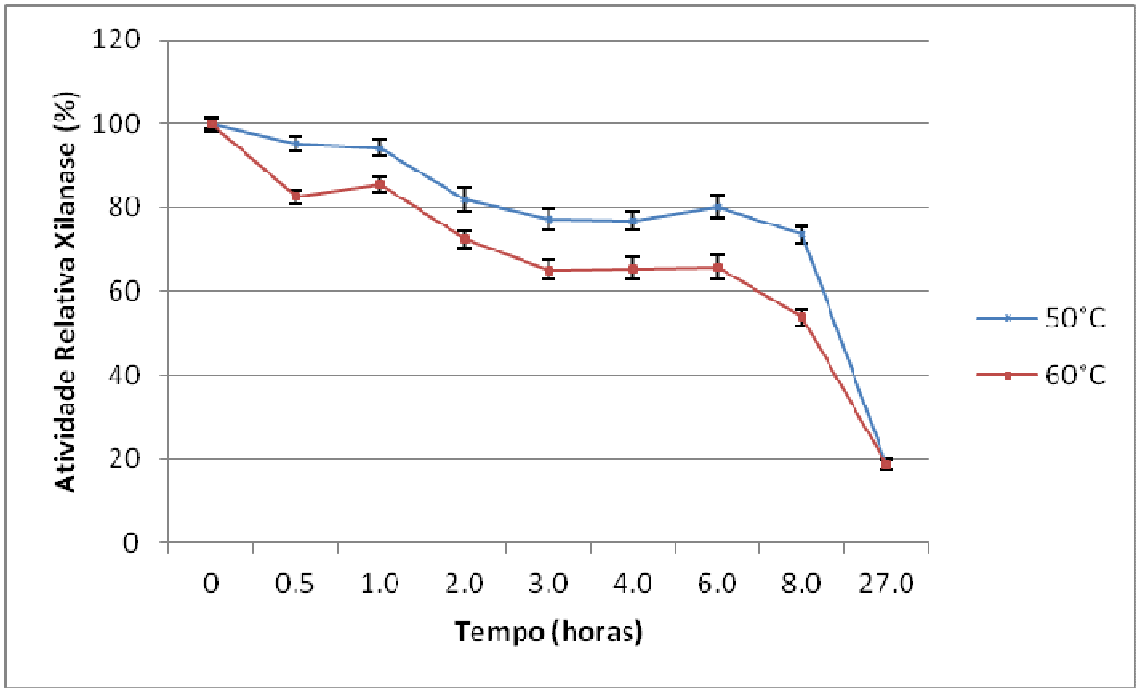


Figura 27. Termoestabilidade do sobrenadante Xilanase às temperaturas de 50°C e 60°C. Atividade Relativa expressa em porcentagem da atividade original (100%).

A estabilidade térmica da xilanase purificada de *Thermoascus aurantiacus*-Ta Xyn10A, apresentou uma boa estabilidade a 70°C e manteve aproximadamente 77% da atividade, após incubação por 4 horas (ZANG et al., 2011). Segundo Vinha *et al.* (2011) o extrato bruto de *S. viridobrunneus* SCPE-09 contendo xilanase foi capaz de reter 76% da atividade inicial quando incubado a 50°C durante 2 h, e 67% após 4 h de incubação. Há vários fatores estruturais que podem conferir esta termoestabilidade às xilanases e celulases termofílicas, como interações hidrofóbicas (CONNERTON et al., 1999), oligomerização devido à exposição dos resíduos aromáticos a solventes (HARRIS et al., 1997) e pontes dissulfeto (WAKARCHUK et al., 1994).

5.8. Efeito dos íons metálicos e do EDTA sobre a atividade enzimática do sobrenadante de cultura.

Alguns estudos demonstram que a atividade das celulases de *Streptomyces* é fortemente influênciadas por íons metálicos. Esses íons podem participar da manutenção da estrutura terciária da proteína ou do sítio ativo. Os íons utilizados foram selecionados de acordo com a literatura, íons que induziram ou inibiram a produção de enzimas.

Para a atividade de Avicelase nota-se uma inativação de 78% na presença do íon metálico Mg^{+2}, 55,3% para Mn^{+2}, 51,7% para Al^{+3}. Os íons Na^{+}, Ca^{+2} e Ba^{+2} apresentaram uma menor influência na atividade (variando entre 34 e 45% de inativação) o EDTA não demonstrou diminuição da atividade de avicelase.

Para a atividade de CMCase notou-se uma inativação de 54,4% para o EDTA, os íons Mg^{+2}, Ca^{+2} e Ba^{+2} apresentaram inibição de 34 a 38%. Os demais íons metálicos não demonstraram uma diminuição da atividade (Tabela 1).

Para a atividade de FPase observa-se uma diminuição de 41,3% da atividade para o íon NH_4^{+}, seguido por AL_3^{+} e Ca^{+2} e o EDTA reteve 81,1% da atividade inicial.

Para a atividade de Xilanase observa-se uma redução de 35,3% para Mn^{+2}, e o EDTA reduziu 42,5% da atividade para Xilanase.

Tabela 1. Efeito de diferentes íons metálicos nas atividades de Avicelase, CMCase, FPase e Xilanase do I3.

	Atividade Relativa (%)[b]			
Ions[a]	Avicelase	CMCase	FPase	Xilanase
Control (no addition)	97,87 ± 1,3	100 ± 1,5	100 ± 0,04	100 ± 2,5
Al^{+3}	46,93 ± 0,6	76,75 ± 1,0	63,49 ± 0,15	72,02 ± 2
Ba^{+2}	76,01 ± 1,0	65,73 ± 0,5	83,56 ± 0,16	84,59 ± 2,1
Ca^{+2}	62,55 ± 0,9	67,48 ± 2,1	67,61 ± 0,07	77,26 ± 2,1
K^{+}	79,17 ± 1,0	71,07 ± 0,6	93,75 ± 0,11	86,34 ± 2,2
Mg^{+2}	22,23 ± 0,3	61,95 ± 1,4	75,95 ± 0,04	69,33 ± 2,4
Na^{+}	55,70 ± 0,7	74,24 ± 0,3	97,77 ± 0,01	69,26 ± 2,6
Mn^{+2}	47,70 ± 0,6	98,28 ± 1,3	79,96 ± 0,05	62 ± 2,6
NH_4^{+}	81,40 ± 1,1	63,67 ± 0,6	61,02 ± 0,11	78,48 ± 1,9
EDTA	94,56 ± 1,3	45,66 ± 0,5	80,78 ± 0,06	58,77 ± 1,7

[a] A concentração final da reação foi 10mM.

[b] Atividade relativa é expressa em porcentagem em relação ao controle (100% com atividade enzimática de 5 $U.mL^{-1}$ para Avicelase, 3 $U.mL^{-1}$ para CMCase, 0,09 $U.mL^{-1}$ para FPase e 92 $U.mL^{-1}$ para Xilanase.

A atividade de celulase de *S. drozdowiczii* mostrou uma inibição de 30% na presença de cobre, mas foi induzida na presença de todos os outros íons testados, incluindo o magnésio, ferro, sódio e especialmente bário (86% de indução) e de potássio (62% de indução) (LIMA, *et al.* 2005).

Os resultados relacionados à ativação da atividade CMCase na presença de íons metálicos (Ca^{+2} e Na^{+} segundo Vinha, *et al.* (2011) tiveram pouco ou nenhuma efeito, já na presença de Cu^{+2}, Fe^{+2}, e Mn^{+2} ocorreu uma diminuição considerável da atividade. Esses íons metálicos são comumente citados em literatura como inibidores de várias celulases microbianas (TAO *et al,*. 2010, SHANMUGHAPRIYA *et al.*,2010).

