



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS - UFAM
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM BIOTECNOLOGIA - PPGBIOTEC**

**Produção e Caracterização de Celulases
Extracelulares Produzidas por
Actinobactérias**

Rafael Lopes e Oliveira

Manaus - AM
2015

Rafael Lopes e Oliveira

**Produção e Caracterização de Celulasas
Extracelulares Produzidas por
Actinobactérias**

Tese apresentada como o Trabalho
de Conclusão do Curso de pós-
graduação em Biotecnologia em
nível de doutorado, da
Universidade Federal do
Amazonas - UFAM.

Orientador: Edmar Vaz de Andrade, **Prof. Dr.**

Co-Orientadora: Leonor Alves de Oliveira da Silva, **Prof. Dr**

Co-Orientador: Sergio Duvoisin Junior, **Prof. Dr.**

**Manaus - AM
2015**

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

O48p Oliveira, Rafael Lopes e
Produção e Caracterização de Celulases Extracelulares
Produzidas por Actinobactérias / Rafael Lopes e Oliveira. 2015
132 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Edmar Vaz de Andrade
Coorientadora: Leonor Alves de Oliveira da Silva
Coorientador: Sergio Duvoisin Junior
Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Carboximetilcelulose. 2. Streptomyces capoamus. 3. endoglucanases. 4. planejamento experimental. I. Andrade, Edmar Vaz de II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

*“Os vencedores jamais desistem, os
que desistem jamais vencem”*

*“O cansaço físico, mesmo que suportado forçosamente,
não prejudica o corpo, enquanto o conhecimento imposto à
força não pode permanecer na alma por muito tempo.”*

Platão

"In Memória"

*À minha querida Vó Maria, a pessoa
mais sábia que conheci, pela dedicação e
tempo que esteve ao meu lado.*

Dedico

*À meu Pai, meu grande incentivador, que sempre me
motivou e deu força para que eu continuasse nessa
jornada em busca do conhecimento e crescimento pessoal.*

Te amo....

AGRADECIMENTOS

É bem complicado escrever estas palavras sem ser injusto, pois foram muitos os que me ajudaram a alcançar este objetivo. Existem aqueles que trabalharam efetivamente comigo, dia a dia na bancada, outros acompanharam à distancia minhas angustias, sofrimentos e alegrias. Hoje acredito que todos estão felizes com minha conquista. E apesar de diversas vezes ter pensado em desistir, sempre tive alguém ao meu lado pessoas com palavras de encorajamento. Guardo excelentes lembranças em meu coração desta temporada. A superação dos obstáculos e a alegria dessa conquista devo àqueles que sempre estiveram comigo, me apoiaram e acreditaram que isso seria possível:

- Agradeço a Deus por tudo que tem me proporcionado ao longo da minha vida...
- Aos meus Pais, Firmo Neto & Graça pelo amor, companheirismo, afeto e paciência. Além dos sacrifícios que tiveram que fazer para que me proporcionassem uma formação digna...
- Aos meus Irmãos Renan e Renato que torcem por mim e deram todo o suporte para que eu realizasse este trabalho...
- À minha avó Magui e a todos os meus tios, tias, primos e primas que me apoiam e acreditam no meu sucesso...
- À minha Orientadora, Prof^ª. Dr^ª. Leonor Alves que foi muito mais que uma orientadora, foi um anjo que Deus colocou em meu caminho para me guiar, e sem esse anjo jamais teria terminado este trabalho.
- A Prof^ª. Dr^ª Patrícia Albuquerque e Prof. Dr. Sergio Duvoisin Jr. pela amizade, apoio, suporte e auxílio na realização deste trabalho...
- À Meu Co-orientador Prof. Dr. Edmar Andrade por toda a paciência, incentivo e atenção...
- À Prof^ª. Dr^ª. Norma Gusmão que me recebeu em seu laboratório, confiou no meu trabalho e me fez sentir em casa todo o tempo que precisei utilizar seu laboratório....

- À Camila Borba pela amizade, paciência e por estar sempre dispostos a me ajudar sem medir esforço e incansavelmente na realização deste trabalho... pelas horas de experimento compartilhadas, pelas broncas, por me ensinar a ter mais paciência, e por me fazer amadurecer no âmbito profissional e pessoal. Suas “lagrimas” foram valiosas durante a caminhada. Obrigada por sempre dizer que eu iria conseguir..
- Aos integrantes do departamento de antibióticos que se tornaram meus amigos e que fizeram da minha estada em Recife muito mais agradável, os quais eu faço questão de agradecer nominalmente: Bruninha, Diana (Guguio), Erik (Gordinho Chato), Eveline, Dr^a. Flavia, Geo, Glezinha, Igor, Jaci, Mama, Maria Cláudia, Nel, Nizza, Dr. Pérsio (Negão), Raul (doido), Robinho (O Trabalhador), Graci, Jessica, Milca, Nataliane, Polly, Bianca, Iasmim, Leila, Manuela, Welma, Vania, Myrella, Angela, Rafael Ferrer, Prof^a. Glaucia, Prof^a. Magali, Marcela e Fátima...
- Aos Residentes das Palmeiras... Rafael Primerito, Paulinha, Aline, Cachorão, Beth, Jana, Fernandinha, Priscila e Joane
- Aos sensacionais... Ilana, Guigui, Mauro, Isis, Itala, Lucas, Poliana, Rafa Rio e **Lina Clara**
- Aos meus amigos que sempre me apoiaram e confiaram em mim e me proporcionaram grandes alegrias: André Felipe, Andrey Barreto, Carlos Flávio, Douglas Reis, Clayce, Gabriel Lima, Gracinha Menezes, Hananda Gabrielle, Karen Luana, Kely Silva, Layse Brasil, Leandro Prestes, Luiz Fernando, Marcelo Daou, Mauricio Encarnação, Mel Naice, Paulinha Figliuolo, Pedro Donadio, Priscila Aguiar, Polyana Cabral, Rodrigo Lima, Thaísa Sabino e Heleny
- Aos Meus eternos companheiros da UEA, Aimée, Juliana, Sarah, Sandro Banhos, Marcela, Adriana, Prof. Clairon, Prof. Rodrigo, Renah e Sthephany pela amizade, paciência e por estarem sempre dispostas a me ajudar.
- Aos professores e a Coordenação do PPGBIOTEC que ajudaram na minha formação ao longo destes anos...

- Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação para o Amparo a Pesquisa no Amazonas (FAPEAM) por me proporcionarem auxílio financeiro durante a realização deste trabalho...
- E a todos que participaram direta ou indiretamente deste trabalho.

Obrigado.

Produção e Caracterização de Celulases Extracelulares Produzidas por Actinobactérias

RESUMO - Celulases são hidrolases, com grande interesse industrial, destacando-se pelo seu poder na produção de etanol, através de hidrólise de materiais celulolíticos. As actinobactérias são produtoras desta enzimas, em especial do gênero *Streptomyces*. Este trabalho teve como objetivo produzir e caracterizar parcialmente um complexo celulolítico excretado por actinobactérias pertencentes ao acervo da Coleção de micro-organismos UFPEDA. Na seleção dos micro-organismos produtores do complexo celulolítico em ensaios qualitativos os micro-organismos 171x e 178 mostraram o Índice enzimático mais expressivo. Quanto ao tempo de produção do complexo, a fermentação foi estudada por 7 dias, com alíquotas sendo retiradas a cada 24h. Obteve-se assim o pico de produção com 48h de fermentação. Notou-se também que o micro-organismo 171x produziu a enzima em maior quantidade (0,139 U/mL). Os experimentos seguiram com apenas a actinobactéria com produção mais expressiva (171x), sendo testado a concentração ideal de substrato (carboximetilcelulose), temperatura de cultivo e pH inicial de produção. Os resultados demonstraram uma maior produção do complexo celulolítico com substrato em concentração de 3%, temperatura de fermentação 45°C e pH inicial 4,0. Quanto a caracterização parcial do complexo pode-se observar que este se comportou de forma muito satisfatória, pois demonstrou-se bastante estável durante os testes. Além disso, foi comprovada a atividade do complexo pelo método do zimograma e determinou-se sua provável massa molecular (80kDa), e que o complexo celulolítico estudado tem comportamento Michaeliano. O produto de hidrólise enzimática sugere que o complexo enzimático seja composto por endoglucanases. O delineamento experimental confirma que os dados obtido quando analisados os fatores isolados estão próximos ao ótimo. O micro-organismo foi identificado em nível de gênero através do método de microcultivo e de espécie, identificação molecular, sendo identificado como *Streptomyces capoamus*. Os dados obtidos neste estudo mostram a importância biotecnológica das actinobactérias isoladas de solo da caatinga. Este complexo celulolítico tem potencial para utilização em indústrias por possuir alta estabilidade em condições adversas

Palavras chaves: *Carboximetilcelulose, Streptomyces capoamus, endoglucanases.*

Production and Characterization cellulases Extra-Cell

Produced by Actinomycetes

ABSTRACT - Cellulases are hydrolases, with great interest in industrial, notable for its power in the production of ethanol by hydrolysis of cellulolytic materials. The actinobacteria are producing this enzyme, especially of the genus *Streptomyces*. This study aimed to produce and characterize a portion of a cellulolytic complex excreted by actinobacteria belonging to the microorganisms Collection of UFPEDA. In the selection of microorganisms producers of cellulolytic complex in qualitative testing microorganisms 171x and 178 showed the most significant enzymatic Index. As for the complex production time, fermentation was studied by 7 days with aliquots being taken every 24h. There was thus obtained peak production at 48 the fermentation was also noted that the micro-organism 171x enzyme produced in greater quantities. The experiment followed with only the more significant production actinobacteria (171x), was tested for optimum substrate concentration (carboxymeticelulose), growing temperature and an initial pH of production. The results demonstrate greater production of the cellulolytic complex with a substrate concentration of 3%, fermentation temperature 45 ° C and initial pH 4.0. About the partial characterization of the complex maybe that this behaved very satisfactorily, as proved to be very stable during the test. Furthermore, it has proven activity of the complex by zymography method and its probable molecular weight, the cellulolytic complex studied have Michaeliano behavior, the enzymatic hydrolysis product suggests that the enzyme complex is composed of endoglucanases and experiment suggests that the complex should be produced at 40°C, pH 4 and 2.5 g / L of CMC. The micro-organism was identified at genus level by the microculture and kind method, molecular identification, being identified as *Streptomyces capoamus*. Data from this study showed the importance of isolated actinobacteria biotechnology of the savanna soil. This complex has potential for use in the treatment and environmental cleaning products industries because it has high stability in adverse conditions

Key words: *Carboxymethylcellulose, Streptomyces capoamus, endoglucanases.*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Crescimento da receita do mercado mundial de enzimas industriais de 2009 à 2016 em milhões de dólares (Fonte BCC/traduzida livremente).....	4
Figura 2 - Mercado de enzimas industriais para diferentes aplicações com base nas regiões representativas e taxa anual de crescimento médio de um investimento (CAGR) e sua projeção para 2018. (Fonte: marketsandmarkets.com/ traduzida livremente).....	5
Figura 3 – Panorama do mercado de celulose retirada da reportagem de Tatiana Freitas do Jornal Folha de São Paulo (02/01/2013).....	7
Figura 4. Fragmento de celulose (AFONSO, 2012).....	9
Figura 5. Esquema da ligação de duas cadeias de celulose (FAHEINA, 2012).	10
Figura 6. Regiões cristalinas e amorfas da fibra de celulose (A) e estrutura da celulose destacando a região cristalina e região amorfa (B) (SUN; CHEG, 2002; DELATORRE, 2010).	11
Figura 7 – Modo de ação sinérgica das celulases (Castro, 2010).....	13
Figura 8 - Halo de produção enzimática em meio sólido (área mais clara ao redor da colônia).	34
Figura 9 - Índice enzimático das actinobactérias que tiveram atividade para a produção do complexo celulolítico.	35
Figura 10–Cinética de produção de Endoglucanase excretada pela actinobactéria 171X em diferentes fontes de carbono: (A) Carboximetlcelulose, (B) Resíduo de maracujá (C)Resíduo dePau-Rosa, (D) Sabugo de milho.	36
Figura 11 – Cinética de produção de Endoglucanase excretada pela actinobactéria 178 em diferentes fontes de carbono: (A) Carboximetlcelulose, (B) Resíduo de maracujá (C) Resíduo de Pau-Rosa, (D) Sabugo de milho.	37
Figura 12 -Cinética de produção deEndoglucanase excretada pela actinobactéria 7N em diferentes fontes de carbono: (A) Carboximetlcelulose, (B) Residuo de maracujá (C) Resíduo de Pau-Rosa,	37
Figura 13- Cinética de produção de Endoglucanase excretada pela actinobactéria 20G em diferentes fontes de carbono: (A) Carboximetlcelulose, (B) Resíduo de maracujá (C) Resíduo de Pau-Rosa, (D) Sabugo de milho.	38
Figura 14- Atividade do complexo celulolítico em diferentes concentrações de CMC .	39

Figura 15 – Influência da temperatura na produção do complexo celulolítico	41
Figura 16–Produção do complexo CMCase em diferentes pH's	42
Figura 17 - Efeito da temperatura sobre a atividade do complexo celulolítico excretado por <i>S. capuamus</i>	43
Figura 18 - Efeito do pH sobre a atividade celulolítica do complexo enzimático excretado por <i>S. capuamus</i>	44
Figura 19 - Estabilidade térmica a 50°C, 60°C e 80°C do complexo celulolítico excretado por <i>S. capuamus</i>	45
Figura 20 - Estabilidade do complexo em diferentes pH's.....	46
Figura 21 - Efeito dos íons testados nas concentrações de 5 mM e 10 mM.	47
Figura 22 – Perfil eletroforético e zimograma do complexo enzimático	48
Figura 23 – Curva de Michaelis-Menten e duplo recíproco (Lineweaver-Burk) utilizando CMC como substrato	49
Figura 24 – Diagrama de Pareto do primeiro planejamento com efeitos do planejamento utilizando como variável de resposta CMCase e variáveis dependentes CMC, temperatura e pH.....	51
Figura 26 - Diagrama de Pareto do segundo planejamento com efeitos do planejamento utilizando como variável de resposta CMCase e variáveis dependentes CMC, temperatura e pH.....	52
Figura 25 – Superfície de resposta relação entre temperatura X pH (A) e temperatura X [CMC] (B).	52
Figura 27 - Superfície de resposta relação entre temperatura X pH e temperatura X CMC	53
Figura 28- Micromorfologia do gênero investigado por microscopia óptica (a) e (b) ...	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação enzimática.	2
Tabela 2 – Matriz do planejamento experimental fatorial completo 2^3 (Primeiro e segundo planejamento).	31
Tabela 3 - Matriz do planejamento experimental fatorial completo 2^3 com pontos axiais	31
Tabela 4 – Matriz do planejamento experimental fatorial completo 2^3 para a caracterização do complexo enzimático	32

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	X
LISTA DE TABELAS	XII
1. Introdução	1
1.1 Enzimas.....	1
1.2 Mercado Mundial de Enzimas	3
1.3 Celulose e a Indústria de Enzimas	6
1.4 Hidrólise Enzimática da Celulose.....	11
1.6 Aplicações das celulases	14
1.7 Produção Microbiana de Celulases.....	14
1.8 Gênero <i>Streptomyces</i> sp.	17
2. OBJETIVOS	20
2.1 Objetivo geral	20
2.2 Objetivos específicos	20
3. METODOLOGIA	21
3.1 Linhagens de actinobactérias utilizadas.....	21
3.2 Meios de cultura	21
3.3 Triagem de actinobactérias produtoras de celulase	23
3.4 Obtenção do complexo celulolítico produzido pela actinobactéria selecionada ..	24
3.5 Quantificação da atividade endoglucanásica (CMCásica)	24
3.6 Quantificação da β -glucosidade.....	25
3.7 Determinação do teor de proteínas	25
3.8 Seleção de diferentes fontes de carbono	25
3.9 Otimização da concentração da fonte de carbono para produção do complexo celulolítico	26
3.10 Otimização da temperatura de produção do complexo enzimático	26
3.11 Otimização do pH de produção do complexo enzimático	26

3.12	Caracterização parcial do complexo celulolítico excretado pela actinobactéria	26
3.12.1	Determinação do pH ótimo e da temperatura ótima do complexo celulolítico	27
3.12.2	Eletroforese em gel poliacrilamida em condições desnaturantes (PAGE-SDS)	27
3.12.3	Determinação do pH e temperatura ótima de reação de quantificação da atividade enzimática.	28
3.12.4	Determinação da estabilidade térmica	28
3.12.5	Determinação da estabilidade em diferentes pHs	28
3.12.6	Efeito de íons sobre a atividade celulolítica	29
3.12.7	Determinação dos parâmetros cinéticos aparentes	29
3.13	Gel de Atividade (Zimograma)	29
3.14	Análise de açúcar redutor e atividade enzimática do sobrenadante	30
3.15	Planejamento experimental	30
3.16	Identificação molecular	32
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
4.1.	Seleção do microrganismo produtor de celulase	34
4.2.	Estudo da fonte de carbono.	35
4.3	Caracterização do complexo CMC _{ase} .	42
4.4	Identificação da Actinobactéria	54
4.4.1	Identificação Morfológica	54
4.4.2	Identificação Molecular	54
5.	CONCLUSÕES	55
6.	PESPECTIVAS	56
7.	REFERÊNCIAS	57
	ANEXOS	73

1. INTRODUÇÃO

1.1 Enzimas

Na natureza a produção de enzimas (biossíntese) pode acontecer de duas formas: associada ao crescimento do ser vivo sendo, então a taxa de formação do produto proporcional ao aumento da biomassa; ou não associada ao crescimento celular, e nesse caso, a taxa de formação de produto é independente da taxa de crescimento celular (SCHIMIDELL, 2001).