A análise de uma endoxilanase purificada de *Cellulomonas sp.* expressa em *Escherichia coli* no trabalho de Chaudhary & Deobagkar (1997) revelou uma diminuição da atividade na presença dos íons Ca^{+2}, K^{+} e Mg^{+2}. A endoxilanase de *A. niger* em *P. pastoris* purificada por Deng e colaboradores (2006) foi estimulada na presença dos íons Mn^{+2} e Cl^{-} em cerca de 16 e 17 %, respectivamente.

5.9. **Identificação taxonômica do isolado I3**

A identificação filogenética foi feita utilizando o método taxonômico molecular baseado na sequencia do gene 16S rDNA. O gene 16S rDNA foi amplificado utilizando-se o oliginucleotídeos universais 27F (5′ AGA GTT TGA TCG TGG CTC AG 3′) e 1492R (3′ GGT TAC CTT GTT ACG ACT T 5′), o produto da reação de PCR foi precipitado e submetido a sequenciamento pelo método de Sanger.

A sequência obtida foi utilizada para fazer uma busca por homologia no GenBank utilizando-se a ferramenta BLAST. As sequências que apresentaram maior similaridade foram alinhadas utilizando o programa Clustal X. O resultado do alinhamento foi utilizado para fazer uma análise filogenética utilizando o programa PAUP 10B.

Os dados da busca demonstraram que as sequências dos seguintes microrganismos apresentaram maior similaridade com a sequência do I3: *S. thermodiastaticus, S. thermoviolaceus, S. thermocyaneomaculatus, S. phaeochromogenes, S. tosaensis, S. lividans, S. thermogriseus, S. coelicolor, S. viridis, S. coeruleorubidus, S. thermonitrificans, S. thermocarboxydovorans* e *S. thermovulgaris, S. thermotolerans*. Como grupo externo foi utilizada a seuqência de *Nocardia alborubida* (Figura 28).

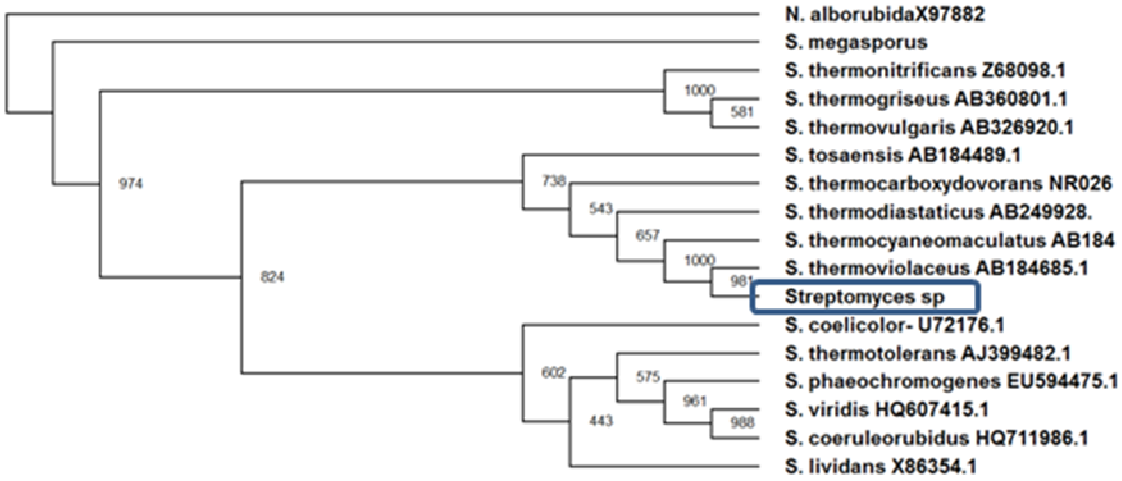


Figura 28. Árvore gerada utilizando o algoritimo de Neighbour-Joining com base na sequência 16S rDNA, mostrando as relações entre as diferentes espécies de *Streptomyces*. O nos nós da árvore representam Bootstrap.

Na árvore gerada utilizando-se o algoritmo Neighbour-Joining, as espécies que foram selecionadas por apresentar maior identidade foram divididas em 03 grupos. Os grupos I e II foram formados pelos *Streptomyces* termofílicos, o grupo III apresentou as espécies mesofílicas. *Streptomyces sp* I3 apresentou maior identidade com *S. thermoviolaceus e com S. thermocyaneomaculatus.* Essa similariedade é suportada por altos valores de Bootstrap.

Os resultados sugerem que o I3 (Figura 29) seja filogeneticamente relacionado ao *S. thermoviolaceus,* entretanto apenas a análise da sequência do 16S rDNA não é sufuciente para determinar a espécie. Outras sequências de DNA deverão ser analisadas para se chegar a identificação desse isolado, bem como testes microbiológicos deverão ser feitos para essa confirmação (utilização de únicas fontes de carbono, crescimento em diferentes concentrações de NaCl, produção de pigmentos, análise da morfologia do esporo entre outras).

Segundo Huang e colaboradores (2004)Sembring (2009) os Streptomyces sabidamente termofílicos são filogeneticamente separados em dois grupos. Os resultado sobtidos nesse trabalham corroboram os dados obtidos pelos pesquisadores acima.

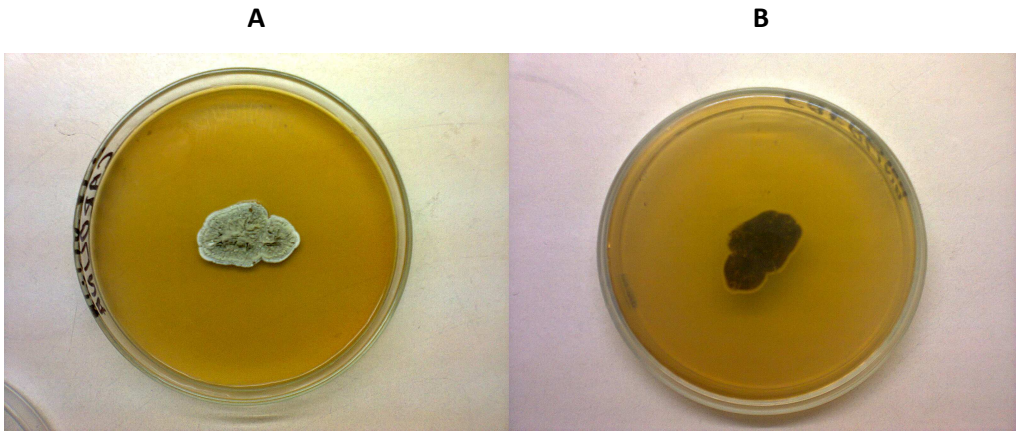


Figura 29. Aspecto morfológico do *Streptomyces sp*. I3 cultivado em meio sólido. Visão do miélio aéreo (A) e do micélio substrato (B).

5.10. Sacarificação de Substratos Lignocelulósicos por Hidrólise Enzimática.

Para produção de etanol a partir de substratos lignocelulolíticos, além de se fazer a hidrólise dos polissacarídeos, é fundamental obter uma elevada concentração de açúcares fermentáveis. A liberação de glicose e xilose é geralmente denominada de sacarificação. O propósito do pré-tratamento foi causar a desconstrução da parece celular do BCA, liberando parte da hemicelulose solúvel e deixando, assim, a celulose mais disponível à ação das enzimas e, ainda, retirar o excesso de pigmentos (SIQUEIRA, 2010).