As enzimas são substâncias orgânicas específicas compostas por polímeros de aminoácidos, que atuam como catalisadores no metabolismo dos seres vivos (ROSAS, 2003). Conforme HARGER (1982), enzimas são biocatalisadores de estrutura protéica globular terciária ou quaternária, termolábeis, que aceleram muito a velocidade de uma reação química termodinamicamente possível, isto é, atuam reduzindo a barreira energética destas reações. Além disso, são uma classe de proteínas essenciais para o metabolismo de todos os organismos vivos, e desempenham um papel importante na degradação da matéria orgânica, na infecção do hospedeiro e na deterioração dos alimentos. Nas vias metabólicas, agem em sequências organizadas de rotas catabólicas e anabólicas (FISHBORN, 2013; BAJAJ et al, 2014; RASUL et al, 2015).

Quimicamente as enzimas, em sua maioria, são definidas como proteínas que possuem uma estrutura especial, contendo um centro ativo, denominado *apoenzima* e algumas vezes um grupo não protéico, denominado coenzima ou cofator. A molécula toda é designada como holoenzima (BEESON et al 2015; KÜES, 2015). O poder catalítico destes biocatalisadores está associado à conformação nativa, que depende das condições específicas de pH, temperatura e força iônica do meio (MEDIGAN; MARTINKO; PARKER, 2008). As enzimas apresentam a capacidade de reagir com determinados constituintes, os substratos, formando complexos: enzima-substrato, com subsequente formação do produto. Essa cinética do processo vai depender da estrutura da proteína, isto é, do número de cadeias peptídicas e arranjo dessas cadeias na molécula, da natureza do substrato e ainda, se existir, da natureza do grupo prostético (KIELING, 2002). Devido essa capacidade elas são divididas em seis classes de acordo com a reação catalisada: *oxiredutases* (reação de oxido-redução), *transferases* (reações de transferência de grupos entre moléculas, que não sejam catalisadas pelas oxiredutases ou pelas hidrolases), *hidrolases* (reações de hidrólise, onde a água é o receptor dos grupos transferidos), *liases* (reações de eliminação e adição de grupos, formando ou

desfazendo ligações duplas), *isomerases* (reações de isomerização) e *ligases* (catálise da ligação de duas moléculas com hidrólise simultânea de ATP), demonstrado de forma resumida na Tabela 1 (LARTIGUE, 1975; KENNEDY; CABRAL, 1987; WHITAKER, 1994; HARTMEIER, 1988; FISHBORN, 2013; BAJAJ et al, 2014; RASUL et al, 2015; BEESON et al 2015; KÜES, 2015).

Tabela 1. Classificação enzimática.

Classe	Enzima	Função
1 ^a	Oxirredutases	Catálise de reações de oxirredução por transferência de elétrons de hidretos (H-) ou prótons (H+)
2 ^a	Transferases	Catálise de reações de transferência de grupos químicos entre moléculas
3 ^a	Hidrolases	Catálise de reações de quebra em meio aquoso, utilizando a água como receptor de grupos funcionais de outras moléculas
4 ^a	Liases	Atuam sobre as ligações duplas de moléculas, retirando ou adicionando grupos funcionais
5 ^a	Isomerases	Catálise de reações que transformam moléculas em seus isômeros
6 ^a	Ligases	Catálise de reações de condensação, consumindo energia na forma de ATP e formando ligações químicas

Fonte: Adaptado de Nelson e Cox (2011) e Rocha (2011).

Com a capacidade de atuação de acordo com a tabela acima, as enzimas classificadas como hidrolíticas catalisam reações com ésteres, ligações glicosídicas, ligações peptídicas, outras ligações C-N e ácidos anidros, além de outras reações (SHULER e KARGI, 2008).

As enzimas hidrolíticas são amplamente utilizadas em processos industriais, podendo ser aplicadas na degradação de diversas substâncias naturais. Em geral são utilizadas em setores como nas indústrias têxteis (amilases, celulasas, pectinases), de detergentes (celulasas, lipases, proteases), alimentícia (celulase, lactase, lipase, pectinase, protease), de papel (lipase, xilanase), de couro (lipase, protease), entre outras (OLIVEIRA et al., 2006).

FELLOWS (1994) relata que a atividade enzimática ótima das enzimas microbianas ocorre nas mesmas condições em que se obtém o crescimento máximo dos microrganismos. As enzimas microbianas podem ser extracelulares (enzimas eliminadas ao meio) ou intracelulares (enzimas retidas no interior das células microbianas). A produção de enzimas extracelulares é obtida na fase logarítmica de crescimento ou na

fase estacionária, enquanto as enzimas intracelulares são produzidas durante o crescimento na fase estacionária e somente são liberadas ao meio pela lise celular que ocorre na fase estacionária ou na fase de declínio.

Também são conhecidas por sua alta afinidade pelo substrato, uma vez que a molécula tem sua conformação disposta de tal maneira que apenas determinados substratos consigam atingir seu sítio ativo (KENNEDY; CABRAL, 1987). Assim, as enzimas são geralmente comercializadas na presença de aditivos que protegem a proteína com contato com um possível substrato evitando assim inativação durante a estocagem (ZANIN; MORAES, 2004).

1.2 Mercado Mundial de Enzimas

Devido sua alta aplicabilidade biotecnológica, a tecnologia enzimática se apresenta como uma opção bastante interessante e rentável para a exploração econômica uma vez que desempenha diversos tipos de reações. Além disso, podem ser utilizada na construção de biossensores, na síntese de compostos bioativos, obtenção de novos biopolímeros, processos em indústrias tradicionais como: curtumes, papel e celulose, têxtil, cosméticos, dentre outras (CASTRO, 2004; HASAN, 2006; MARCHETTI, 2007; RANGANATHAN, 2008; ANTCZAK, 2009; FISHBORN, 2013; BAJAJ et al, 2014; RASUL et al, 2015; BEESON et al 2015; KÜES, 2015).

Segundo reportagem, de março de 2012, da revista eletrônica *Business Communications Company Inc.* (BCC), O mercado mundial de enzimas industriais foi avaliada em US \$ 3,1 bilhões em 2009, chegou a cerca de US \$ 3,6 bilhões em 2010 e em 2011 foi de cerca de US \$ 3,9 bilhões. Ainda nesta edição a BCC publicou estimativas de que este mercado crescerá a uma taxa de crescimento anual composta de 9,1% para chegar a US \$ 6 bilhões até 2016. As enzimas utilizadas nas indústrias de alimentos (comida e bebidas) compõem o maior segmento da indústria de enzimas, com faturamento de cerca de US\$ 1,2 bilhão em 2010, com estimativas de crescimento de 10,4% passando para US\$ 2,1 bilhões em 2016. A segunda maior categoria de enzimas utilizadas nas indústrias são as chamadas de “enzimas técnicas” (enzimas usadas em parte de processos industriais) com uma receita de cerca de US \$ 1,1 bilhão em 2010 e cerca de US \$ 1,2 bilhão em 2011. Este mercado ainda deverá crescer para US \$ 1,7 bilhões até 2016, com um crescimento anual de 8,2% como pode ser visto na Figura 1 retirada da edição da BCC (THE FREEDONIA GROUP, INC., 2013).

Nos últimos anos o mercado latino americano obteve um grande destaque no mercado mundial de enzimas, e atualmente cerca de 4% da demanda mundial de enzimas está alocada nesta região (GLOBAL INDUSTRIAL ENZYMES MARKET REPORT, 2013). Com essa demanda tão elevada e sendo o Brasil um dos países mais industrializado das Américas, não é difícil de constatar que ele também seria um dos maiores consumidores de enzimas industriais dessa região. O seu consumo chega a representar 60% da demanda de enzimas na região (WORLD ENZYME, 2013).

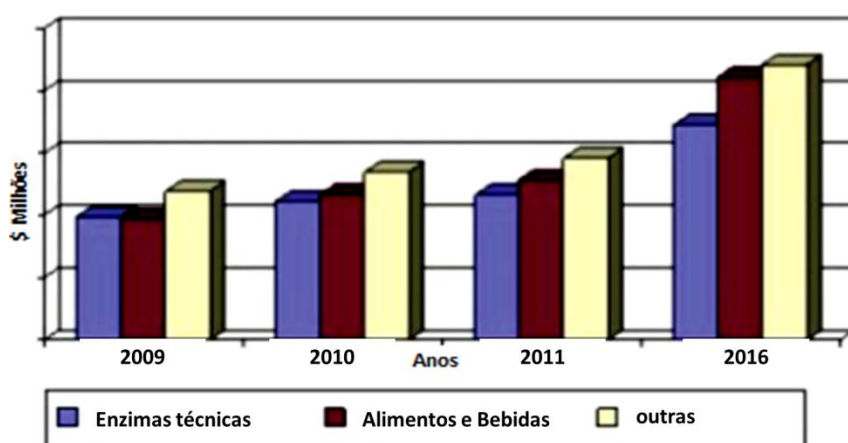


Figura 1 - Crescimento da receita do mercado mundial de enzimas industriais de 2009 à 2016 em milhões de dólares (Fonte BCC/traduzida livremente)

O gráfico apresentado na Figura 2, publicado em março de 2014 pelo site especializado em economia marketsandmarkets.com, abrange o mercado de enzimas industriais para diferentes aplicações, que incluem alimentos e bebidas, produtos de limpeza, a produção de biocombustíveis e alimentos para animais. O gráfico se divide com base nas regiões mais representativas, em sua base de mercado, as restrições, desafios e matéria-prima, além disso, também estima o tamanho do mercado global em termos de receita e na taxa anual de crescimento médio de um investimento (*CAGR*). No entanto a pesquisa realizada pelo site leva em consideração apenas o mercado global de enzimas com base em tipos, aplicação e geografia. Enzimas utilizadas na produção de alimentos e bebidas, produtos de limpeza, produção de biocombustíveis e de alimentos para animais são as quatro aplicações mais abrangentes de enzimas industriais e por isso tem maior quota do mercado global de enzimas envolvidas na produção de micronutrientes da agricultura.

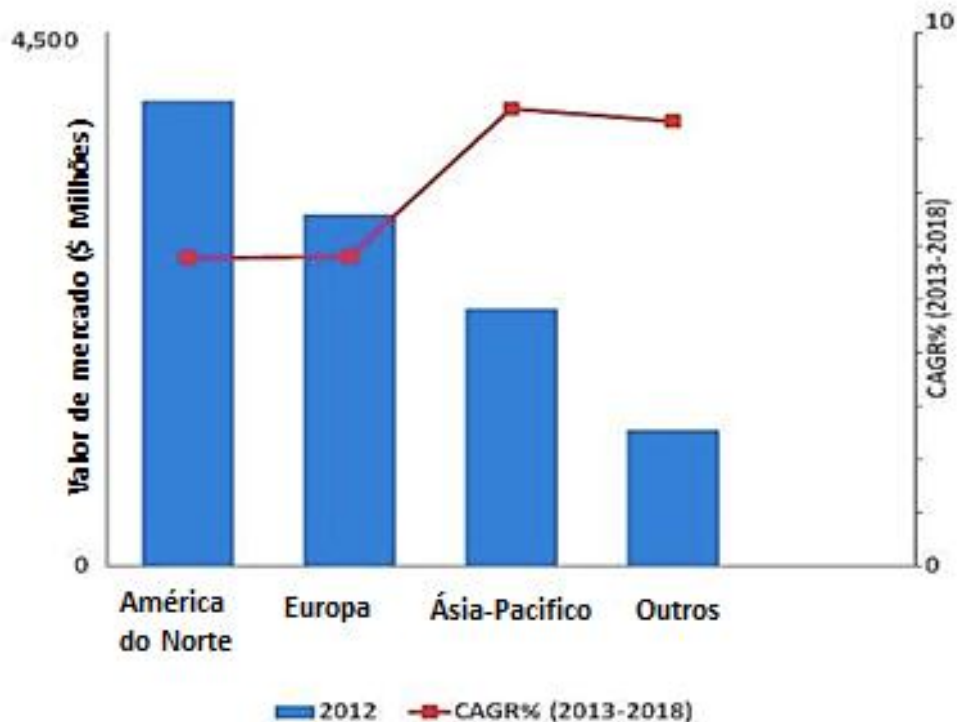


Figura 2 - Mercado de enzimas industriais para diferentes aplicações com base nas regiões representativas e taxa anual de crescimento médio de um investimento (CAGR) e sua projeção para 2018. (Fonte: marketsandmarkets.com/ traduzida livremente)

Segundo reportagem do jornal O Estado de São Paulo de 2 dezembro de 2013 a indústria brasileira vai investir pesado na produção de enzimas. A Novozymes, fabricante dinamarquesa de enzimas, prevê dobrar seu faturamento na América Latina até 2020, em um crescimento puxado pelos projetos de produção de etanol de segunda geração no Brasil. A receita da empresa na região em 2012 foi de US\$ 200 milhões e o Brasil é o mercado mais importante.

No panorama mundial, em 2005 o mercado brasileiro de enzimas movimentou algo em torno de US\$ 147 milhões só com enzimas. Entretanto grande fatia dessa quantia ainda está ligada a importação desse produto chegando a quase 80% do mercado nacional. Este quadro pode se modificar como um avanço no mercado de bicompostíveis seja ele de origem amilácea ou celulósico, além de outras áreas promissoras como a de rações para alimentação animal. Outros mercados devem crescer, porém em menor proporção, como é o caso das indústrias de polpa e papel (POLITZER, 2006).

1.3 Celulose e a Indústria de Enzimas

A ascensão das indústrias de enzimas e o crescente avanço da biotecnologia têm impulsionado as pesquisas e seleção de fontes e processos de produção de enzimas, uma vez que esta tem sido uma alternativa promissora para a diminuição de resíduos oriundos das demais indústrias.

O Brasil por sua vez está entre os vinte países mais industrializados do mundo, sendo sua principal atividade a agropecuária. Estas indústrias geram toneladas de resíduos e subprodutos, tanto agrícolas como agroindustriais (GRAMINHA *et al.*, 2008). Infelizmente estes materiais são pouco aproveitados, parte deles é utilizada para a geração de energia elétrica, enquanto o restante simplesmente fica disponível no campo tornando-se muitas vezes um problema ambiental. A reutilização desses resíduos tornando-os substratos ou produtos de valor comercial contribuiria significativamente para a remoção de poluentes ambientais e sem dúvidas pode trazer grandes benefícios à economia mundial (SUKUMARAN *et al.*, 2010).

Grande parte do rejeito oriundo das indústrias agropecuária é matéria orgânica rica em celulose, está por sua vez é um polímero de cadeia longa composto de um só monômero (glicose), classificado como polissacarídeo ou carboidrato. É um dos principais constituintes das paredes celulares das plantas (cerca de 33% da massa da planta), em combinação com a lignina, com hemicelulose e pectina e não é digerível pelo homem, constituindo uma fibra dietética. Alguns animais, particularmente os ruminantes, podem digerir celulose com a ajuda de microrganismos simbióticos (SOARES, 2011; SANTOS 2013; JADHAV, 2013).

Em 2008 o Brasil alcançou o 4º lugar no *ranking* dos maiores produtores mundiais de celulose e de papel, além de ser um dos 10 maiores mercados mundiais consumidores desses produtos. Um total de 235 empresas de papel e celulose opera 268 unidades industriais localizadas em 17 estados brasileiros, gerando 109 mil empregos diretos, sendo 66 mil nas indústrias e o restante na produção florestal, movimentando cerca de US\$ 6 bilhões até junho deste mesmo ano (Revista O papel, 2009). Estima-se que esse mercado ainda tem amplitude para crescer com o avanço das tecnologias.

Com o mercado de celulose em plena expansão, o Brasil agora figura entre os grandes competidores do segmento, sendo a empresa Eldorado Brasil situada no

município de Três Lagoas - MS a pedra fundamental nesse avanço. A maior fábrica do mundo iniciou suas atividades no final de 2012 e acompanhará o momento de crescimento da demanda internacional e da expressiva recuperação dos preços da commodity. O cenário é muito favorável para a indústria de celulose brasileira, em função da alta produtividade das nossas florestas e da recuperação econômica global, principalmente da China, maior destino das exportações brasileiras do setor, como pode ser visto na Figura 3.



Figura 3 – Panorama do mercado de celulose retirada da reportagem de Tatiana Freitas do Jornal Folha de São Paulo (02/01/2013)

O aumento na carência internacional de celulose já tem sido sentido pelos produtores brasileiros logo no início de 2013 segundo reportagem da revista Valor Econômico de 28 de novembro de 2013. Nesse período, a exportação da celulose brasileira aumentou 9,8% em relação ao mesmo período do ano anterior, passando de 2,577 milhões para 2,830 milhões de toneladas, segundo dados da Associação Brasileira de Celulose e Papel (Bracelpa). Esse volume representou uma receita de US\$ 1,5 bilhão para o setor, em comparação a US\$ 1 bilhão no mesmo período de 2009.

Nos processos industriais que envolvem a madeira, por exemplo, usualmente, geram-se resíduos com alto percentual de matéria orgânica. Definem-se como resíduo das indústrias de materiais ricos em celulose as sobras que ocorrem no processamento mecânico, físico ou químico, e que não são incorporadas ao produto final. No caso da celulose, a casca, a lama de cal, o lodo biológico, o resíduo celulósico e a cinza de

caldeira resultante da queima de biomassa, e que são produzidos ao longo do processo, são genericamente classificados como resíduos (PAES, 2013).

Resíduos como as cascas de vegetais e de madeira normalmente são desprezados nos processos industriais, no entanto este material é rico em matéria lignocelulolítica. A conversão de biomassa lignocelulósica em açúcares fermentáveis para produção de etanol vem sendo considerada como uma alternativa promissora para aumentar a produção de etanol necessária para atender à demanda mundial. Como já citado anteriormente, as cadeias desse polímero de glicose podem ser quebradas para liberar açúcares fermentáveis. Entretanto, a celulose é muito bem protegida pelas plantas, a fim de que não sejam facilmente utilizadas por predadores (CHENG *et al*, 2008). Segundo Corradini *et al*. (2009) a fibra da casca do coco verde é um bom exemplo desse tipo de resíduo pois é constituído por cerca de 40% de lignina e 35% de celulose, que podem ser utilizados na obtenção de açúcares fermentáveis (monossacarídeos) para a preparação de etanol lignocelulósico (MENDES, 2013).

Outro exemplo de resíduo industrial lignocelulósico subutilizado é o bagaço-de-cana, com baixo valor nutritivo e rico em parede celular, sendo este o responsável pelo seu baixo aproveitamento na alimentação animal, também possui um grande potencial para ser utilizado na obtenção de açúcares fermentáveis, por possuir fibras, pode ser de excelente qualidade para a fabricação de papéis ou como substrato para produção de enzimas, uma vez que é quimicamente composto por celulose (26,6 – 54,3%), hemicelulose (14,3 – 24,4%) e lignina (22,7 – 29,7%) (IMMANUEL, 2009; SILVA, 2010; SOARES, 2011; SANTOS 2013; JADHAV, 2013).

Além das plantas muitas bactérias produtoras de celulose, incluindo os gêneros *Gluconacetobacter sp.*, *Rhizobium sp.*, *Agrobacterium sp.*, *Rhodobacter sp.* e *Sarcina sp.* têm sido relatados (BROWN 2004; MORGAN ET AL 2013). A celulose bacteriana foi primeiramente relatada por Adrian Brown em 1886, enquanto trabalhava com bactérias produtoras de ácido acético. Uma massa sólida foi formada na superfície do meio de fermentação, o que não era esperado no seu trabalho de rotina. Tal massa sólida foi batizada como o "planta vinagre" e era comumente usado na produção caseira de vinagre. O componente foi posteriormente identificado como a celulose e o nome *Xylinum bacteria* foi atribuída ao microrganismo responsável pela essa síntese. Desde a sua descoberta, vários nomes foram dados a esta bactéria incluindo *Acetobacterium*

xylinum (LUDWIG, 1989) e *Xylinodes bacteria* (HENNEBERG, 1906). Mais tarde, foi nomeado como *Acetobacter xylinum* (BERGEY, 1925) e se tornou o nome oficial de acordo com o Código Internacional de Nomenclatura de Bactérias (SNEATH, 1958). Atualmente, esta bactéria (estritamente aeróbica Gram – negativa) é conhecida como *Gluconacetobacter xylinus* (VALLA *et al.* 2009), que é considerada como uma subespécie de *Acetobacter aceti* (CANNON E ANDERSON, 1991). Ao contrário de celulose vegetal, celulose bacteriana não necessita de processamento adicional para remover impurezas e contaminantes indesejados, tais como a lignina, hemicelulose e pectina, sendo assim capaz de reter um maior grau de polimerização (NISHI *et al.* 1990). A celulose bacteriana também demonstra propriedades únicas, incluindo elevado grau de cristalinidade, o valor de retenção de água, resistência à tração e moldabilidade (KLEMM *et al.*, 2001; YAMANAKA *et al.*, 1989; YOSHINO *et al.*, 1996).

Composta por monômeros de glicose (Figura 4), a celulose é classificada como o mais abundante biopolímero do mundo (BAYER e LAMED, 1992; AFONSO, 2012), representando aproximadamente 40% de todo carbono existente na biosfera, estando presente em plantas superiores e até em microrganismos primitivos, variando de 20 a 99% nas estruturas dessas espécies (RIBEIRO, 2010).

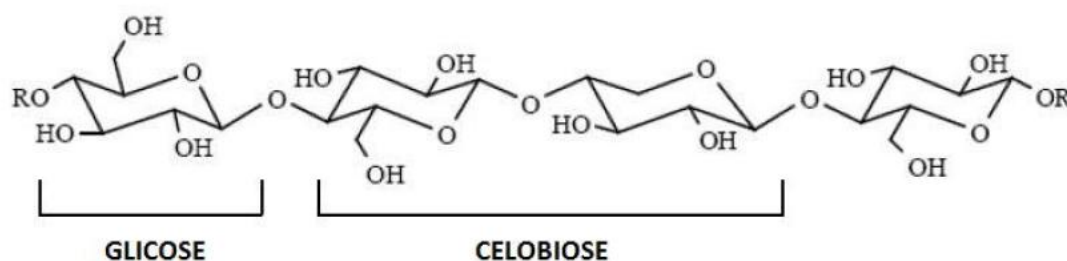


Figura 4. Fragmento de celulose (AFONSO, 2012).

A celulose é encontrada em plantas sobre a forma de microfibrilas, com dimensões de 2 a 20 nm de diâmetro e 100 a 40.000 nm de comprimento, tendo entre 2 a 25 mil monômeros de glicose. As microfibrilas estão presentes em ligações lineares do tipo β (1 \rightarrow 4) entre D-glicopirranose e na conformação C_1 . As moléculas de glicose estão orientadas entre si em 180° e as ligações de hidrogênio intramoleculares, mantêm a rede mais fixa e, por consequência, com características hidrofóbicas (FERREIRA *et al.*, 2009; DENG e FONG, 2010; LIMA, 2011). É um polímero natural de estrutura

física e morfológica complexa e é considerado um homopolissacarídeo linear, cujo monômero é o dissacarídeo celobiose (AFONSO, 2012). A estrutura química da celulose pode ser observada nas Figuras 4 e 5:

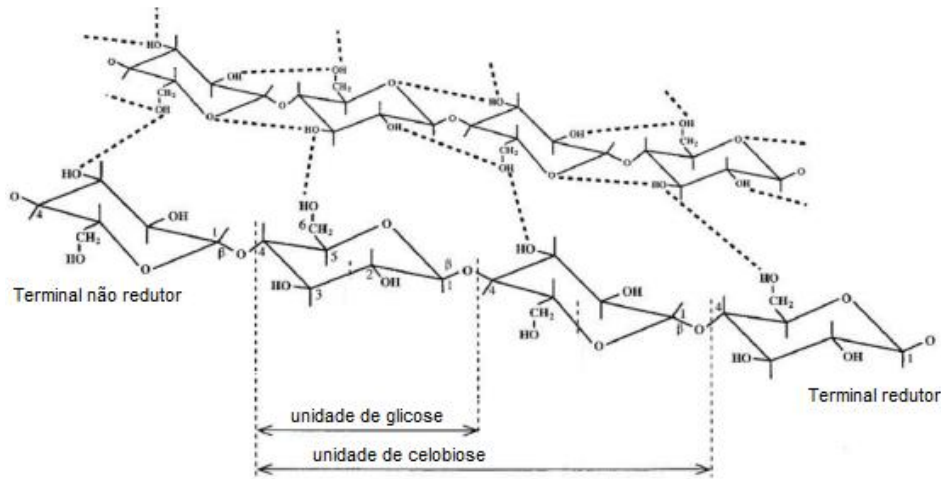
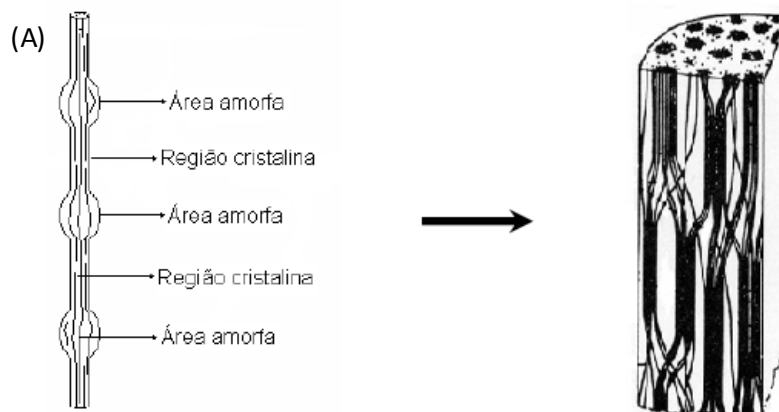


Figura 5. Esquema da ligação de duas cadeias de celulose (FAHEINA, 2012).

A cadeia de celulose nos materiais lignocelulósicos, está ligada entre si devido à ligações de hidrogênio, sendo divididas em duas regiões (LIMA, 2011):

- região cristalina, que apresenta um maior número de interações moleculares intra e internamente, como ligações de hidrogênio e forças de Van der Waals, o que torna a celulose insolúvel e mais resistente à ação enzimática, a tração e a agentes químicos (LYND *et al.*; 2002, ZHANG *et al.*, 2006);

- região amorfa, mais facilmente hidrolisável, possui menos interações de hidrogênio, sendo facilmente hidratada e mais acessível às enzimas (LYND *et al.*; 2002, ZHANG *et al.*, 2006). Essa estrutura pode ser melhor exemplificada na Figura 6 a seguir:



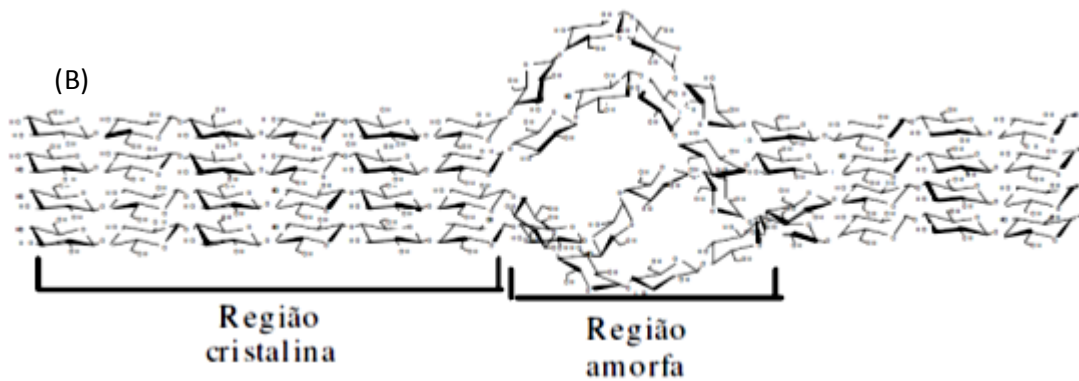


Figura 6. Regiões cristalinas e amorfas da fibra de celulose (A) e estrutura da celulose destacando a região cristalina e região amorfa (B) (SUN; CHEG, 2002; DELATORRE, 2010).

As hemiceluloses, também denominadas de polioses, são mais solúveis que a celulose, e conseqüentemente, podem ser mais facilmente hidrolisadas (AFONSO, 2012). Estão intimamente associadas à celulose na parede da célula vegetal, apresentando-se intercaladas às microfibrilas, atuando como um elo entre a celulose e a lignina e são compostas por diferentes unidades de açúcares formando cadeias ramificadas (FERREIRA *et al.*, 2009; RIBEIRO, 2010; AFONSO, 2012).

São geralmente classificadas de acordo com o principal açúcar do esqueleto, podendo ser homo ou heteropolímeros, como por exemplo, a xilana (xiloses) e a glicomanana (glicose e manose), respectivamente. Como heteropolimérica, é altamente ramificada contendo hexoses (glicose, manose, galactose), pentoses (xilose e arabinose) e ácidos urônicos (OGEDA e PETRI, 2010; RIBEIRO, 2010; AFONSO, 2012). Sua presença proporciona elasticidade à estrutura, impedindo que as microfibrilas se toquem (OGEDA e PETRI, 2010; AFONSO, 2012).

1.4 Hidrólise Enzimática da Celulose

O resíduo celulósico, devido à sua alta relação carbono/nitrogênio necessita decomposição prévia. Este processo pode ser realizado através da inoculação de agentes decompositores tendo as enzimas como as celulases, grande importância econômica e diferentes aplicações nesta etapa. A celulose é um polímero de centenas a milhares de unidades glicosídicas unidas por ligações β -1,4 (Figura 4 e 5). Suas cadeias são lineares e estendidas sendo que as hidroxilas livres fazem ligações de hidrogênio com as

hidroxilas da outra cadeia, formando microfibrilas. A celulose contém regiões amorfas e regiões cristalinas, dependendo do padrão de interações, e é altamente resistente à temperatura, força mecânica e hidrólise.

Apesar de sua alta resistência dois grupos de enzimas são facilmente associados à degradação de materiais ricos em celulose, as enzimas oxidativas e as hidrolíticas. As celulasas como são chamadas as enzimas que têm capacidade de degradar a celulose, podem ser produzidas por plantas, participando da formação e remodelamento da parede celular, e principalmente por bactérias e fungos, com intuito de despolimerizar a cadeia de celulose (BROWN, 2004; MORGAN *et. al.* 2013).

A degradação da celulose é realizada por um complexo de enzimas chamadas de celulasas que agem sinergicamente para a degradação da fibra celulolítica. Estas são normalmente produzidas por microrganismos, atuando na hidrólise da celulose cristalina a seu componente monomérico, a glicose (POTHRAJ; BALAJI; EYINI, 2006).

Essas enzimas são de vários tipos e elas operam para a hidrólise total da celulose (Figura 7). As endoglucanases, como são chamadas as celulasas que clivam regiões internas da cadeia, liberando cadeias menores; são as enzima responsáveis por iniciar a hidrólise, degradam a celulose aleatoriamente na parte amorfa da fibra celulósica, liberando oligossacarídeos de vários tamanhos e, conseqüentemente, novos terminais, sendo um redutor (quando a glicose possui uma hidroxila heterosídica livre) e um não redutor (quando a hidroxila heterosídica da molécula da extremidade participa de ligação com a glicose adjacente) (CASTRO e PEREIRA, 2010). Também são conhecidas como celulasas e carboximetilcelulase. Seu substrato natural é a celulose e xiloglicana, apresentando especificidade variável em carboximetilcelulose (CMC), avicel (celulose cristalina), β -glicana e xilana. Elas atuam somente na porção amorfa da celulose, sendo que sua atividade é diminuída conforme o encurtamento da cadeia de celulose (PERCIVAL ZHANG *et al.*, 2006; LYNDY *et al.*, 2002; BHAT e BHAT, 1997).

As exoglucanases clivam extremidades das cadeias, produzindo o dissacarídeo celobiose; também conhecidas como glucanohidrolase e celobiohidrolases, duas classificações são utilizadas para definir este tipo de atividade enzimática: 1,4- β -D-glucana-hidrolases (EC 3.2.1.4) e celobiohidrolases (EGLs – EC 3.2.1 - ; EC 3.2.1.91). As 1,4- β -D-glucana-hidrolases (EC 3.2.1.4), também conhecidas como exo-

glucosidases (EC 3.2.1.165), são responsáveis pela hidrólise da fibra celulósica, liberando glicose diretamente do polímero. Essas enzimas geralmente sofrem inibição pelo seu produto de hidrólise (CASTRO e PEREIRA, 2010). Possuem ação limitada sobre substratos de carboximetil celulose e hidroxetilcelulose (LYNDY *et al.*, 2002; BHAT e BHAT, 1997).