Mesmo com a desconstrução da parede celular do BCA, ainda é necessário utilizar um conjunto de enzimas, pois a constituição lignocelulósica desta parede exige um trabalho sinérgico entre diferentes enzimas (SIQUEIRA, 2010).

5.11. Hidrólise Enzimática

Na hidrólise enzimática foi utilizado o sobrenadante de cultura do I3 contendo celulases e xilanases e o sobrenadante de cultura de *Aspergillus* sp. contendo β-glicosidase (Pereira, D.E.P. comunicação pessoal). O BCA pré-tratado foi submetido à hidrólise enzimática utilizando duas condições diferentes: reação I (RI) e reação II (RII).

Na tabela 2 estão descritas as unidades de cada atividade que foram utilizados no procedimento de sacarificação.

Tabela 2. Dosagem das enzimas presentes no sobrenadante de cultura da bactéria *Streptomyces sp* e do fungo *A. níger*.

	Sobrenadante do Sexto dia	Sobrenadante do Décimo segundo dia	β-glicosidase	Atividade Total
Avicelase (UmL^{-1})	0,12	0,38	0,01	0,51
CMCase (UmL^{-1})	3,8	2,9	0,71	7,41
FPase (UmL^{-1})	0,65	0,57	0,12.	1,34
Xilanase (UmL^{-1})	42	78	0,07	120,07
β-glicosidase (UmL^{-1})	_	_	0,0208	0,0208

Tabela 2. Concentração final de glicose e xilose obtida após hidrólise do BCA (2%).

Reação	Enzima (mL)	Temperatura 2 h iniciais	Glicose após hidrólise	Xilose após hidrólise	Glicose	Xilose
I	Celulases (0,4)	50°C	0,72 g/L	1,93 g/L	16%	57%
	Xilanases (0,2)	50°C				
	β-glicosidase *(0,4)*	50°C				
II	Celulases (0,4)	70°C	0,86 g/L	2,14 g/L	19%	62,9%
	Xilanases (0,2)	50°C				
	β-glicosidase *(0,4)*	50°C				

Os resultados observados estão descritos na Tabela 3. O procedimento II foi o mais eficiente na liberação de monosacarídeos. Na primeira reação a taxa de conversão em glicose foi de 16% (0,72 g/ L) e de xilose 57% (1,93 g/ L), na segunda reação a taxa de conversão em glicose foi de 19 % (0,86 g/ L) e de xilose 62,9 % (2,14 g/ L). A segunda reação apresentou um aumento de 20% na taxa de conversão à glicose e de 10% na taxa de conversão à xilose em relação a primeira. O aumento da temperatura da reação nas duas horas iniciais provavelmente aumentou a eficiência das celulases, resultando numa maior exposição da fibra de celulose, possibilitando uma maior ação das enzimas presentes nos extratos.

Estes resultados demonstram que as taxas de conversão da hidrólise enzimática obtidas no presente trabalho foram abaixo dos valores encontrados na literatura, porém as enzimas utilizadas não foram purificadas e nem as condições de hidrólise otimizadas. Esses resultados permitem esperar um aumento na produção de glicose e xilose, quando as condições forem otimizadas, seja na produção das enzimas, seja na determinação das

melhores condições de hidrólise. Também seria muito interessante estudar diferentes processos de pré-tratamento para permitir um maior acesso das enzimas ao substrato.

Em trabalho realizado por Hsu e colaboradores (2011) verificou-se que o tratamento do sabugo de milho hidrolisado pelas enzimas CMCase, Avicelase e β-glicosidase produzidas pelo *Streptomyces sp*. T3-1 favoreceu a conversão de celulose em glicose. A interação sinérgica de endoglicanase, exoglucanase e β-glucosidase resultou em eficiente hidrólise. Após 5 dias de incubação, a produção de açúcar reduzido atingiu 53,1%.

O trabalho realizado por Pietrobon e colaboradores (2011) avaliou a hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com ácido ou base para a produção de açúcares fermentáveis. Quatro enzimas comerciais foram utilizadas: HPL, CL, P1 e P4. Os dados mostraram que o pré-tratamento ácido utilizando a enzima CL forneceu os melhores resultados, obtendo aproximadamente 45% de liberação de glicose.

Yoon e colaboradores (2006) verificaram que o sabugo de milho pré-tratado com NaOH foi eficientemente hidrolisado pelas enzimas Rapidase Polimaq, Cytolase ML e Validase X, atingindo-se 27% de rendimento na liberação de glicose.

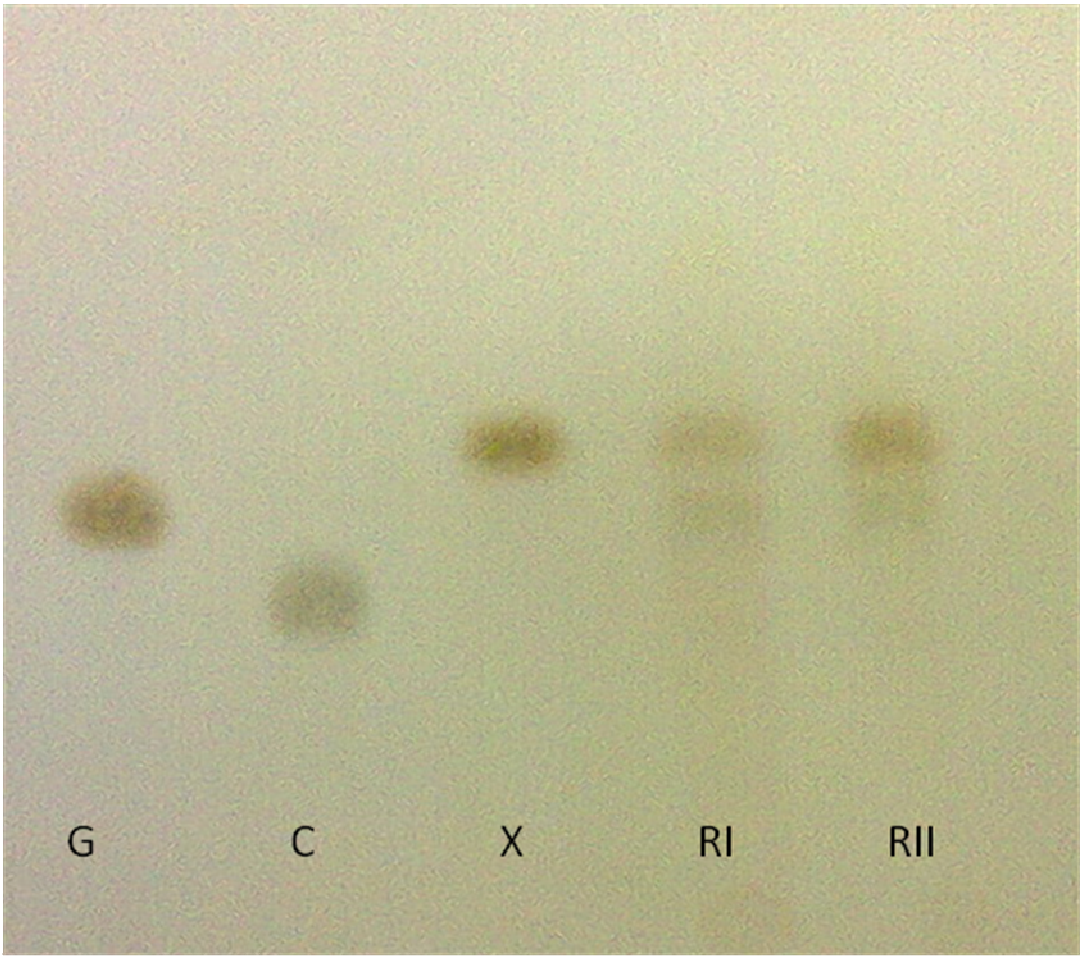


Figura 30. Cromatografia de camada delgada com placa sílica-gel em fase móvel de butanol, metanol e água (4:2:1). Foi aplicado 2,5 µL dos seguintes marcadores: G (glicose 1%), C (celobiose 1%) e X (xilose 1%) e 10 µL das hidrólises: RI (reação I de hidrólise) e RII (reação II de hidrólise).