As β -glicosidases clivam a celobiose, produzindo glicose (SPANO *et al.*, 1975; GALBE; ZACCHI, 2002; GOMEZ *et al.*, 2008). As β -glicosidases tem um papel importante na hidrólise de materiais lignocelulolíticos. A celobiose, principal substrato para a β -glicosidase é um potente inibidor de exocelulases e sua ausência diminui o processo de sacarificação das biomassas (ALMEIDA, 2009; LYNDY *et al.*, 2002).

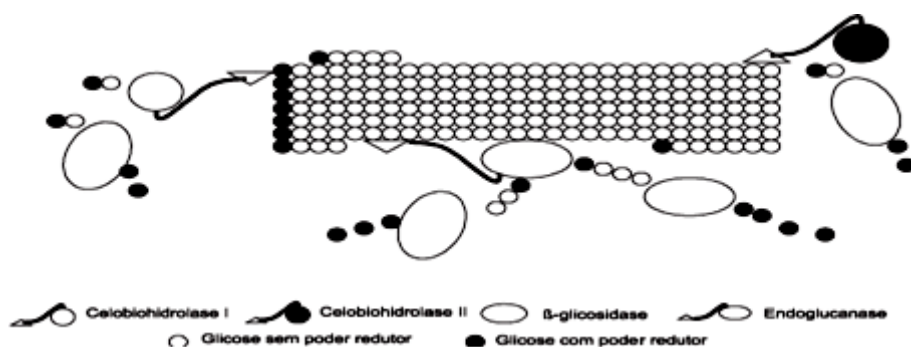


Figura 7 – Modo de ação sinérgica das celulasas (Castro, 2010)

Como já citado anteriormente as celulasas agem conforme sua classificação, a fim de otimizar a degradação da fibra celulolítica e, conseqüentemente, novas cadeias terminais. São conhecidas por atuarem somente na porção amorfa da celulose, e sua atividade diminui conforme o encurtamento da cadeia de celulose (LYND *et al.*, 2002). As exoglucanases ou celobiohidrolase (CBHs) atuam de maneira progressiva, em porções redutoras e não redutoras das cadeias de celulose, podendo liberar tanto glicose quanto celobiose como produtos principais. São capazes de atuar sobre a celulose microcristalina, encurtando cadeias do polissacarídeo (LYND *et al.*, 2002). São conhecidos dois tipos de celobiohidrolases: as CBHs I e CBHs II, as quais se diferenciam pelo local em que se adsorvem na molécula de celulose. As CBH I e II iniciam a hidrólise da molécula de celulose a partir de terminais redutores e não redutores, respectivamente (ZANG *et al.*, 2006). As celobiohidrolases apresentam em sua estrutura uma região responsável pela ligação da molécula ao substrato (CBD-

cellulose binding domain) e sofrem inibição pelo seu produto de hidrólise, a celobiose (AWAFO; CHAHAL; SIMPSON, 1998).

Já as β -glicosidases são reponsáveis pela degradação da celulose a glicose, as denominadas β -D-glicosídeo glicohidrolases (E.C. 3.2.1.21) sendo necessárias para hidrolisar oligossacarídeos de cadeia curta e celobioses solúveis em glicose (LYND *et al.*, 2002).

1.6 Aplicações das celulasas

As celulasas têm uma gama de aplicações industriais, como na indústria alimentícia para produção de sucos de fruta, vinho e café; na indústria têxtil para processamento das fibras de algodão, finalização do produto (*stoning*) e em detergentes para lavagem; na indústria de papel e polpa para descoloração e modificação das fibras; na indústria de ração animal para melhorar a solubilização de produtos derivados de plantas, entre outros (NIELSEN e OXENBOLL, 1998; DURÁN e ESPOSITO, 2000). Uma aplicação tecnológica que vem sendo atualmente estudada é na produção do bioetanol de segunda geração, impulsionada pela busca por fontes alternativas de energia. Enquanto o etanol de primeira geração é produzido a partir da fermentação do caldo de cana-de-açúcar, o de segunda é produzido a partir de biomassa lignocelulósica. Para isso, é necessário o prévio tratamento da biomassa, para hidrólise da parede celular vegetal e liberação dos açúcares fermentáveis. Nesse caso, além das celulasas, uma gama de outras enzimas é empregada, devido à variedade de polissacarídeos que compõem a parede celular. Essa abordagem permite a utilização de diversas fontes vegetais para produção de etanol, incluindo, por exemplo, a palha, o bagaço de cana-de-açúcar e outros resíduos ricos em celulose (KIMURA *et al.*, 1999; TAIZ e ZEIGER, 2004; Saratale *et al.*, 2012; Moeda *et al.*, 2012; PAES, 2013).

1.7 Produção Microbiana de Celulasas

Ao longo dos anos, um grande número de microrganismos incluindo bactérias, leveduras e fungos têm sido usados para produção de enzimas. (PANDEY *et al.*, 2000; ARPAN DAS, 2013). Os fungos filamentosos do gênero *Trichoderma*, conhecidos degradadores de celulose, estão amplamente distribuído por todo o mundo e ocorrem

em quase todos os tipos de solos e ambientes naturais, especialmente naqueles contendo matéria orgânica. O fato das espécies deste gênero se desenvolverem em um amplo espectro de substratos e condições ambientais, além de produzirem celulasas, torna este grupo de grande interesse biotecnológico (ESPOSITO; SILVA, 1998; FOREMAN *et al.*, 2003; AKINOLA, 2013). As espécies desse gênero produzem grandes quantidades de celulasas e outras enzimas hidrolíticas (KUBICEK, 1992), sendo *Trichoderma reesei* um conhecido produtor de múltiplas enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas. O gênero é caracteristicamente reconhecido pela produção de diversos sistemas extracelulares de enzimas envolvidas na hidrólise de polissacarídeos (BÉGUIN, 1990; CHANDRA, 2013; NAKAZAWA, 2012).

O uma cepa mutagênica de *T. reesei* foi desenvolvida com sucesso com a finalidade de obter microrganismos com alta capacidade de produção de enzimas celulolíticas (MANDELS, 1975; Lee, 2012). Além do *Trichoderma*, também *Penicillium*, *Aspergillus* e *Phanerochaete chrysosporium* (antigo *Sporotrichum pulverulentum*) produzem enzimas celulolíticas (PERSSON *et al.*, 1991; DASHTBAN e QIN, 2012).

As celulasas têm sido produzidas por fermentação utilizando *T. reesei* em farelo de arroz (LATIFIAN *et al.*, 2007; NAKAZAWA, 2012; LEE, 2012), bagaço de cana-de-açúcar e palha de arroz (MUTHUVELAYUDHAM e VIRUTHAGIRI, 2006; MEKALA *et al.*, 2008) e em farelo de trigo (SINGHANIA *et al.*, 2007); *Trichoderma* sp e *Phanerochaete chrysosporium* em palha de arroz (KHAN *et al.*, 2007); *T. reesei* em sabugo de milho (LIMING e XUELIANG, 2004); *Aspergillus niger* em farelo de trigo (KANG *et al.*, 2004); *A. niger* em bagaço de cana-de-açúcar (AGUIAR e MENEZES, 2000); e *Penicillium achinulatum* em bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo (CAMASSOLA e DILLON, 2007).

Nos últimos anos tem se dado muita ênfase aos estudos das celulasas produzidas por fungos. No entanto, com o advento da engenharia genética, o isolamento e caracterização de novas celulasas de bactérias vem sendo amplamente explorados devido a facilidade de clonar esses genes em outras bactérias mais conhecidas que crescimento rápido. Além dessa, existem outras razões para que estas enzimas bacterianas sejam mais estudadas, celulasas bacterianas são geralmente complexos multi-enzima proporcionando o aumento da função e sinergia; outro fator que corrobora

com a afirmação acima é que as bactérias habitam uma grande variedade de ambientes. (MIRANDA, 2009; SADHU, 2011; SADHU, 2012).

Também tem sido relatado que a produção de enzima a partir de bactérias pode efetivamente hidrolisar diferentes substratos celulósicos, sendo essa hidrólise efeito de formação de alguns fatores nutricionais e ambientais (CHOUNDRY et al, 1981; BYND et al., 1987; RAJOKA et al., 1984; WALDRON et al., 1986; SOMEN ACHARYA et al., 2012).

A espécie bacteriana *Thermobifida fusca* foi descrita por Harun e colaboradores (2013) como uma eficiente produtora de celulasas. Também foi relatado que esta estirpe pertence ao filo dos actinobactéria que pode crescer na maioria dos açúcares simples e ácidos carboxílicos e é capaz de degradar todos os principais polímeros da parede celular de plantas, exceto a lignina e pectina (LYKIDIS et al., 2007) .

O uso de co-culturas bacterianas tem despontado como uma outra alternativa para a degradação de material celulolítico com maior eficiência. Estas são aplicáveis para melhorar a hidrólise de celulose e aumentar a utilização do produto para se obter aumento desejável de produtos de fermentação (DIAS, 2012).

Na década de 1980, Saddler e colaboradores (1985) e Venkateswaren e colaboradores (1986) já sugeriam em suas pesquisas com bactérias do gênero *Clostridium* as vantagens das co-culturas bacterianas para hidrolisar material lignocelulolítico. A maior vantagem de co-cultura é o aumento da produção das enzimas do complexo, mas o desafio está na síntese de sub-produtos que pode ser tóxicos para seus produtores. Além disso, o desenvolvimento de bactérias co-culturais é uma tarefa difícil. Pois, são necessários meios e condições de crescimento, tais como a temperatura, ambiente e fonte de carbono deve ser sincronizada para permitir um crescimento igual de cada uma das culturas (KATO, 2008).

As actinobactérias ou actinomicetos são bactérias gram-positivas com algumas características semelhantes a dos fungos, e por isso são constantemente confundidas com os mesmos. No entanto, ao contrário dos fungos, são organismos procarióticos e em sua grande maioria aeróbios. São bem conhecidos como produtores de metabólitos secundários e, conseqüentemente, de interesse farmacológico e comercial elevado.

Em 1942, Selman Waksman descobriu que as bactérias do solo que ele estava estudando produziam actinomicina, esta descoberta que lhe concedeu o Prêmio Nobel. Desde então, a centenas de outros fármacos que ocorrem naturalmente têm sido descobertos nestes micro-organismos, especialmente do gênero *Streptomyces*.

Diante de tal capacidade de produção de metabolitos os actinomicetos tem despertado o interesse de vários grupos que pesquisam enzimas. Pois além de serem um grupo de bactérias filamentosas bem diverso capazes de sobreviver em um grande número de nichos ecológicos. Eles são uma fonte promissora de enzimas importantes, alguns dos quais são produzidos em escala industrial.

Apesar deste grupo ser extremamente diverso, quatro gêneros têm sido mais amplamente estudados em relação à sua atividade celulolítica: *Microbispora*; *Streptomyces*; *Thermoactinomyces* e *Thermomonospora*, incluindo actinomicetos mesofílicos e termofílicos (STUTZENBERGER, 1971; GALLAGHER *et al.*, 1996; YAZDI *et al.*, 2000; TUNCER *et al.*, 2004; LYKIDIS *et al.* 2007; NODA *et al.* 2011; ANNÉ *et al.* 2012).

Estudos recentes com uma actinobactéria do gênero *Streptomyces* da espécie *S. lividans* relatou a eficiência quanto a produção de enzimas (NODA *et al.*, 2012). Esse microrganismo foi descrito como um bom produtor de celobiohidrolase e xilanoglicosidades. A fim de melhorar a capacidade do *S. lividans* que degradam a celulose, mantendo a sua capacidade para produzir compostos, nós analisamos a atividade elevada endoglucanase e construído um sistema de co-expressão, envolvendo dois genes diferentes. No entanto Noda e colaboradores (2013) sugerem que essa espécie pode ter seu potencial elevado quando combinado com outras espécies de actinobactérias.

1.8 Gênero *Streptomyces* sp.

Dentre o filo de actinobactérias o gênero que tem maior destaque é o das *Streptomyces*, um gênero composto por bactérias gran-positivas, muito semelhantes aos fungos. Ambos possuem hifas e formam corpo vegetativo, esporos e hifas aéreas. Estas semelhanças provavelmente são resultado de adaptações a nichos ecológicos. Apesar da sua semelhança os mecanismos subjacentes têm diferentes origens evolutivas. Como os

fungos, a maioria dos estreptomicetos vivem como saprófitas no solo, apesar de algumas espécies de *Streptomyces* também habitarem com sucesso uma ampla gama de outros nichos, tanto terrestres quanto aquáticos (OMURA, 2001; HOPWOOD, 2009; PATZER, 2010; KHAN, 2011).

A crescente busca por compostos que possam substituir com melhor eficiência os existentes no mercado tem colocado os microrganismos do gênero *Streptomyces* em uma posição de destaque pois a riqueza insuperável e diversidade do metabolismo secundário de *Streptomyces* tornou estes organismos prestadores de valiosos antibióticos e outras moléculas bioativas (FLÄRDH, 2003; CARBALLIDO-LOPEZ, 2006; PATZER, 2010; KHAN, 2011).

A história de antibióticos derivados de espécies de *Streptomyces* começou com a descoberta da estreptotricina em 1942, e com a descoberta da estreptomicina, dois anos depois, os cientistas intensificaram a busca por antibióticos dentro do gênero. Hoje, 80% dos antibióticos são provenientes de gênero *Streptomyces*, sendo os actinomicetos, o grupo de microrganismos mais pesquisado quando se fala em antibióticos (WATVE, 2001; CHOPRA, 2002; BRÖTZ-OESTERHELT, 2008; NIKAIDO, 2009; MARTINEZ, 2009; KOHANSKI, 2010; ANDERSSON, 2010; BARBE, 2011)

A capacidade dos estreptomicetos produzirem antimicrobianos despertou a curiosidade dos pesquisadores em verificar se este gênero também é capaz de produzir enzimas de interesse industrial. E na última década diversos trabalhos tem sido publicados nesta área. Atividade endoglucanásica foi encontrada em várias espécies de *Streptomyces* como: *S. malaysiensis* AMT-3, *S. drozdowiczii* M-7A, e *S. viridobrunneus* (JAN and CHEN, 2003; LIMA *et al.*, 2005; GRIGOREVSKI-LIMA, 2005; NASCIMENTO, 2009; DA VINHA, 2011). Em 1968, Lima e colaboradores fizeram o primeiro relato de *S. capoamus* como produtor de antibióticos, antifúngicos e antitumorais. Muitos anos se passaram e ainda nos dias de hoje esta espécie ainda é bastante explorada para a produção de anguciclinas e anguciclinonas, além de um grande grupo de metabólitos secundários formados por cadeias aromáticas (GISBERT *et al.*, 2013).

Devido ao grande potencial das actinobactérias e a crescente aplicabilidade de enzimas na área biotecnológica, torna-se viável selecionar e identificar microrganismos produtores do complexo celulolítico. No entanto, há necessidade de instrumentos para a

transformação biotecnológica, sendo o pré-tratamento um elemento chave para a conversão biológica da celulose, tornando o processo mais ecológico e econômico, pois diminui o gasto das máquinas, reduz a formação de lodo e diminui os custos com aterro.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Produzir e caracterizar celulases extracelulares produzidas por actinobactérias.

2.2 Objetivos específicos

- a. Selecionar actinobactérias produtoras de celulases (extracelulares);
- b. Otimizar as condições de produção da enzima;
- c. Caracterizar o complexo celulolítico.

3. METODOLOGIA

3.1 Linhagens de actinobactérias utilizadas

A primeira etapa de execução do referido trabalho constituiu na seleção de actinobactérias depositadas na coleção de culturas do departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco/DANTI-UFPE. Neste trabalho foram selecionados dois grupos de actinobactérias, um isolado da rizosfera de plantas de guaraná situadas no município de Maués no Estado do Amazonas e o outro grupo isolado da rizosfera de plantas da caatinga no Estado de Pernambuco. Foram utilizados no desenvolvimento deste trabalho 87 actinobactérias, gentilmente cedidos pela coleção de culturas do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE. Esta coleção também é responsável pela manutenção e preservação destas linhagens.

3.2 Meios de cultura

Nas primeiras etapas dos ensaios, as actinobactérias foram reativadas em diferentes meios de cultura e no mesmo meio em que foram isoladas, abaixo estão descritos os meios utilizados neste trabalho. Os isolados foram cultivados em placas de Petri e/ou tubos de ensaio em meio de cultura inclinado.