Esses dados (Figura 30) sugerem que os extratos utilizados foram bastante eficientes na produção de monossacarídeos. Também é importante salientar que as reações R I e RII foram realizadas em condição padrão (tampão e pH). A otimização das condições de reação podera melhorar a sacarificação resultando em maior liberação de glicose e xilose. Por exemplo, pH 6,0, aparentemente, seria um pH que permitiria o maior somatório das atividades estudadas.

6. CONCLUSÕES

- O *Streptomyces sp* I3 secretou enzimas com atividade de Avicelase, CMCase, FPase e Xilanase quando cultivado em presença de Farelo de Trigo.

- A Avicelase apresentou melhor atividade em pH 7 e temperatura de 35°C, possui estabilidade de 60% após duas horas de incubação à 50°C e 60°C. Sua ação foi reduzida na presença dos íons Mg^{+2}, Mn^{+2}, Al^{+3}, Na^{+}, Ca^{+2} e Ba^{+2}.

- A CMCase apresentou melhor atividade em pH 5 e temperatura de 70°C, possui estabilidade de 83% após duas horas de incubação à 50°C e 60% à 60°C. Sua ação foi reduzida na presença de EDTA.

- A FPase apresentou melhor atividade em pH 8 e temperatura de 45°C, possui estabilidade de 60% após duas horas de incubação à 50°C e 60°C. Sua ação foi reduzida na presença do íon NH^{-4}.

- A Xilanase apresentou melhor atividade em pH 6 e temperatura de 70°C, possui estabilidade de 75% após oito horas de incubação à 50°C e estabilidade de 55% após oito horas de incubação à 50°C. Sua ação foi reduzida na presença do íon Mn^{+2}.

- No teste de atividade estimou-se as massas moleculares das celulases (39, 21 e 17 KDa) e das xilanases (39, 21, 18 e 17 KDa)

- Nos ensaios de hidrólise enzimática as melhores taxas de conversão do BCA em xilose e glicose foram obtidas quando a temperatura das duas horas iniciais do ensaio estava a 70°C, nessa reação houve conversão de 19 % em glicose e 62,9 % em xilose.

7. PERSPECTIVAS

- Purificar as enzimas presentes no sobrenadante de cultura para permitir a caraterização dos parâmetros cinéticos de cada atividade.

- Analisar as enzimas Avicelase, CMCase, FPase e Xilanase quanto a capacidade de formar oligômeros e apresentar maior termoestabilidade;

- Melhorar o processo de sacarificação testando diferentes substratos lignocelulósicos, diferentes métodos de pré-tratamento e diferentes extratos enzimáticos;

- Produzir as enzimas em fermentador, otimizando as condições de cultivo para obter uma elevada produtividade enzimática.

8. REFERÊNCIAS BLIBLIOGRÁFIAS

ADNEY, B.; BAKER, J. **Measurement of cellulase activities.** Chemical Analysis and Testing Task: Laboratory Analytical Procedure. Golden, CO: National Renewable Energy Laboratory, 11 p. (NREL LAP, 006).

ALANI, F., ANDERSON, W.A., YOUNG, M.M. (2008) **New isolate of Streptomyces sp. With novel thermoalkalotolerant cellulases.** Biotechnol Lett 30: 123-126

ANTANOPOULUS, V.T.; HERNANDEZ, M; ARIAS, M.E.; MAVRAKOS, E. (2001) **The use of extracellular enzymes from Streptomyces albus ATCC 3005 for the bleaching of eucalyptus kraft pulp.** *Applied Microbiology and Biotechnology*,57:92-97.

ARAI, T. (1997) **What are actinomycetes?** In: Miyadoh, S.; Hamada, M.; Hotta, K.; Kudo, t.; Seino, A; Vobis, G. e Yokota, A. Atlas de actinomyces. Japan: The society of Actinomycetes, Asakura Publishing CO., ltda, p. 176 – 177.

ARANTES, V., & SADDLER, J. (2010). **Access to Cellulose Limits the Efficiency of Enzymatic Hydrolysis: The Role of Amorphogenesis.** *Biotechnology for Biofuels* , 3(4):1-11.

AUGUSTINE, S., & BHAVSAR, S. a. (2005). **A nonpolyene antifungal antibiotic from Streptomyces PU 23.** *J. Biosci. 30, 201-211.* , 30:201-211.

BASTAWDE, K. (1992). **Xylan structure, microbial xylanases, and their mode de action.** *World J. of Microbiol and biotechnol.* , 8:353 – 368.

BAYER, E. C. (1998a). **Cellulose, cellulases and cellulosomes.** *Curr. Opin. Struct. Biol.* , 8,:548–557.

BAYER, E. S. (1998b). **Cellulosomes—structure and ultrastructure.** *J. Struct. Biol.*, 124:221–234.

BAYER, E., & LAMED, R. (1992). **The cellulose paradox: pollutant par excellence and/or a reclaimable natural resource? Review.** *Biodegradation* , 3 (2 – 3): 171-188.

BEG, Q., KAPOOR, M., MAHAJAN, L., & HOONDAL, G. (2001). **Microbial xylanases and their industrial applications: a review.** *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56:326-338.

BIELY, P., VRSANSKA,M., TENKANEM, M. & KLUEPFEL, D. (1997) **Endo-beta-1,4-xylanase families: differences in catalytic properties.** *Journal of Biotechnology*, 57: 151-166.

BLUM, D.L., LI, X.L., CHEN, H., LJUNGDHL, L.G. (1999) **Characterization of an acetyl xylan esterase from the anaerobic fungus Orpinomyces sp. Strain PC-2.** Appl Environ Microbiol 65: 3990-3995.

BORASTON, A., BOLAM, D., GILBERT, H., & DAVIES, G. (2004). **Carbohydrate-Binding Modules: F ne-Tuning Polysaccharide Recognition.** *Biochemical Journal*, 382(3):769–781.

BRADFORD, M. (1976) **A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-glye binding.** *Analytical Biochemistry*,72:248-254.

BROWN, R. I., GRUBER, P., & KAMM, M. (2005). (Eds). **Biomass refineries based on hybrid thermochemical/biological processing – an overview, in biorefineries, biobased industrial processes and products.** *Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag* .

BUANAFINA, M. (2009). **Feruloylation in Grasses: Current and Future Perspectives.** *Molecular Plant* , 2(5):861–872.

BYRNE, K. L. (1999). **Isolation of a cDNA encoding a putative cellulase in the red clawcrayfish Cherax quadricarinatus.** *Gene* , 239:317–324.