3.2.1 Meio ISP2

Composição em g/L

Materiais	Quantidade
Extrato de levedura	4,0 g
Extrato de malte	1,0 g
Dextrose	4,0 g
Água Destilada	1000 mL
pH	7,2

3.2.2 Meio ISP3 (farinha de aveia)

Composição em g/L

Materiais	Quantidade
------------------	-------------------

Farinha de aveia	20,0 g
Agar	15,0 g
Solução de sais*	1,0 mL
Água Destilada	1000 mL
pH	7,2

* Composição da solução de sais

Materiais	Quantidade
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,10 g
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,10 g
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	0,10 g
Água Destilada	100 mL

3.2.3 Meio ISP5

Composição em g/L

Materiais	Quantidade
L – asparagina	1,0 g
Glicerol	1,0 g
K ₂ HPO ₄	1,0 g
Água Destilada	1000 mL
Solução de sais*	1,0 mL
pH	7,0 – 7,4

*vide preparo da solução no item acima

3.2.4 Meio ALA

Composição em g/L

Materiais	Quantidade
L – asparagina	0,30 g
Glicose	1,0 g

Glicerol	1,0 g
K ₂ HPO ₄	0,30 g
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,20 g
NaCl	0,30 g
Extrato de levedura	1,0 g
Solução de sais*	1,0 mL
Água Destilada	1000 mL
pH	6,4

3.2.5 Meio Indutor de celulase

Composição em g/L

Materiais	Quantidade
KCl	3,0 g
K ₂ HPO ₄	2,0 g
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,10 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,0 g
Carboximentilcelulose	10,0 g
Água Destilada	1000 mL
pH	7,0

3.3 Triagem de actinobactérias produtoras de celulase

As actinobactérias isoladas foram reativadas em meio ISP-2, ISP-3,ISP-5, ALA (considerando o meio em que foi isolado) e inoculadas em meio sólido indutor específico (item 3.2.5 acrescido de ágar) para verificar a produção de celulase, contendo uma única fonte de carbono carboximetilcelulose a 1% (CMC).

A determinação qualitativa da atividade enzimática foi realizada em triplicata por meio do método de “cup-plate” modificado, em meios de cultura sólido contendo 15 g/L de ágar e 10 g/L do substrato (CMC). Em seguida foram incubados à 37°C por 120 horas, sendo acompanhadas a cada 12 horas. A seleção das actinobactérias produtoras

das enzimas celulasas foi visualizada com formação de halos de degradação, com a adição de solução corante no meio de cultivo (vermelho congo a 0,1%) para celulase. Com o aparecimento de halos, a atividade hidrolítica das actinobactérias foi estimada semi-quantitativamente, usando um índice enzimático (IE), o qual foi expresso pela razão do diâmetro médio do halo de degradação pelo diâmetro do crescimento da colônia. Foram selecionados os dois melhores produtores (HANKIN e NAGNOSTAKIS, 1975; SILVA, 2013).

3.4 Obtenção do complexo celulolítico produzido pela actinobactéria selecionada

O pré-inoculo para fermentação foi realizado em frascos Erlenmeyer com capacidade de 250 mL, contendo 50 mL de meio ISP2 líquido, onde foram adicionados 5 discos com 0,9 cm diâmetro das actinobactérias com 7 dias de crescimento e incubados por 48 h sob agitação de aproximadamente 150 rpm a 37°C. O ensaio foi realizado em duplicata. Após o preparo do pré-inoculo, um volume de 1,0 mL da solução de cultivo, foi inoculado, em erlenmeyer de 125 mL, contendo 50 mL de meio líquido indutor de celulase, acrescido de 1 % (m/v) da fonte de carbono. Os frascos foram incubados a 37°C, por 7 dias sob agitação de 180 rpm. Os ensaios foram realizados em triplicata. Decorrido o período de incubação, o caldo metabólico foi centrifugado a 10000 rpm por 5 minutos, para a obtenção do extrato bruto (sobrenadante) que posteriormente foi utilizado para quantificação da atividade enzimática celulolítica extracelular e dosagem de proteína, mantendo-se o restante do material para posteriores análises conservado a 4°C, em refrigerador.

3.5 Quantificação da atividade endoglucanásica (CMCásica)

A atividade endoglucanásica foi quantificada de acordo com Ghose (1987) modificado. Em microtubos de 2 mL, foram adicionados 50 µL do extrato enzimático, em seguida, foram adicionados 50 µL de solução de CMC 1% em tampão acetato-fosfato pH 5,5. A mistura foi incubada imediatamente a 50°C por 30 min. Decorrido o tempo reacional, foram adicionados 100 µL do reagente DNS, seguido de incubação a 100°C por 5 min. Após este período, foram adicionados 750 µL de água, seguido de homogeneização. A intensidade da cor formada foi detectada em espectrofotômetro a 540 nm, após a calibração do equipamento com o branco reacional. O cálculo da atividade enzimática e a curva padrão foram obtidos segundo metodologia de Miller (1959).

3.6 Quantificação da β -glucosidade

A dosagem de beta-glicosidase foi adaptada para leitura em leitor de Elisa, utilizando a metodologia descrita por Tan et al, (1987). Em cada poço da placa de 96 poços foram adicionados 17 μ L do extrato enzimático e 67 μ L de p-nitrofenil-beta-glicopiranosídeo (pNPG) 0,2% tamponado em acetato de sódio a 50 mM (pH 4,8). Posteriormente as placas foram incubadas por 30 min a 50°C em estufa e a reação foi interrompida ao adicionar 167 μ L de bicarbonato de sódio a 10%. As leituras foram feitas em leitor de Elisa a 405 nm. Os ensaios foram realizados em triplicata.

3.7 Determinação do teor de proteínas

Para determinação de concentração de proteína, foi construída uma curva padrão utilizando-se uma solução de albumina bovina sérica (BSA) nas concentrações de 5 a 30 mg/L. A quantificação de proteínas totais foi adaptada de Bradford (1976); o método foi conduzido em escala micro volumétrica onde a 800 μ L do extrato foram adicionados 200 μ L do reativo Bradford (BioRad). Essa solução foi incubada, em temperatura ambiente (22 à 25°C) por 5 min e após este período, foram adicionados 1000 μ L de água destilada. O produto da reação foi quantificado por espectrofotometria em 595 nm, após calibração do equipamento com o branco reacional.

3.8 Seleção de diferentes fontes de carbono

Para selecionar a melhor fonte de carbono indutora da produção do complexo celulolítico excretado pelas actinobactérias selecionadas foram utilizados, carboximetilcelulose e os resíduos: bagaço de cana, sabugo de milho, casca de maracujá e resíduo da hidrodestilação de Pau-Rosa.

Para definir as melhores condições de cultivo da actinobactéria selecionada e a fim de maximizar a produção de celulase, foi selecionado primeiramente a melhor fonte de carbono para o meio de cultura e com melhor reprodutibilidade de compostos presentes na mesma. Para isso testou-se as quatro (4) fontes de carbono citadas acima. Cada ensaio foi realizado em triplicata conforme os itens de 3.4 a 3.5 e as médias de atividade enzimática encontradas foram utilizadas para os cálculos de produção. Mantendo as demais condições físico-químicas (pH, temperatura e agitação) do meio em que a actinobactéria foi isolada.

3.9 Otimização da concentração da fonte de carbono para produção do complexo celulolítico

Após a seleção das fontes de carbono que afetam a produção de celulase, realizou-se a otimização da concentração deste componente visando a máxima produção do complexo enzimático. Para tanto foram preparados ensaios em triplicata contendo concentrações diferentes da fonte de carbono selecionada, as concentrações estudadas foram de 0,5%, 1,0%, 1,5%, 2,0%, 2,5% e 3,0%. Cada ensaio foi realizado em frascos erlenmeyer de 150 mL de capacidade, com volume final do meio de cultivo de 50 mL, incubadas a temperatura de 37 °C, sob agitação de 180 rpm e o período de incubação onde obteve-se o pico de produção do complexo como descrito no item 3.4.

3.10 Otimização da temperatura de produção do complexo enzimático

A determinação da temperatura ótima da produção da enzima foi realizada utilizando as informações obtidas nos itens 3.9 e 3.10 para a formulação do meio e incubado nas temperaturas de 30°C, 35°C, 40°C, 50°C e 55°C. Todos os testes foram realizados em triplicata.

3.11 Otimização do pH de produção do complexo enzimático

Tendo determinado as condições supracitadas definiu-se o pH inicial ótimo para a produção do complexo enzimático. Inicialmente preparou-se um meio de cultura nas condições definidas anteriormente onde apenas foi ajustado para o pH inicial desejado utilizando tampão de McIlvaine 50 mM nos pH's 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 e 8,0 e incubados em condições previamente definidas. Os experimentos foram realizados em triplicata.

3.12 Caracterização parcial do complexo celulolítico excretado pela actinobactéria

Após a definição das condições ótimas de produção, o referido microrganismo foi cultivado nas condições definidas e seu complexo celulolítico foi caracterizado quanto temperatura ótima, pH ótimo, perfil proteico, pH e temperatura ótima da reação,

estabilidade térmica, estabilidade em diferentes pH's, efeito de íons e determinação dos parâmetros cinéticos aparentes.

3.12.1 Determinação do pH ótimo e da temperatura ótima do complexo celulolítico

Tal complexo enzimático foi incubado em diferentes temperaturas (30°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C, 80°C e 90°C), a fim de se determinar a temperatura ótima de atividade desse complexo celulolítico, como também foi incubado com o substrato em soluções tampões de diferentes pHs (3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 e 8,0), para a determinação do pH ótimo.

3.12.2 Eletroforese em gel poliacrilamida em condições desnaturantes (PAGE-SDS)

A determinação do perfil proteico da amostra obtida foi feita, através de corrida eletroforética em géis de poliacrilamida (PAGE-SDS), pela metodologia em sistema desnaturante, bem como a determinação da massa molecular das mesmas, sendo os géis corados com nitrato de prata. Para o preparo da amostra foi liofilizado 200 µL de extrato e posteriormente ressuspendido em 20 µL em tampão de amostra (PAGE-SDS) 2X, fervendo por cinco minutos e imediatamente aplicadas no gel.

A eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS foi realizada em placa Mini-PROTEANR – Tetra Cell da Bio-Rad, de acordo com método de Laemmli (1970), utilizando-se poliacrilamida a 12%, conforme soluções descritas a seguir. O tempo de corrida foi de aproximadamente 1 hora e 30 minutos, sob corrente de 150 V. O volume aplicado de cada uma das amostras foi de 10 µL, 20µL do complexo celulolítico e 5 µL do marcador com as seguintes massas moleculares: 170, 130, 95, 72, 55, 43, 34, 25, 17 e 10 kDa. O composto utilizado para efetuar a dissociação foi o detergente iônico Dodecil Sulfato de Sódio (SDS). A amostra foi desnaturada por aquecimento a cerca de 100°C, durante cinco minutos, na presença de SDS e de reagente sulfidrílico (β-mercaptoetanol). Os géis foram retirados das placas e a revelação da proteína foi feita com nitrato de prata, por ser mais sensível (HEUKEAHIVWN, DERNICK, 1985).

O protocolo consiste nas seguintes etapas: fixação do gel de poliacrilamida em uma solução de metanol (50%), ácido acético (12%), formaldeído (7,5%) e água. Após esta etapa, sensibiliza-se o gel em uma solução de etanol (30%) e tiosulfato de sódio

(31,35%). Em seguida, lava-se o gel 2 vezes com água, e se impregna o gel em uma solução de nitrato de prata 2,0%. A revelação do gel foi feita com uma solução contendo carbonato de sódio, formaldeído, solução de tiosulfato de sódio e água, e então se interrompeu a reação das proteínas com o nitrato de prata utilizando-se uma solução “stop” composta de metanol, ácido acético e água.

A massa molecular do complexo celulolítico foi estimada através da construção de um gráfico contendo na ordenada o logaritmo da massa molecular das proteínas padrões e na abscissa o coeficiente da relação de migração (Rf) de cada banda protéica, isto é, suas respectivas mobilidades relativas.

3.12.3 Determinação do pH e temperatura ótima de reação de quantificação da atividade enzimática.

Após a definição das condições ótimas de produção, a actinobactéria foi cultivada nas condições previamente definidas e o complexo celulolítico foi caracterizado quanto temperatura ótima e pH ótimo conforme item 3.12.1.

3.12.4 Determinação da estabilidade térmica

A estabilidade térmica foi avaliada através de incubação do complexo celulolítico a 35 °C por 5, 10, 20, 30 e 60 min e a 50 °C por 5, 10 e 20 min e a 65 °C por 5 e 10 min, na ausência de substrato. As amostras foram então retiradas, sendo determinada a atividade residual, utilizando o método DNS, conforme descrito anteriormente. Todos os ensaios foram realizados em triplicatas.

3.12.5 Determinação da estabilidade em diferentes pHs

A estabilidade do complexo celulolítico a diferentes pHs foi realizada com amostras preparadas na proporção de 1:1, enzima:tampão (v/v), utilizando-se tampão McIlvaine de 4,0 a 8,0, com variação de 0,5 pontos entre cada amostra. Após 24h de incubação, em temperatura ambiente laboratorial (~25 °C), foi determinada a atividade celulolítica residual, conforme descrito anteriormente. Todos os ensaios foram realizados em triplicatas.

3.12.6 Efeito de íons sobre a atividade celulolítica

O efeito de potenciais ativadores e inibidores da atividade celulolítica foi avaliado pela incubação do complexo celulolítico em soluções à 10 mM e 5 mM das seguintes substâncias: sulfato de magnésio ($MgSO_4$), sulfato de zinco ($ZnSO_4$), cloreto de cálcio ($CaCl_2$) e cloreto de ferro ($FeCl_3 \cdot CH_2O$) sendo suas atividades celulolítica medidas de acordo com a metodologia descrita no item 3.5. Todos os ensaios foram realizados em triplicatas.

3.12.7 Determinação dos parâmetros cinéticos aparentes

Os parâmetros cinéticos aparentes foram determinados pelas constantes de Michaelis-Menten (K_m) e a velocidade máxima da reação ($V_{máx}$) da enzima celulase foi estimada pelo procedimento gráfico proposto por Lineweaver e Burk (1934). Para tanto, foi utilizado como substrato, diferentes concentrações de carboximetilcelulose (2 a 50 mg/mL), e a atividade enzimática foi determinada conforme procedimento descrito anteriormente. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas, e a reta foi calculada por regressão linear, a partir das médias dos valores obtidos em cada experimento. Fórmula: $\hat{Y} = a + bX$

3.13 Gel de Atividade (Zimograma)

As análises de Zimograma foram realizadas segundo metodologias descritas por Teather & Wood, 1982 e Takenaka *et al.*, 1999, ambas com modificações. As amostras foram inicialmente dialisadas contra água destilada a 4°C por 24 h, em sacos de celulose regenerada (INLAB), com porosidade de 25 Å, e tamanho de corte de 12 a 16 kDa. Posteriormente, as amostras foram liofilizadas, ressuspensas em tampão de amostra 2x, fervidas por 5 min e submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante.

O preparo do gel e a corrida eletroforética seguem o mesmo procedimento descrito no item 3.12.2. Para a revelação da atividade celulolítica foi adicionado CMC a 0,2% na malha do gel separador. Ao término da corrida, o gel foi incubado durante 1 h,

sob agitação, em Triton X-100 1% e em seguida, foi lavado 3 vezes com água destilada e incubado a 50°C durante 1 hora em tampão citrato de sódio 50 mM pH 4,8, pré-aquecido a 50°C, durante 12 h, sob agitação. Após a incubação em tampão citrato o gel foi lavado com água destilada, incubado em solução de Vermelho do Congo 0,1% sob agitação durante 20 min e foi lavado com NaCl 1 M até o aparecimento dos halos de atividade enzimática. Para uma melhor visualização, foi adicionado HCl 0,1 M sobre a solução de NaCl. As bandas de atividade foram visualizadas no gel.

3.14 Análise de açúcar redutor e atividade enzimática do sobrenadante

Nesta etapa do trabalho avaliou-se o produto gerado pela hidrólise da carboximetilcelulose (1%), incubada a 60°C por 10, 30 e 60 minutos. A mistura reacional foi realizada na proporção de 1:1 (Carboximetilcelulose: complexo enzimático), após os respectivos tempos de incubação a mistura reacional foi centrifugada por 5 minutos a 10000rpm e o sobrenadante (produto de hidrólise do carboximetilcelulose) foi analisado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando uma coluna AMinex HPX-87H⁺ (300 mm x 7,8 mm, Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA) em um cromatógrafo da SHIMADZU (LC 20AD), a 60°C e detecção por índice de refração. Foram realizadas injeções de 20 µL, a vazão de 0,6 mL/min, utilizando como fase móvel H₂SO₄ a 5 mM e padrões celobiose, glicose, xilose, xilitol, glicerol, ácido acético e etanol.

3.15 Planejamento experimental

Foram realizados três planejamentos fatoriais completos, sendo dois para a produção do complexo enzimático e um para **caracterização do complexo**, sendo dois delineamento composto central completo 2³ (um para verificar a produção do complexo e outro para a caracterização) um delineamento composto central com pontos rotacionais (DCCR), cuja matrizes estão apresentadas nas Tabelas 2 e 3, para selecionar as variáveis independentes – concentração do substrato, temperatura, pH inicial do cultivo que podem influenciar de forma estatisticamente significativa as atividades enzimáticas. Para as variáveis que demonstraram maior influência quando analisadas separadamente, utilizando-se o extrato produzido nas condições determinadas como ótimas, a fim de se buscar maiores valores de atividade enzimática. Com variável dependente foi avaliada a atividade enzimática do complexo em U/mL. O *software Statistica* 8.0 foi utilizado como ferramenta para analisar os dados experimentais.