CARVALHO, W.R. (2008) **Caracterização Bioquímica da Endoxilanase Recombinante (HXYN2r) do fungo termofílico *Humicola grisea* var. *thermoidea* e sua aplicação na sacarificação de resíduos agrícolas.** Tese (Doutorado), Universidade Federal de Goiás, Goiânia-GO.

CARVALHO, W.R. (2003) **Produção e Purificação de Xilanase de 23 KDa do fungo termofílico *Humicola grisea* var. *thermoidea*.** Dissertação (Mestrado), Faculdade de Engenharia Química de Lorena-SP.

CHAUDHARY, P.; DEOBAGKAR, D.N.(1997) **Characterization of cloned endoxylanase from Cellulomonas sp. NCIM 2353 expressed in Escherichia coli.** *Current Microbiology*,34: 273-279.

CHELLAPANDI, P. & HIMANSHU, M.J. (2008). **Production of endoglucanase by the native strains of streptomyces isolates in submerged fermentation.** *Brazilian Journal of Microbiology* , 39:122-127. .

COLLINS, T., GERDAY, C., & FELLER, G. (2005). **Xylanases, xylanases familes and extremophilic xylanases.** *FEMS Microbiology reviews*, 29:5-23.

CONNERTON, I.; CUMMINGS, N.; HARRIS, G.W.; DEBEIRE, P.; BRETON, C. (1999) **Promoter analysis of the acetate-inducible isocitrate lyase gene (acu-3) from Nerospora crassa.** *Biochimimica et Biophysica Acta,*1433:110-121.

COUGHLAN, M. P., & LJUNGDAHL, L. G. (1988). **Comparative Biochemistry of Fungal and Bacterial Cellulolytic Enzyme Systems.** *FEMS Symposium (Biochem. Genet. Cellul. Degrad.)* , 3:11-30.

COWLING, E. (1963). **Structural features of cellulose. In: Reese, E.T. Enzymic hydrolysis of cellulose and Related Materials.** *The Macmillan Company, New York* .

DAROIT, D. (2007). **Caracterização de uma β-glicosidase de Monascus purpureus.** *Dissertação de mestrado, Faculdade de Agronomia, UFGRS.*

DEMIRBAS, A. (2008). **Products from Lignocellulosic Materials via Degradation Processes.** *Energy Sources* , 30:27-37.

DENG, P.; LI, D.; CAO, Y.; LU, W.; WANG, C.(2006) **Cloning of a gene encoding and acidophilic endo-β-1,4-xylanases obtained from Aspergillus niger CGMCC1067 and constitutive expression in Pichia pastoris.** *Enzyme and Microbial Technology,* 39:1096-1102.

DIETZ, A.; MATHEWS, J. (1971) **Classification of Streptomyces spore surfaces into five groups.** *Applied Microbiology,*21(3):527-533.

DILLON, A. (2004). **Celulase. In: SAIS, S. & PIETROR, C.R.L. Enzimas como agentes biotecnológicos.** *Riberão Preto: Legis Summa* , cap 14, p. 241-268.

EBRINGEROVA, A. H. (2005). **Hemicellulose.** Dv. Polym. Sci. 186, 1-67. *Dv. Polym. Sci.* , 186:1-67.

EL-TARABILY, K. (2006). **Rhizosphere-competent isolates of streptomycete and non-streptomycete actinomycetes capable of producing cell-wall-degrading enzymes to**

control Pythium aphanidermatum damping-off disease of cucumber. *Can J Bot* , 84: 211-222.

EL-TARABILY, K., SOLIMANA, M., NASSARA, A., AL-HASSANIA, H., SIVASITHAMPARAM, K., & MCKENNAD, F. a. (2000). **Biological control of Sclerotinia minor using a chitinolytic bacterium and actinomycetes.** *Plant Pathol* , 49:573-583.

ENSING, J.C. (1978) **Formation, properties and germination of Actinomycetes spores.** *Annual Review of Microbiology*,32:185-219.

FERREIRA, E. (2004). Xilanase. In: SAID, S. & PIETROR, C.R.L. **Enzimas como agentes biotecnológicos.** *Riberão Preto: Legis Summa* , cap 8, p. 137-148.

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

GHOSE, T. (1987) **Measurement of cellulase activities.** Pure & Appl Chem 59:257–268

GLAZER, A., & NIKAIDO, H. (2007). **Biomass, In: Microbial Biotechnology: Fundamentals of Applied Microbiology, Glazer, A.N., Nikaido.** *Cambridge Univerty Press, New York* , 430-455.

GNANSOUNOU, E., & DAURIAT, A. (2010). **Techno-economic analysis of lignocellulosic ethanol: A review.** *Bioresource Technology* , 101:4980-4991.

GOLDEMBERG, J. (2007). **Ethanol for a sustainable energy future.** *Science* , 808:315.

GOLDEMBERG, J., & GUARDABASSI, P. (2009). **Are biofuels a feasible option?** *Energy Policy v 37 10-14 2009* , 37:10-14 .

GOODFELLOW, M. A.; WILLIAMS, S.T. (1983). **Ecology of actinomycetes.** *Annu Rev Microbiol* , 37:189-216.

GOMES, R.C.; SEMEDO, L.T.A.S.; SOARES, R.M.A.; ALVIANO, C.S.; LINHARES, L.F.; COELHO, R.R.R. (2000) **Chitinnolytic activity of actinomycetes from a cerrado soil and their potential in biocontrol.** *Lett. Appl. Microbiol., 30:146-150.*

GUPTA, R.; SAXENA, R.K.; CHATUVERDI, P.; VIRDI, J.S. (1995) **Chitinase production by Streptomyces viridificans: its potential in fungal cell wall lysis.** *Journal os Applied Biotechnology*,78:378-383.

HAMELINCK, C. H. (2005). **Ethanol from Lignocellulosic Biomass: Techno-Economic Performance in Short-, Midlle- and Long-Term.** *Biomass Bioenergy* , 28:384-410.

HAMMEL, K. E., & CULLEN, D. C. (2008). **Role of Fungal Peroxidase in Biological Lignolysis.** *Current Opinion Plant Biology* , 11:349-355.

HANH-HAGERDAL, B., GALBE, M., GORWA-GRAUSLUND, M., LIDEN, G., & ZACCHI, G. (2006). **Bio-ethanol the fuel of tomorrow from the residues of today.** *Trends Biotechnol. 2006 12:549-556* , 12:549-556.

HARRIS , G.W.; PICCKERSGRILL, R.W.; CONNERTON, I.; DEBEIRE, P.; TOUZEL, J.; BRETON, C.; PÉREZ, S. (1997) **Strutural basis of the properties of an industrially relevant thermophilic xylanase.** *Proteins: Structure, Function and Genetic,* 29:77-86.

HAYASHIA, K.; KAWAHARAB, K.; NAKAIC, C.; SANKAWAB, U.; SETOD, H.; HAYASHIB, T. (2000)**. Evaluation of (1R,2R)-1-(5'-methylfur-3'-yl)propane-1,2,3-triol, a sphydrofuran derivative isolated from a *Streptomyces sp*., as an anti-herpes virus drug.** *J. Antimic. Chemoth,* 46:181-189.

HILDEN, L. D. (2003). **Use of a fluorescence labelled, carbohydrate-binding module from Phanerochaete chrysosporium Cel7D for studying wood cell wall ultrastructure.** *Biotechnol. Lett. 25, 553–558.* , 25:553–558.

HOLT, J.G.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H.A.; STANLEY, J.T.; WILLIAMS, S.T. (1994) (eds). **In: Bergey's manual of determinative bacteriology.** 9ed. Williams & Wilkins, Co.: Baltimore.