Tabela 2 – Matriz do planejamento experimental fatorial completo 2³ (Primeiro e segundo planejamento).

	Temperatura	pH	Concentração de CMC []	Planejamento 1		
1	-1	-1	-1	-1	0	1
2	1	-1	-1	temperatura	40	45
3	-1	1	-1	pH	3,5	4,0
4	1	1	-1	[CMC]	1,5	2,0
5	-1	-1	1			
6	1	-1	1			
7	-1	1	1			
8	1	1	1			
9	0	0	0			
10	0	0	0			
11	0	0	0			
12	0	0	0			

Com base no resultado do planejamento 1 foi realizado um segundo planejamento DCCR (Tabela 3), assim, utilizando a ferramenta do planejamento experimental foi possível investigar a influência das variáveis na produção enzimática. Determinando as melhores condições de cultivo em meio líquido para promover as maiores atividades enzimáticas.

Tabela 3 - Matriz do planejamento experimental fatorial completo 2³ com pontos axiais

	Temperatura	pH	Concentração de CMC []	Planejamento 2					
1	-1	-1	-1	-1,68	-1	0	1	1,68	
2	1	-1	-1	temperatura	33	35	40	45	47,05
3	-1	1	-1	pH	2,8	3,0	3,5	4,0	4,20
4	1	1	-1	[CMC]	1,8	2,0	2,5	3,0	3,20
5	-1	-1	1						
6	1	-1	1						
7	-1	1	1						
8	1	1	1						
9	-1.68	0	0						
10	1.68	0	0						
11	0	-1.68	0						
12	0	1.68	0						
13	0	0	-1.68						
14	0	0	1.68						
15	0	0	0						
16	0	0	0						
17	0	0	0						
18	0	0	0						

O delineamento experimental representado pela matriz na tabela 4 foi utilizado para a caracterização do complexo enzimático.

Tabela 4 – Matriz do planejamento experimental fatorial completo 2³ para a caracterização do complexo enzimático

	Temperatura	pH	Tempo de reação	Planejamento 1		
1	-1	-1	-1			
2	1	-1	-1	Temperatura	40	60 80
3	-1	1	-1	pH	3,5	5,5 7,5
4	1	1	-1	Tempo de reação	5	7 9
5	-1	-1	1			
6	1	-1	1			
7	-1	1	1			
8	1	1	1			
9	0	0	0			
10	0	0	0			
11	0	0	0			
12	0	0	0			

3.16 Identificação molecular

A actinobactéria que apresentou melhor resultado quanto a atividade celulolítica foi selecionada para a identificação taxonômica em nível de espécie. Foi realizada a extração de DNA total segundo a metodologia de Sambrook e colaboradores (1989), seguido da amplificação do gene DNA 16S. A extração de DNA foi realizada a partir de culturas cultivadas em meio líquido, seguida de centrifugação e extração do DNA através do Kit wizard Genomic DNA Purification (Promega). A eletroforese em gel de agarose foi utilizada para avaliar a integridade do DNA. Após, foi realizada a amplificação por PCR, utilizando oligonucleotídeos universais para Eubacteria fD1 (5'-AGAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e rD1 (5'-CGGTGTGTACAAGGCCCGGGGAACG-3') (WEISBURG et al., 1991). A amplificação foi realizada em volume final de 50 µL contendo 10 a 15 ng de DNA, 5 pmol de cada oligonucleotídeo, 200 µM de dNTP, 1,5 µM de MgCl₂, 1U Platinum Taq DNA Polimerase (Invitrogen Life Technologies). A reação de PCR foi realizada em termociclador programado para realizar desnaturação inicial 94°C por 4 min, 30 ciclos de desnaturação, anelamento e extensão (94°C/30 s, 63°C/1min e 72°C/7min, respectivamente). Após a amplificação, 5µL da reação de PCR foram avaliadas por

eletroforese em gel de agarose (1,2% p/v) a 3volts/cm-1 em tampão TBE 1x e corado com Sybr safe (invitrogen life Technology. O Produto da amplificação foi sequenciado e a sequência comparada com todas as sequências no Genbank, utilizando o software Blast do National Center for Biotechnology Information (NCBI) (WWW.ncbi.nlm.nih.gov). As sequências foram alinhadas usando o software Clustal.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Seleção do microrganismo produtor de celulase

Existem vários trabalhos na literatura relacionados à potencialidade das enzimas celulolíticas em diferentes biomas entretanto trabalhos envolvendo a microbiota da caatinga bem como da Amazônia ainda são incipientes (MENDES et al, 2015; CHANDRA et al, 2013; AKINOLA et al, 2012; NAKAZAMA et al, 2012; SILVA e CARMONA, 2008; AGUIAR et al, 2000). Neste contexto há necessidade de desenvolver trabalhos envolvendo estes biomas.

De um total de 87 isolados de actinobactérias avaliadas quanto à capacidade em degradar carboximetilcelulose, 23 linhagens, correspondendo a 27,6%, foram consideradas positivas para a produção do complexo celulolítico, apresentando halos de degradação em meio sólido contendo como única fonte de carbono a carboximetilcelulose (área de coloração diferente ao redor da colônia), como pode ser visualizado na Figura 10.

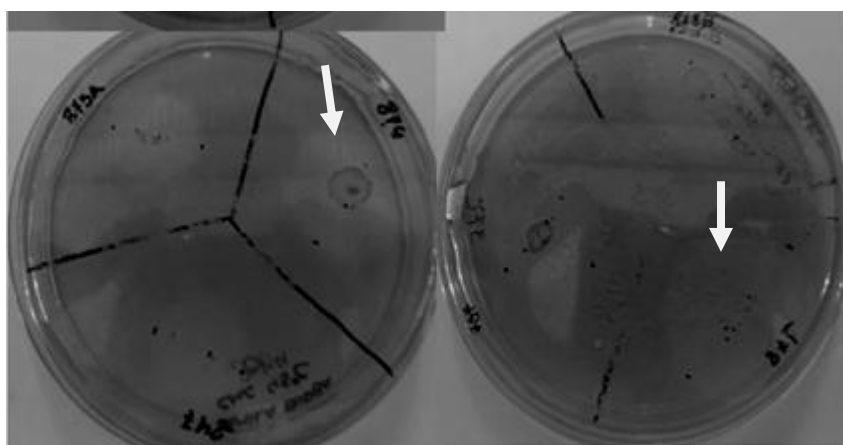


Figura 8 - Halo de produção enzimática em meio sólido (área mais clara ao redor da colônia).

A hidrólise enzimática da matéria-prima celulósica tem várias vantagens sobre os processos químicos, devido à sua potencial eficiência de sacarificação, bem como menor consumo de energia (SARATALE et al, 2008; SARATALE et al, 2010).

Portanto quatro linhagens de actinomicetos, sendo duas de origem amazônica (7N e 20G) e duas da caatinga (171X e 178), foram selecionadas para estudar a capacidade em excretar o complexo celulolítico em meio líquido de fermentação na

presença de diferentes substratos celulósicos (ver itens 3.3 e 3.4). As 4 linhagens foram capazes de produzir o complexo enzimático de interesse, no entanto o microrganismo 171X obteve um melhor aproveitamento quando cultivado em CMC, frente aos demais substratos testados. Os espécimes selecionados tiveram uma atividade significativa para a produção do complexo celulolítico com índices de halos enzimáticos que variavam de 1,1cm a 2,6cm de diâmetro (Figura 11).

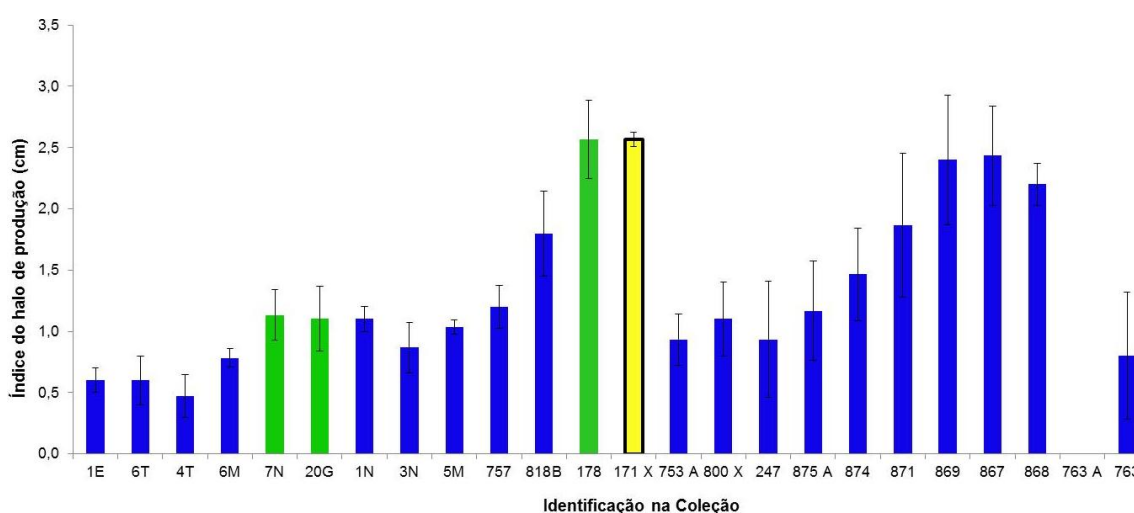


Figura 9 - Índice enzimático das actinobactérias que tiveram atividade para a produção do complexo celulolítico.

Após os testes qualitativos em placas optou-se por dar continuidade ao processo utilizando quatro das actinobactérias, sendo duas pertencentes ao bioma da caatinga e duas do bioma amazônico sendo as selecionadas as actinobactérias que apresentaram maior índice de degradação do carboximetilcelulose (7N, 20G, 171X e 178).

4.2. Estudo da fonte de carbono.

Com isso deu-se início a etapa de quantificação e cinética de produção do complexo celulolítico excretado em meio líquido de fermentação. Durante o processo fermentativo os microrganismos degradam a biomassa vegetal através da produção de enzimas extracelulares (SANTOS et al., 2011). Os resíduos agroindustriais podem ser utilizados neste processo não só como fonte de carbono, mas como suporte sólido (PANDEY et al., 2000). As actinobactérias utilizadas nesta etapa do trabalho foram cultivadas em diversos meios contendo diferentes resíduos como descrito no item 3.8 e

em todos os meios produziram quantidades diferentes do complexo celulolítico para cada resíduo (figuras 12, 13,14 e 15).

Na fermentação, utilizando carboximetilcelulose (CMC), resíduo de maracujá (RM) e resíduo de Pau-Rosa (PR) como substrato, a actinobactéria 171X apresentou pico de atividade da enzima CMCCase em 48 horas, 0,139 U/mL em CMC (Figura 12 A), 0,333U/mL em RM (Figura 12 B), 0,407U/mL em PR (Figura 12 C) e 0,060 U/mL em SM em 96 horas de cultivo (Figura 12 D).

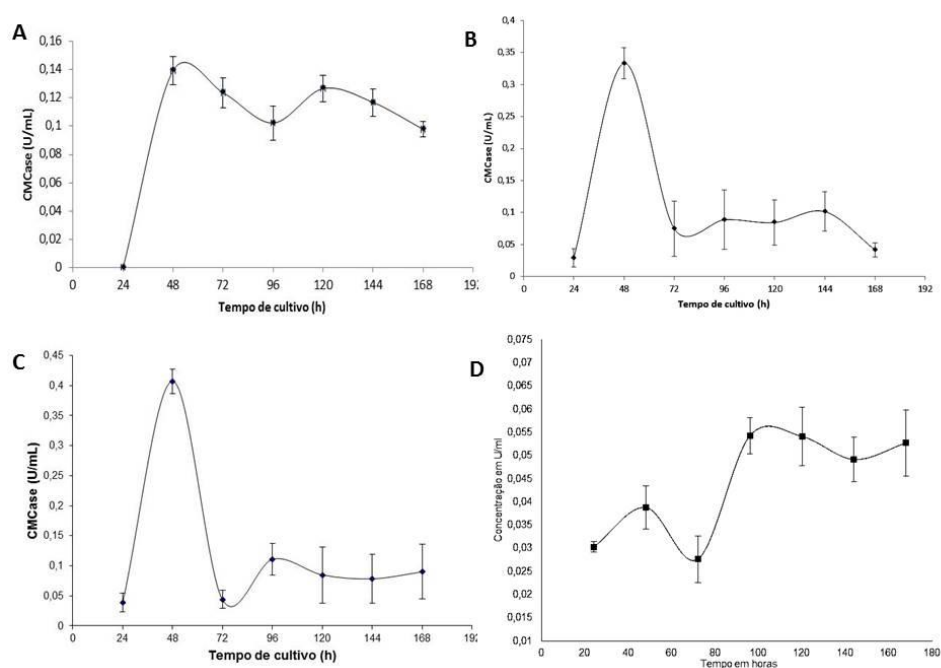


Figura 10–Cinética de produção de Endoglucanase excretada pela actinobactéria 171X em diferentes fontes de carbono: (A) Carboximetilcelulose, (B) Resíduo de maracujá (C)Resíduo dePau-Rosa, (D) Sabugo de milho.

A actinobactéria 178 apresentou pico de atividade da enzima CMCCase em 96 horas, apresentando 0,087 U/mL em CMC (Figura 13 A), 0,101U/mL em RM (Figura 13 B), 0,110U/mL em PR (Figura 13 C) e 0,054 em SM (Figura 13 D).

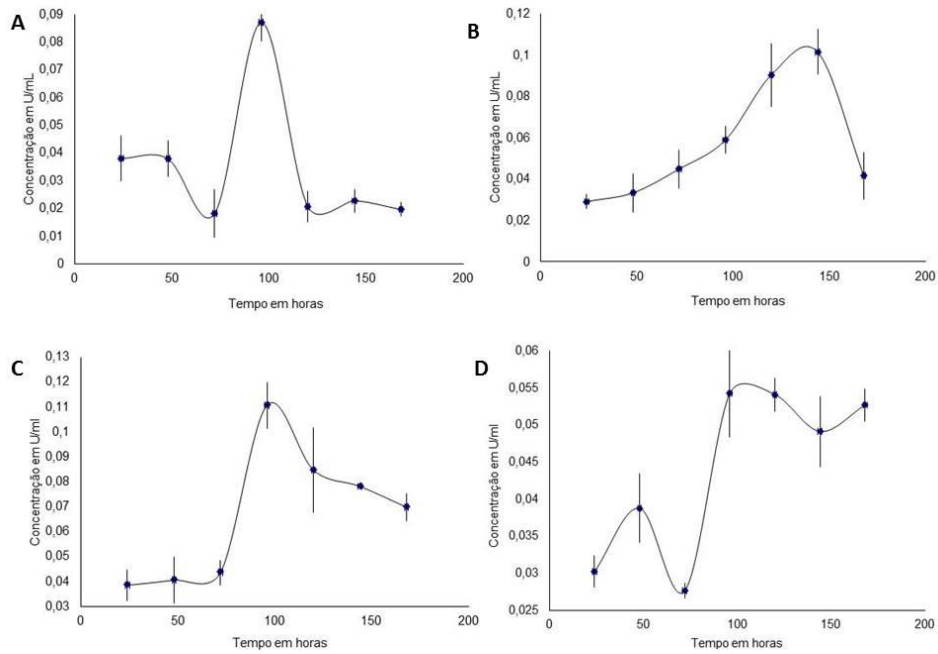


Figura 11 – Cinética de produção de Endoglucanase excretada pela actinobactéria 178 em diferentes fontes de carbono: (A) Carboximetilcelulose, (B) Resíduo de maracujá (C) Resíduo de Pau-Rosa, (D) Sabugo de milho.

A actinobactéria 7N apresentou pico de atividade da enzima CMCase em 144 horas, apresentando um pico de atividade enzimática de 0,038 U/mL para CMC (Figura 14 A), 120 horas com pico de 0,045 U/mL para RM (Figura 14 B) e 168 horas com pico de 0,071 U/mL para PR (Figura 14 C).