HON, D. (1994). **Cellulose: a random walk along its historical path.** *Cellulose* , 1:1–25.

HOSHINO, E.; WADA, Y.; NISHIZAWA, K. (1999) **Improvements in the hygroscopic properties of cotton cellulose by treatment with an endo-type cellulase from Streptomyces sp. KSM-26.** *J Biosc Bioeng,* 88: 519–525.

HUANG, Y.; LI, W.; WANG, L.; LANOOT, B.; VANCANNEYT, M.; RODRIGUEZ, C.;

LEE, M.D.; ODOM, J.M.; BUCHANAN JR., R.J. (1998) **New perspectives on microbial dehalogenation of chlorinated solvents: Insights from the field.** *Annual Review of Microbiology,* 52:423-452.

LI, R.; KHALEELI, N. & TOWNSEND, C.A. (2000) **Expransion of the clavulanic acid gene cluster: Identfication and in vivo functional analysis of three new genes required for biosybthesis of clavulanic acid by *Streptomyces clavuligerus.*** *J. Bacteriol,* 182(14)4087-4095.

LIU, Z.; SWINGS, J.; GOODFELLOW, M. (2004) **Streptomyces glauciniger sp. nov., a novel mesophilic streptomycete isolated from soil in south China.** International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 54,:2085–2089

LOCCI, R.; SHARPLES, G.P. (1984) **Morphology.** In: GOODFELLOW, M.; MORDARSKI, M.; WILLIAMS, S.T. *Lodon. Academic Press*,cap3, p.165-199.

LOCCI, R. (1976) **Developmental micromorphology of actinomycetes.** In: Arai, T. (ed) Actinomycetes: The boundary microorganisms. Baltimore. Univerty Park Press: 249-297.

HSU, J., & TAN, C. S. (1993). **Separation of ethanol from aqueous solution by a method incorporating supercritical CO2 with reverse osmosis.** *Journal of Membrane Science 81:273-285 1993* , 81:273-285 1993.

HUANG, S., WANG, X., YAN, Y., Wang, J., Zhang, J., LIU, C., et al. (2012). **Neaumycin: A New Macrolide from Streptomyces sp. NEAU-x211.** *Organic Letters* , 14:5 1254–1257.

HSU, C.L., CHANG, K.S., LAI, M.Z., CHANG, T.S., CHANG, Y.H., JANG, H.D. (2011) **Pretreatment and hydrolysis of cellulosic agricultural wastes with a cellulase-producing strep for bioethanol production.** Biomass and Bioenergy 35, 1878-1884.

IBRAHIM, S., & EL-DIWANY, A. (2007). **Isolation and Identification of New Cellulases Producing Thermophilic Bacteria from an Egyptian Hot Spring and Some Properties of the Crude Enzyme.** *Aust. J. Basic Appl. Sci. 1(4): 473-478.* , 1(4): 473-478.

JANG, H.; CHEN, K. (2003) **Production and characterization of thermostable cellulases from Streptomyces transformant T3–1.** *World J Microbiol Biotechnol* 19:263–268

JORGENSEN, H., KRISTENSEN, J., & FELBY, C. (2007). **Enzymatic Conversion of Lignocellulose into Fermentable Sugars: Challenges and Opportunities.** *Biofuels Bioproducts and Biorefining-Biofpr.* , 1:119–134.

KALYANI, S., & SMITHA, B. S. (2008). **Pervaporation separation of ethanol-water mixtures though sodium alginate membranes.** *Desalination* , 229:68-81 .

KOVACS, K.; MACRELLI, S.; SZAKACS, G.; ZACCHI, Z. (2009) **Enzymatic hydrolysis of steam-pretreated lignocellulosic materials with *Trichoderma atroviride* enzymes produced in-house.** *Biotechnology for Biofuels*, 2:14.

KUHAD, R., SINGH, A., & ERIKSSON, K. (1997). **Microorganisms and Enzymes Involved in the Degradation of Plant Fiber Cell Walls.** *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology* , 57:45–125,.

KULKARNI, N., SHENDYE, A., & R.A.O.M. (1999). **Molecular and biotechnological aspects of xylanases.** *FEMS Microbiology Reviews* , 23:411-456.

LAEMMLI, U.K. (1970) **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** Nature 227:680-685

LEE, T.S.; MUFORD, D.;ROMERO, R.; LAMME, V.A.F. (1998) **The role of the primary visual cortex in higher level vision.** *Vision Research* 38 :2429–2454

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

LIN, Y., & TANAKA, S. (2006). **Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects.** *Appl Microbiol Biotechnol.* , 69:627-642 .

LOCCI, R. (1984) **Streptomycetes and related genera. In: Williams S (ed) Bergey's manual of systematic bacteriology, vol 4.** Williams & Wilkins, Baltimore, pp 2451– 2508

LYND, L. W. (2002). **Microbial Cellulose. Utilization: Fundamentals and Biotechnology.** *Microbiology and Molecular biology reviews* , 66: 506-577.

MACEDO, I., & SEABRA, J. d. (2008). **Green house gases emissions in the production and use of ethanol from sugarcane in Brazil: The 2005/2006 averages and prediction for 2020.** *Biomass and bioenergy.* , 32:585-597.

MARTIM, P. et al. (2000) **Identification and typing *Streptomyces* strains evaluation of interspecific, intraspecific and intraclonal differences by RAPD fingerprinting.** *Research Microbiology*, Tokio, Japan, 151:853-864.

MARTINEZ, A., RUIZ-DUEÑAS, F., MARTINEZ, M., DEL RIO, J., & GUTIÉRREZ, A. (2009). **Enzymatic Delignification of Plant Cell Wall: From Nature to Mill.** *Current Opinion in Biotechnology* , 20:348-357 .

MELLOULI, L. A.-M., & BEJAR, S. (2003). **Isolation, purification and partial characterization of antibacterial activities produced by a newly isolated Streptomyces sp. US24 strain.** *Res. Microbiol.* , 154:345-352 .

MELO, G. (2010). **Produção de celulases e xilanases pelo fungo termofílico Humicola grisea var. thermoidea em diferentes substratos lignocelulósicos.** *(Dissertação de Mestrado) Universidade Federal de Goiás.*

MILAGRES, A. &. (1994). **Production of xylanases from Penicillium janthinellum and its use in the recovery of cellulosic textil fibers.** *Enzyme and Microbial Technology* , 16, 627-632.

MILLER, L. (1959) **Use of dinitrosalicylic acid reagent for determinationof reducing sugar.** *Anal Chem*, 31:426–428.

MINNIKIN, D.E.; O'DONNELL, A.G. (1984) **Actinomycetes envelope lipid and peptidoglycan composition.** In: GOODFELLOW, M.; MORDARSKI, M.; WILLIAMS, S.T. (ed).**The biology of actinomycetes.** *London Academic Press,* cap. 7:337-388.

MOONEY, C., MANSFIELD, S., TOUHY, M., & SADDLER, J. (1998). **The Effect of Initial Pore Volume and Lignin Content on the Enzymic Hydrolysis of Softwoods.** *Bioresource Technology* , 64(2):113-119.

MOSIER, N., WYMAN, C., DALE, B., ELANDER, R., LEE, Y., HOLTZAPPLE, M., et al. (2005). **Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass.** *Bioresource Technology* , 96:673-686 .

MTUI, G. (2009 8:1398-1415). **Recent Advances in Pretreatment of Lignocellulosic Wast and Production of Value Added Products.** *African Journal of Biotechnology* , 8:1398-1415.

NADIA, H. A., AMAL, M.A. & ABEER, A.K. (2010). **Xylanase production by Streptomyces lividans (NRC) and it's application on waste paper.** *Australian Journal of basic and Applied Sciences* , 4:1358-1368.

NASCIMENTO, R. C.-C. (2002). **Production and partial characterization of xilanase from Streptomyces sp strain AMT-3 isolated from Brazilian cerrado soil.** *Enzyme and Microbial Technology* , 31:549-555.

NASCIMENTO, R. J. (2008). **Brewr´s spent grain and corn steep liquor as substrates for cellulolytic enzymes production by Streptomyces malaysiensis.** *Letters in Applied Microbiology* , 48:529-535.

NASCIMENTO, R. M.-C. (2003). **A novel strain of Streptomyces malaysiensis isolated from Brazilian soil produces high endo-β-1,4-xylanase titres.** *World Journal of Microbiology and Biotechnology.* , 19:879-881.

NASS, L., PEREIRA, P., & ELLIS, D. (2007). **Biofuels in Brazil: an overview.** *Crop Science* , 47:2228-2237.

NIEDUSZYNSKI, I. P. (1970). **Crystallite size in natural cellulose.** *Nature* , 225:273–274.

NOGUEIRA, A., & VENTURINI FILHO, W. (2005). **Aguardente de cana.** *Botucatu Faculdade de Ciências Agronômicas, UNESP* .

OLIVEIRA, G. (2007) **Expressão heteróloga do gene de celobiohidrolase (cbh1,2) do fungo Humicola grisea var. thermoidea em Pichia pastoris.** *Dissertação de Mestrado em Biologia, Universidade Federal de Goiás.*

OG, L., CHOI, G., CHOI, Y., JANG, K., PARK, D., & KIM, C. a. (2008). **Isolation and characterization of endophytic actinomycetes from Chinese cabbage roots as antagonists to Plasmodiophora brassicae.** *J Microbiol Biotechnol* , 18:1741-1746.

OMETTO, A., & ROMA, W. (2010). **Atmospheric impacts of the life cycle emissions of fuel ethanol in Bazil: based on chemical energy.** *Journal of Cleaner Production* , 18:71-76.

PANDEY, A. (1995) **Glucoamylase research: An overview.** *Starch,* 47(11):439-445.

PATEL, R.N. (1998) **Tour de placitaxel: Biocatalysis for semisynthesis.** *Annual Review of Microbiology,* 98:361-395.

PECZYNSKA-CZOCH, W.; MORDARSKI, M. (1988) **Actinomycetes enzymes.** In: GOODFELLOW, M.; WILLIAMS, S.T.; MORDARSKI, M. (eds). Actinomycetes in biotechnology. *Academic Press,*cap 6, p. 219-283.

PERSSON, P. H. (2004). **Silica nanocasts of wood fibers: a study of cell-wall accessibility and structure.** *Biomacromolecules 5, 1097–1101.* , 5:1097–1101.

PETERES, S. et al. (2000) **Sucession of microbial communities during hot composting as detected by PCR-single-stand-conformation polymorphism-based genetic profiles of small- subunit rRNA genes.** *Applied and Environmental Microbiology,* Washington, 66 (3): 930-936.

PIETROBON, V.C.; MONTEIRO, R.T.R.; POMPEU, G.B.; POGGI, E.; Lopes, B.M.L.; AMORIM, H.V.; CRUZ, S.H.; VIÉGAS, E.K.D. (2011) **Enzymatic Hydrolysis of**

Sugarcane Bagasse Pretreated with Acid or Alkali. Brazilian Archives of Biology and Technology, 52 (2):229-233.

PLANO NACIONAL DE AGROENERGIA 2006-2011. **Ministério da Agricultura e Pecuária.** (2005). Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuaria. 120.

POHANKA, A. (2006). **Antifungal antibiotics from potential biocontrol microorganisms.** *Ph.D. Thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden.*

POLIZELI, M. R. (2005). **Xylanases from fungi: properties and industrial applications.** *Applied Microbiology and Biotechnology* , 67: 577-591.

POMPEU, G. (2010). **Comportamento enzimático de quatro fungos lignocelulolíticos crescidos em bagaço e palha de cana-de-açúcar e expostos a duas concentrações de nitrogênio, visando à produção de etanol.** *Tese de Doutorado. Centro de Energia Nuclear na Agricultura da USP* .

PRADE, R. (1995). **Xylanases: from biology to biotechnology.** *Biotechnology and Genetic Engineering Review* , 13:100-131.

PRASAD, S., & SINGH, A. &. (2007). **Ethanol as an Alternative Fuel from Agricultural, Industrial and Urban Residues. Industrial and Urban Residues.** *Resources, Conservation and Recycling.* , 50:1-39.

QUIRÓS, L.M.; CARBAJO, R.J.; BRAFIA, A.F.; SALAS, J.A. (2000) **Glycosylation of macrólide antibiotics: Purification and kinetic studies of a macrolide glycosyl tranferase from Streptomyces antibioticus.** *J.Biol. Chem.*275:11713-11720.

RAGAUSKAS, A., WILLIAMS, C., DAVISON, B., BRITOVSEK, G., CAIRNEY, J., ECKERT, C. (2006). **The Path Forward for Biofuels and Biomaterials.** *Science* , 311:484-489.

RIPOLI, T., & RIPOLI, M. (2004). **O setor sucroalcooleiro no Brasil. Biomassa de cana-de-açúcar: colheita, energia e ambiente.** *USP, ESALQ* , 1:302.

ROBERTS, M.A.; CRAWFORD, D.L. (2000) **Use of randomly amplied polymorphic DNA as a means of developing genus-and strains-specific Streptomyces DNA probes.** *Applied and Environmental Microbiology* Washington, p. 2555-2564.

ROSSETO, F. (2011). **Caracterização bioquímica, biofísica e estrutural da principal endoglucanase secretada por xanthomonas campestris PV. Campestris ATCC33913.** *Dissertação (Mestrado) Intituto de Física de São Carlos Universidade de São Paulo* .

RUEGGER, M. T.-T. (2001). **Isolamento de fungos produtores de ácido γ-linolênico de solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, SP.** *Revista Ciências Farmacêuticas, São Paulo.* , 23 (1): 49-58.

RUIZ-DUEÑAS, F., & MARTÍNEZ, A. (2009). **Microbial Degradation of Lignin: How a Bulky Recalcitrant Polymer is Efficiently Recycled in Nature and How We Can Take Advantage of this.** *Microbial Biotechnology* , 2(2):164–177.

SALAMONI, S. (2005). **Produção e caracterização de celulases secretadas po Streptomyces sp. isolado de processos de compostagem.** *Dissertação Porto Alegre/RS* .

SANCHEZ, C. (2009). **Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi.** *Biotechnol Adv* , 27 (2): 185-194.

SANDGREN, M., & HIBERG, J. S. (2005). **Structural and Biochemical Studies of GH Family 12 Cellulases: Improved Thermal Stability and Ligand Complexes.** *Progress in Biophysics and Molecular Biology* , 89(3): 246-291.

SEMBIRING, L. (2009) **Molecular Phylogenetic Classification of Streptomycetes Isolated from the Rhizosphere of Tropical Legume (*Paraserianthes falcataria*) (L.) Nielsen.** *HAYATI Journal of Biosciences*, 16 (3):100-108

SCHREMPF, H.; WALTER, S. (1995) **The cellulolytic system of *Streptomyces retyiculi*.** *Int. J. Macromolecules*, 15: 353-355.