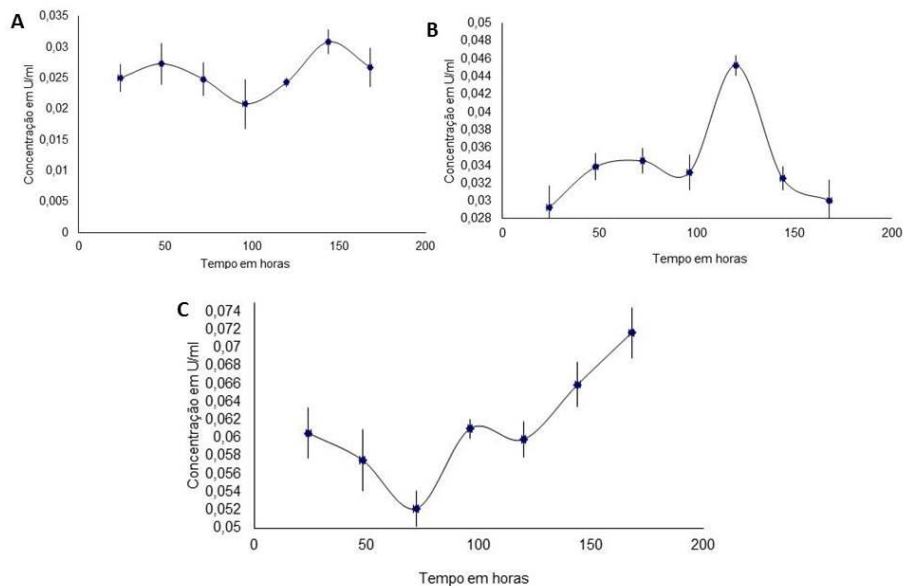


Figura 12 -Cinética de produção de Endoglucanase excretada pela actinobactéria 7N em diferentes fontes de carbono: (A) Carboximetilcelulose, (B) Resíduo de maracujá (C) Resíduo de Pau-Rosa,

A actinobactéria 20G apresentou pico de atividade da enzima CMCase em 96 horas, apresentando um pico de atividade enzimática de 0,031 U/mL em CMC (Figura 15 A), 24 horas com pico de 0,039 U/mL em RM (Figura 15 B) e 120 horas com pico de 0,070 U/mL em PR (Figura 15 C).

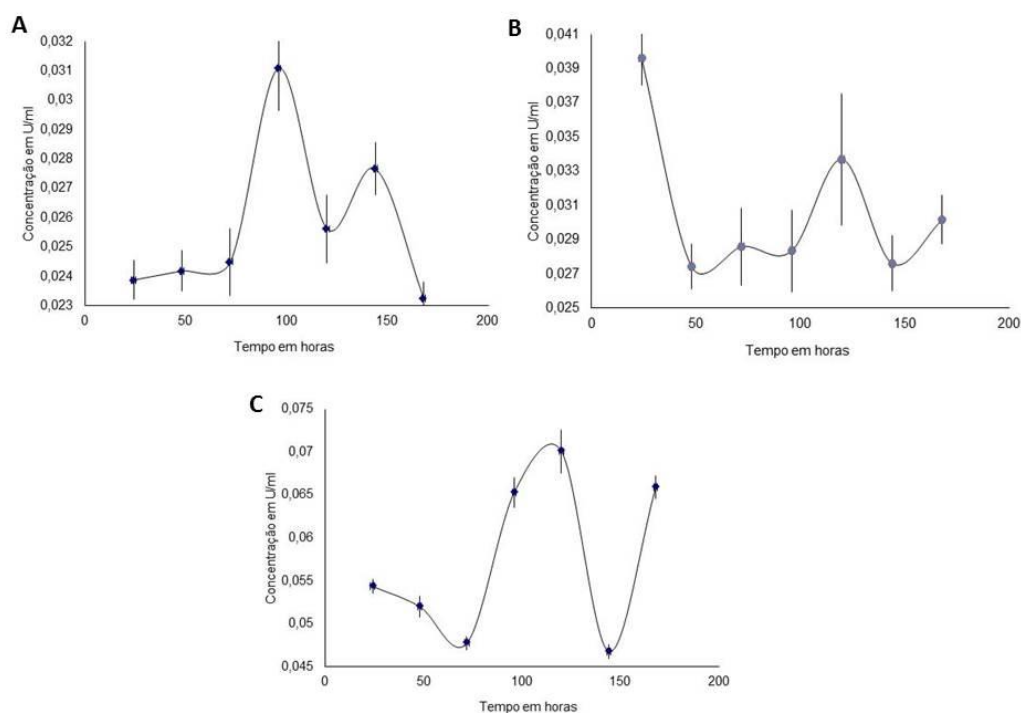


Figura 13- Cinética de produção de Endoglucanase excretada pela actinobactéria 20G em diferentes fontes de carbono: (A) Carboximetilcelulose, (B) Resíduo de maracujá (C) Resíduo de Pau-Rosa, (D) Sabugo de milho.

A partir dos dados obtidos foi possível observar que os substratos de baixo custo testados favoreceram a produção do complexo celulolítico. Resultados semelhantes aos encontrados por Ferreira e colaboradores (2011) e Santos e colaboradores (2011) ambos trabalhavam com fungos filamentosos. Além disso, tais pesquisadores em ambas as pesquisas obtiveram o pico de produção com 72 horas de cultivo. Ramirez e Coha (2003) reportaram a produção de celulases por 10 isolados de *Streptomyces*, com 72 horas de crescimento. Os valores de máxima atividade celulolítica também foram atingidos a partir das 72 horas de crescimento por outros isolados de *Streptomyces*, no estudo realizado por Ishaque & Kluepfel (1980). Levando em consideração o tempo que a actinobactéria utilizada neste trabalho levou para produzir o complexo celulolítico a

espécime testada pode ser considerada mais promissora para utilização industrial, no entanto este é apenas um dos critérios de avaliação.

Para dar continuidade aos demais testes foi selecionada a actinobactéria 171X por apresentar uma maior consistência nos resultados obtidos nas etapas supracitadas, também foi determinada nas etapas anteriores que o substrato a ser utilizado para otimizar a produção do composto foi o carboximetilcelulose por ser um substrato comercial e por isso possuir características mais constantes em sua formulação uma vez que os resíduos poderiam alterar suas características caso fosse trocado o fornecedor.

Outro parâmetro de grande importância a ser avaliado em trabalhos que visam melhorar a produção do complexo enzimático excretado por microrganismos é a concentração de fonte de carbono disponível no meio fermentativo. Neste contexto a atividade do complexo celulolítico produzido pelo microrganismo selecionado (171X) variou significativamente em resposta à concentração da fonte de carbono utilizada no meio de cultura para o crescimento do microrganismo. A produção da celulase foi significativamente maior conforme o aumento da concentração de CMC (Figura 16).

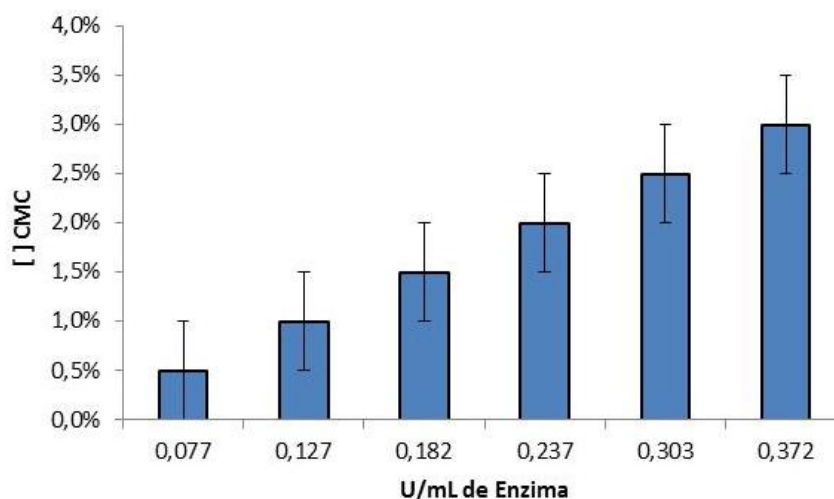


Figura 14- Atividade do complexo celulolítico em diferentes concentrações de CMC

Resultados semelhantes foram observados em outros trabalhos como os de Hsu e colaboradores (2011), Alani e colaboradores (2008), Li e colaboradores (1996). Na última década muitos trabalhos têm descrito que o aumento da concentração da fonte de carbono pode proporcionar o aumento na produção do composto de interesse,

principalmente no que se trata de enzimas hidrolíticas (AGRAWAL *et al.*, 2005; CHERRY; HUSSAIN; ANWAR, 2004; KONSULA; LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES, 2007; MESSAOUD *et al.*, 2004; TANYILDIZI; ÖZER; ELIBOL, 2005). No entanto, ainda não se provou se é a concentração aumentada do substrato que afeta a produção da enzima, se é a falta de outro composto no meio que desperta essa produção ou se são os produtos de degradação ou metabólitos formados durante a fermentação, que estimulam a síntese da enzima (SARATALE *et al.*, 2012; SAXENA *et al.*, 2007).

Ainda assim pode-se observar que a biossíntese do complexo celulolítico foi favorecida, quando altas concentrações de CMC foram utilizadas no meio de cultura (Figura 16). Embora o 171X crescesse satisfatoriamente em todas as concentrações testadas, a concentração de 3,0 g.L foi a que proporcionou uma melhor atividade da enzima, o que nos faz crer que se uma fermentação (líquida) com níveis ainda maiores de substrato fosse possível (o substrato torna-se sólido em concentrações maiores que 4%) essa atividade continuaria a subir cada vez mais. Além disso, a biossíntese do complexo celulolítico parece não ser dependente da disponibilidade de CMC no meio, uma vez que na sua ausência foram encontrados níveis baixos da atividade da enzima no meio de cultura não indutor.

Ainda a fim de otimizar a produção do composto utilizamos como outro parâmetro a temperatura de cultivo que é considerado um parâmetro de igual importância e que certamente influenciaria na produção e conseqüentemente na atividade enzimática. O perfil de temperatura da atividade das enzimas celulolíticas na presença de CMC foi estudado conforme o método descrito no item 3.10. Ainda utilizando CMC como substrato para a produção do complexo e a actinobactéria selecionada (171X) foi observada a temperatura onde se obteve a maior atividade enzimática do complexo celulolítico foi a 45°C como pode ser visualizado na Figura 17.

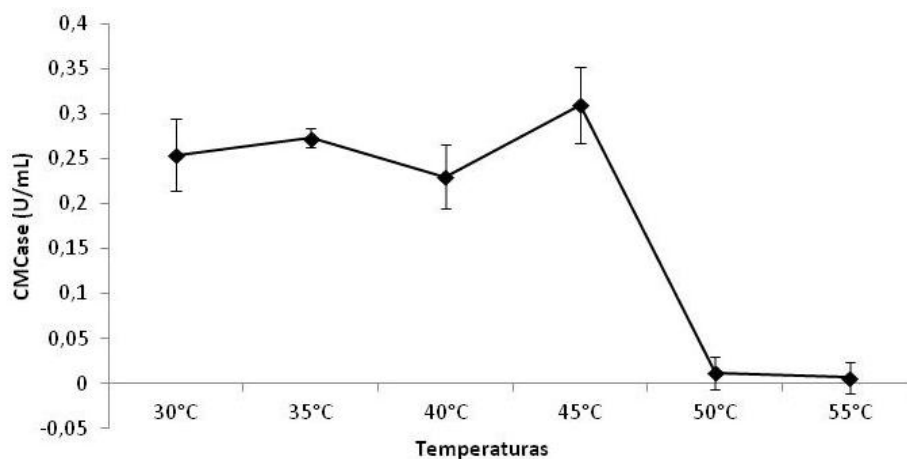


Figura 15 – Influência da temperatura na produção do complexo celulolítico

Temperaturas de cultivo similares, quando investigado a produção de celulasas, foram relatadas em outros trabalhos com actinobactérias (ALANI *et al.*, 2008; OKEKE *et al.*, 1992). Jang e colaboradores (2003) De Lima e colaboradores (2005) Arunachalam e colaboradores (2010) em seus trabalhos determinaram a temperatura ótima de produção de CMCCase como sendo 50°C. No entanto para este experimento foi observado que a partir de 45°C a atividade enzimática baixou, consideravelmente, chegando bem próxima a valores nulos. Fato este que pode ser explicado pelas diferenças ecofisiológicas comumente associadas a organismos de sistemas diferentes.

Os efeitos do pH na atividade enzimática é um dos fatores que necessita atenção, pois deve-se a esse fator a manutenção da estrutura da enzima, ou seja, manter os grupos críticos do centro ativo no estado de ionização correto para que as reações ocorram dentro do esperado. Com isso a análise do pH inicial da produção do complexo foi determinada para obter-se a melhor condição de produção do complexo enzimático.

O microrganismo foi inoculado em diferentes meios onde a única diferença entre os experimentos eram os pHs iniciais de cultivo como descrito no item 3.12. Após 48h do cultivo a atividade máxima foi observada no pH 4,0 chegando a 0,276 U/mL, como ilustra a figura 18. A atividade mais baixa do complexo celulolítico foi encontrada em pH 5,5 e 8,0 com atividades de 0,268 U/mL em ambos os pontos. Entretanto nos pH's de 6 à 7,5 atividade teve uma leve alta, e se manteve constante com atividade de 0,271U/mL (figura 18) a queda na atividade enzimática pode ter sido influenciada pelo tampão utilizado nesta etapa.

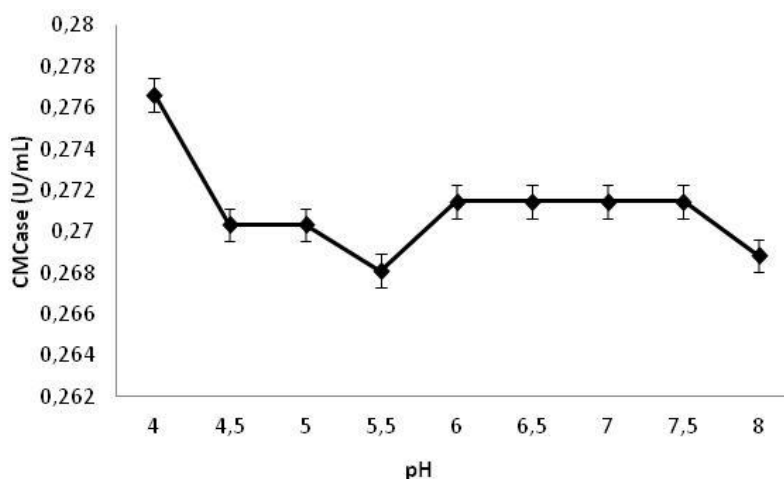


Figura 16–Produção do complexo CMCase em diferentes pH's

Resultados semelhantes relacionados ao pH inicial ótimo de complexos celulolíticos foram encontrados por George e colaboradores (2001) trabalhando com uma actinobactéria do gênero *Thermomonospora*. Ao trabalhar com fungos da espécie *Sporotrichum thermophile* Bajaj e cols. (2014) determinaram uma média de pH inicial ótimo semelhante as descritas acima utilizando resíduos celulolítico diferentes. Da mesma maneira Mawadza e colaboradores (2000) estudaram duas linhagens de *Bacillus* e as celulasas produzidas apresentaram uma ótima atividade nesta mesma faixa de pH. Em 1971, Stutzenberger e colaboradores já sugeriam que o pH ótimo para produção de celulasas por actinobactérias encontrava-se na faixa entre 4 e 5,5.

4.3 Caracterização do complexo CMCase.

A temperatura ótima da atividade enzimática do complexo celulolítico obtido foi determinada a partir dos parâmetros definidos no item 3.12.1. Observou-se com o decorrer dos experimentos que a reação de quantificação da atividade enzimática sofre influência da temperatura, comportamento já esperado, no entanto, o complexo celulolítico testado neste ensaio obteve um resultado satisfatório, pois manteve sua atividade residual superior a 80% nas temperaturas que variavam de 50 a 70°C. E mesmo nas temperaturas mais altas testadas sua atividade residual não foi inferior a 20% mesmo com a reação ocorrendo a 90°C, temperatura essa considerada extrema para a atividade de enzimas hidrolíticas, também vale ressaltar que na temperatura de 30°C a atividade residual não foi superior a 30%. O pico de atividade residual observada para o complexo celulolítico testado neste ensaio foi na temperatura de 60°C como pode ser visto na Figura 12.