SEMEDO, L.; GOMES, R.; BON, E.; SOARES, R.; LINHARES, L.; COELHO, R. (2000) **Endocellulase and exocellulase activities of two *Streptomyces* strains isolated from a forest soil.** *Appl Biochem Biotechnol* 84:267–276

SHAIKH, S.A.; DESHPANDE, M.V. (1993) **Chitinolytic enzymes: their contribuition to basic an applied research.** *World. J. Microbiol. and Biotechnol*,9:468-475.

SHALLOM, D., & SHOHAM, Y. (2003). **Microbial Hemicellulases.** *Current Opinion in Microbiology* , 6:219-228.

SILVA SOUSA, C., & FERMINO SOARES, A. a. (2008). **Characterization of Streptomycetes with potential to promote plant growth and biocontrol.** *Sci Agric (Piracicaba, Braz)* , 65, 50-55.

SINGH, S., TYAGI, C., DUTT, D., & UPADHYAYA, J. (2009). **Production of High Level of Cellulase-Poor Xylanases by Wild Strains of White-Rot Fungus Coprinellus Disseminatus in Solid-State Fermentation.** *New Biotechnology* , 26(3-4):165-170.

SINGHANIA, R. S. (2010). **Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases.** *Enzyme and Microbial Technology* , 46:541–549.

SIQUEIRA, F.G. (2010) **Resíduos Agroindustriais com Potencial para a Produção de Holocelulases de Origem Fúngica e Aplicações Biotecnológicas de Hidrolases.** Tese de Doutorado. Universidade de Brasília.

SOLOMON, B., BARNES, J., & HALVORSEN, K. (2007). **Grain and cellulosic ethanol: history, economics and energy policy.** *Biomass Bioenergy* , 31:416-425.

SPAIN, J.C. (1995) **Biodegradation of nitroaromatic compounds.** *Annual Review of Microbiology*, 49:523-555.

STEELE, D.B.; and STOWERS, M.K. (1991) **Techniques for selection of industrially important microorganisms.** *Annual Review of Microbiology, 45: 89 -106.*

SUKUMARAM, R. S. (2009). **Cellulase production using biomass feed stock and its application in lignocelluloses saccharification for bio-ethanol production.** *Renewable Energy* , 34:421-424.

SUNNA, A., & ANTRANIKIAN, G. (1997). **Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria.** *Critical Reviews in Biotechnology* , 17:39-67.

SUTCLIFFE, R., & SADDLER, J. (1986). **The Role of Lignin in the Adsorption of Cellulases During Enzymic Treatment of Lignocellulosic Material.** *Biotechnology And Bioengineering Symposium* , 749-762.

TAO, Y.M.; XU, X.Q.; MA, S.J.; LIANG, G.; WU, X.B.; LONG, M.N.; CHEN, Q.X. (2011) **Cellulase Hydrolysis of Rice Straw and Inactivation of Endoglucanase in Urea Solution.** *Journal of agricultural and food chemistry,* 59:10971-10975.

TAVARES, E. (2010). **Clonagem, expressão heteróloga, purificação e caracterização funcional da endoglicanase A de Aspergillus nidulan.** Dissertação (Mestrado) Universidade de Brasília. *Dissertação (Mestrado) Universidade de Brasília.*

THOMPSON, N. (1983). **Hemicellulose as a biomass resource. In: Wood and Agricultural Residues; research on use for feed, fuels and chemicals.** *Soltes, J. (ed), J. New York, Academic Press* , p. 101-119.

TOMME, P. W. (1995). **Cellulose hydrolysis by bacteria and fungi.** *Adv. Microb. Physiol.* , 37:1-81.

ÚNICA, U. D. (2010). ***www.unica.com.br*.** Acesso em 10 de fev de 2012

VINHA, F.N.M.D., OLIVEIRA, M.P.G., FRANCO, M.N., MACRAE, A., BON, E.P.S., NASCIMENTO, R.P. and COELHO, R.R.R. (2011) **Cellulase production by *Streptomyces viridobrunneus* SCPE-09 using lignocellulosic biomass as inducer substrate.** Appl Biochem Biotechnol 164:256-267.

VOBIS, G. (1997) **Mophology of actinomycetes.** In: MIYADOH, S.; HAMADA, M.; HOTTA, K.; KUDO, T.; SEINO, A.; VOBIS, G.; YOKOTA, A. Atlas of actinomycetes. Japan: The Society of Actinomycetes, Askura Publishing CO., ltda, p. 180-191.

WALTER, S., SCHREMPF, H. (1996) **Physiological studies of cellulase (avicelase) synthesis in *Streptomyces reticuli*.** Applied and Environmental Microbiology 62, 1065-1069.

WANG, M., & WANG, J. &. (2011). **Lignocellulosic Bioethanol: Status and Prospects.** *Energy Sources* , 33:612–619.

WANNER, L. A. (2007). **A new strain of Streptomyces causing common scab in potato.** *Plant Dis.*, 91:352-359.

WATANABE, H. N. (1998). **A cellulase gene of termite origin.** *Nature* , 394:330–331.

WAKAECHUK, W.W.; SUNG, W.L.; CAMPBELL, R.L.; CUNNINGHAM, A.; WATSON, D.C.; YAGUCHI, M. (1994) **Thermostabilization of the Bacillus circulans xylanase by the introduction of disulfide bonds.** *Protein Eng.* 7(11):1379-1386.

WESTBYE, P., KOHNKE, T., GLASSER, W., & GATENHOLM, P. (2007). **The Influence of Lignin on the Selfassembly Behavior of Xylan Rich Fractions from Birch.** *CelluloseCellulose, Vol.14, pp. 603-* , 14:603-613.

WILLIAMS, S.T.; LANNING, S; WELLINGTON, M.H. (1984) **Ecology of actinomycetes.** In: GOODFELLOW, M., MORDARSKI, M. E WILLIAMS, S.T. (ed). The biology of actinomycetes. Lodon. Academic Press: 481-527.

WILLIAMSON, R. B. (2002). **Towards the mechanism of cellulose synthesis.** *Trends Plant Sci.* , 7:461-467.

WOODWARD, J. (1984). **Xylanases: functions, properties and applications.** *Enzyme and Fermentation Biotechnology* , 8:9-30.

YOON, K.Y.; WOODAMS, E.E.; HANG, Y.D. (2006) **Enzymatic production of pentoses from the hemiceluloses fraction of corn residues.** *LWT,* 39:387-391.

YOKOTA, A.(1997) **Phylogenetic relationship of actinomycetes.** In: MIYADOH, S.; HAMADA, M.; HOTTA, K.; KUDO, T.; SEINO, A.; VOBIS, G.; YOKOTA, A. Atlas of actinomycetes. Japan: The Society of Actinomycetes, Asakura Publishing CO., ltda, p. 194-197.

ZANG, J.; SIIKA-AHO, M.; PURANEN, T,; TANG, M.; TENKANEN, M., VIIKARIA, L. (2011) **Thermoestable recombinant xylanases from Nonomuraea fleruosa and Thermoascus aurantiacus show distinct properties in the hydrolysis of xylan and pretreated wheat straw.** *Biotechnology for Biofuels,* 4:12-25.

XU, B. H. (2000). **Purification, characterization and amino-acid sequence analysis of a thermostable, lowmolecular mass endo-b-1,4-glucanase from blue mussel, Mytilus edulis.** *Eur. J. Biochem.* , 267:4970–4977.