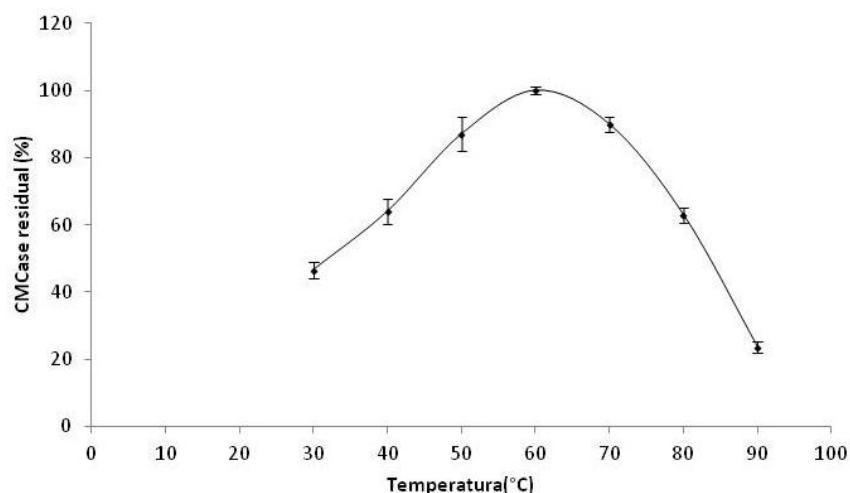


Figura 17 - Efeito da temperatura sobre a atividade do complexo celulolítico excretado por *S. capuamus*

Muitos trabalhos tem reportado que a atividade máxima das celulases produzidas por bactérias tem seu ápice de atividade em temperaturas que variam entre 50 e 55°C, e é interessante ressaltar que em todos os trabalhos citados a atividade em temperaturas superiores a 55°C cai para níveis abaixo de 40% da atividade residual (ISHAQUE e KLUEPFEL, 1980; LI e GAL, 1998; GEORGE *et al.*, 2001; SAHA *et al.*, 2006; PRASAD e SETHI R, 2013). Mesmo em trabalhos com actinobactérias do gênero *Streptomyces* (*S. halstedii*, *S. thermodiastaticus* e *S. reticuli*) os picos de produção têm apresentado uma atividade ótima de celulases à temperatura de 55 °C (CRAWFORD & MCCOY, 1972; GARDA *et al.*, 1997; RAMIREZ e COHA, 2003).

Conceitualmente sabemos que a atividade das enzimas estão associadas à sua conformação nativa, que depende de algumas condições específicas, e o pH é uma dessas condições. Visto isso, submeteu-se o complexo celulolítico produzido neste trabalho a testes para verificar a influência do pH na atividade enzimática do mesmo segundo descrito no item 3.13.1.

A atividade enzimática do complexo celulolítico testado não sofreu grandes influencias em todas as faixas de pH a que foi submetida. O pH em que a atividade da amostra obteve um pequeno destaque foi em pH 5,5 (levemente ácido). Nos pontos mais extremos do teste pH 2,5 e 8,0 a atividade do complexo foi superior a 80% levando em consideração o pico de atividade (Figura 20).

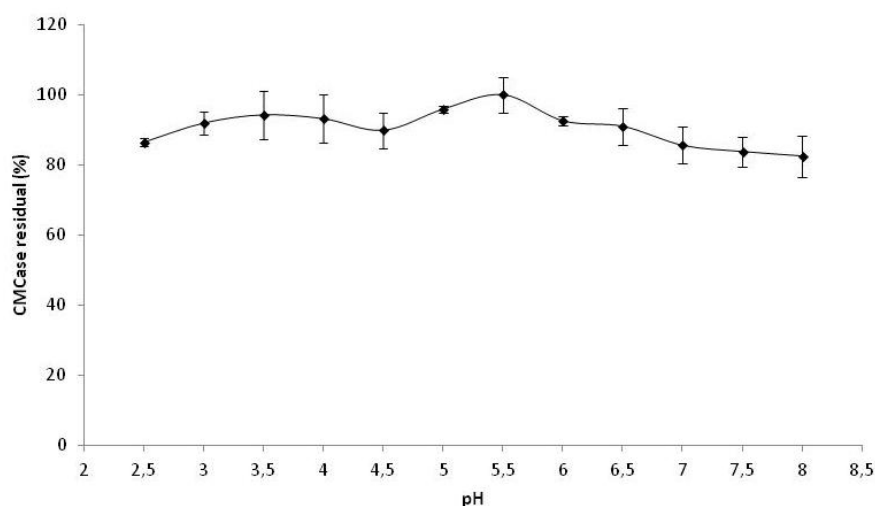


Figura 18 - Efeito do pH sobre a atividade celulolítica do complexo enzimático excretado por *S. capuamus*

Os resultados encontrados neste trabalho diferem das respostas encontrados por outros trabalhos onde as celulases produzidas por isolados de *Streptomyces* tem apresentado máxima atividade de hidrólise enzimática em pH 7,0 (ISHAQUE e KLUEPFEL, 1980; LI e GAL, 1998; GEORGE *et al.*, 2001; SAHA *et al.*, 2006; PRASAD e SETHIR, 2013). Trabalhos com microrganismos com resultados de valores de pH inferiores a 6,0 e acima de 7,0 costumam descrever uma grande perda na atividade de hidrólise enzimática. No entanto algumas celulases produzidas por *Streptomyces* (ISHAQUE e KLUEPFEL, 1980; LI e GAL, 1998; GEORGE *et al.*, 2001; SAHA *et al.*, 2006; PRASAD e SETHI R, 2013) têm máxima atividade de celulases em pH que variam de 4,5 e 6,0.

Resultados similares aos encontrados neste trabalho foram reportados por Gardae colaboradores (1997), onde *S. halstedii* apresentou máxima atividade de celulases em pH 6,0. Celulases produzidas por outros gêneros de actinomicetos, *Thermomonospora sp.*, apresentaram pH de 5,0 como seu ótimo e uma tolerância em ampla faixa de pH (4,0-10,0) onde a enzima permanece com 80% da atividade (ISHAQUE e KLUEPFEL, 1980; LI e GAL, 1998; GEORGE *et al.*, 2001; SAHA *et al.*, 2006; PRASAD e SETHIR, 2013).

Um problema comum a todos que desenvolvem projetos com enzimas ou complexos enzimáticos é a perda de atividade, devido essas moléculas serem instáveis em algumas condições, podendo leva-las a desnaturação. E não é incomum que as condições ótimas da atividade enzimática não sejam as mesmas que a conferem

estabilidade. No entanto a estabilidade da enzima é de extrema importância para sua utilização industrial.

Na Figura 21, são apresentados os perfis de estabilidade térmica do complexo enzimático aqui estudado em três temperaturas diferentes. O complexo manteve-se relativamente estável durante 180 minutos nas três temperaturas estudadas. No entanto observou-se que nos 60 primeiros minutos uma pequena alteração no perfil de estabilidade, a partir deste ponto e quando incubado a 80°C houve uma leve queda na atividade da enzima, ainda assim a atividade manteve-se superior a 80%, sendo essa temperatura insuficiente para a inativação da atividade do complexo enzimático.

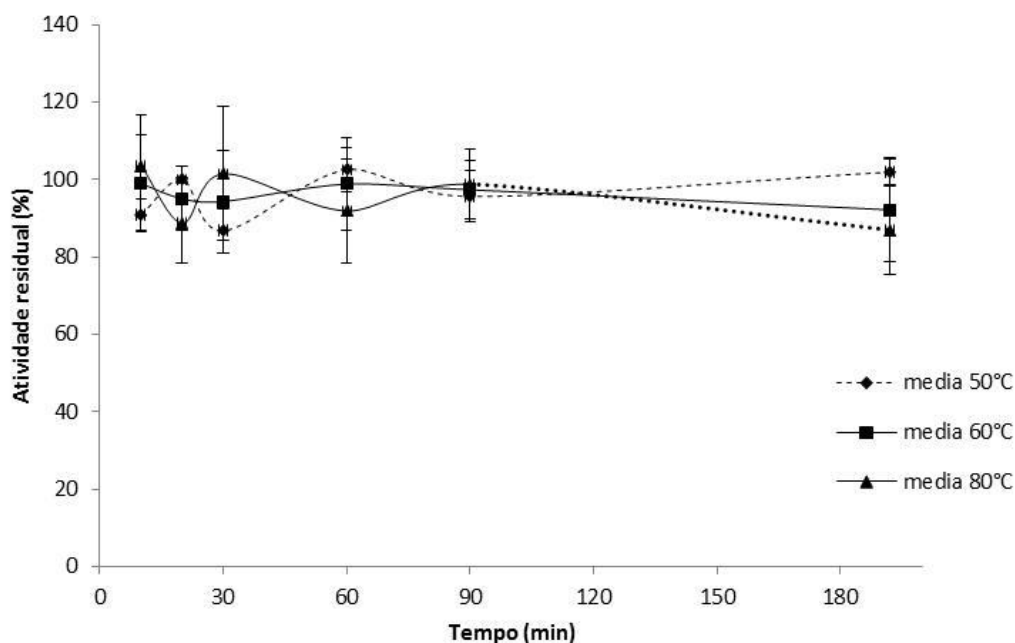


Figura 19 - Estabilidade térmica a 50°C, 60°C e 80°C do complexo celulolítico excretado por *S. capuamus*

A presença de enzimas com atividade celulolítica produzidas por microrganismos estáveis à temperatura de 50 e 60°C foi reportada por diversos autores (BEGUM et al., 2009; DA VINHA et al., 2011 SAHA et al., 2004 YIN et al., 2010 KIM et al, 2008; CAMASSOLA et al, 2004; JAGER et al, 2001). Enzimas que apresentam estabilidade em temperatura acima de 40°C são ditas como termoestáveis, sendo comum encontrar microrganismos mesófilos que cresçam em temperatura de 28 e 32°C e produza enzimas que atuam a temperatura de 60°C, como por exemplo, glucoamilase de *Neosartorya fischerie* *Aspergillus fumigatus* (GOMES et al, 2007). Estudos com *A. phoenicis* apresentaram perda total de atividade para endoglucanases

após 15 minutos de incubação a 80°C (SILVA, 2008; WACHINGER et al., 1989). O extrato bruto contendo endoglucanase da actinobactéria *Streptomyces drozdowiczii* demonstrou estabilidade térmica ao longo de uma hora e meia a temperatura de 50°C, no mesmo período, 100% de atividade foi reduzida a 60°C (LIMA et al, 2005; ELSERSY et al., 2010). Estudos com fungo termófilo *Thermoascus aurantiacus* produtor de endoglucanase e celobiase mostraram que ambas as enzimas permaneceram estáveis a temperatura de 80°C por 42 e 18 minutos respectivamente (KALOGERIS et al, 2008). Enzimas termoestáveis têm um potencial considerável para muitas aplicações industriais (HAKI et al, 2003; DUTTA et al, 2008).

A estabilidade do complexo em diferentes pH's foi determinada conforme descrito no item 3.13.6. Os valores de pH variaram de 3 até 9 sempre utilizando o tampão mais adequado para aquele ponto. Ao fim dos testes percebeu-se uma grande estabilidade em todos os pH's testados, pois a atividade residual não foi inferior a 80% tendo como ponto de maior atividade o pH 5,5 conforme pode ser visualizado na Figura 22.

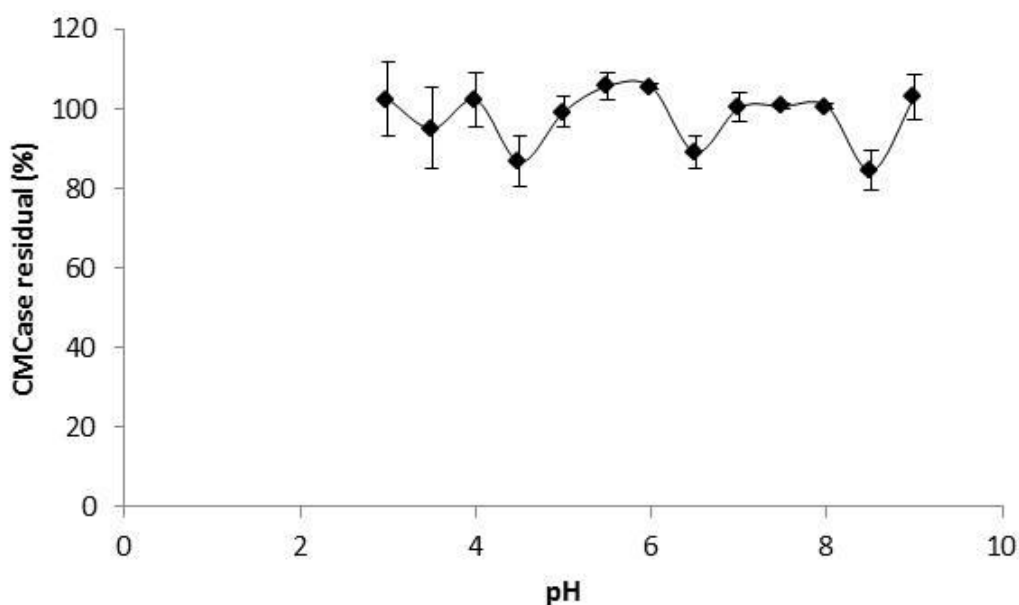


Figura 20 - Estabilidade do complexo em diferentes pH's

Relatos de bactérias principalmente do gênero *Bacillus sp.* estáveis em diferentes pH's são comuns na literatura, no entanto enzimas celulolíticas estáveis em pH's inferiores a 4 são pouco comuns (BAKARE et al, 2005; KIM et al, 2005; LEE et al, 2008; TAHIR et al, 2009; GAUR e TIWARI, 2015). Ao estudar a estabilidade em

diferentes pH's de enzimas ou complexos enzimáticos produzidos por fungos Coral e colaboradores (2002) encontraram resultados bem semelhantes aos descritos por este estudo, pois o *Aspergillus niger* produtor da enzimas/complexo enzimático por eles estudado mostrou-se estável em pH's 3,0 - 9,0 no entanto a atividade máxima aconteceu em um pH um pouco mais ácido do que o descrito aqui. O estado de ionização de resíduos de aminoácidos de uma enzima depende do valor de pH. Assim, a atividade da enzima é, por conseguinte, dependente do pH. As enzimas são normalmente ativas durante um intervalo de pH estreito, com um óptimo de pH específico em que a sua atividade catalítica é máxima (WILSON, 2000; BARAKAT et al., 2012; NARRA et al., 2012; SUJIT et al., 2013; NARRA et al., 2014).

O efeito dos íons testados (FeCl_3 , CaCl_2 , ZnSO_4 , MgSO_4) nas duas concentrações (5 mM e 10 mM) não afetou significativamente a atividade do complexo enzimático testado. Pois a atividade manteve-se sempre superior a 95%. Além disso, os íons de FeCl_3 e CaCl_2 quando em solução 5mM aumentaram a atividade em 10% e 5% respectivamente. Já na concentração de 10mM apenas os íons de CaCl_2 conseguiram aumentar a atividade do complexo em pouco mais de 4% conforme pode ser visualizado na figura 23.

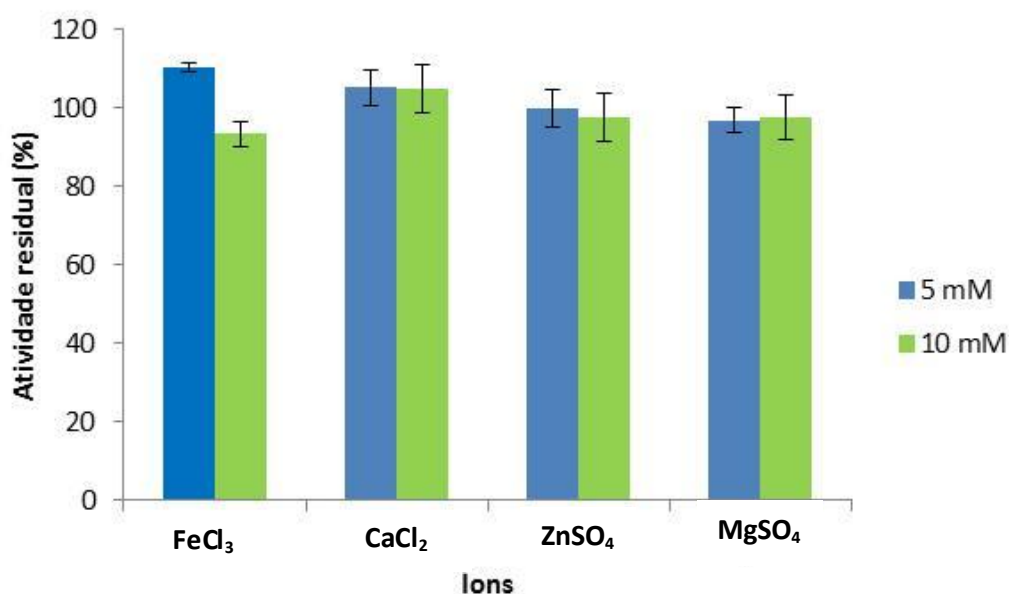


Figura 21 - Efeito dos íons testados nas concentrações de 5 mM e 10 mM.

Narra e colaboradores (2014) ao trabalharem com endoglucanases produzidas por *Aspergillus terreus* obtiveram um aumento na atividade de 38 e 35%, respectivamente ao adicionar íons de CaCl_2 e ZnSO_4 . No entanto não observou qualquer efeito na atividade da enzima ao analisa-la frente a MgSO_4 . É comum se encontrar relatos na literatura de íons que tem efeito inibitório na atividade enzimática; tal efeito pode ser atribuído a ionização do sítio ativo (Bush et al, 1989; Heyda et al., 2009; Kumari et al., 2010). Gaur e Tiwari (2015) ao trabalharem com bactérias da espécie *Bacillus vallismortis* observaram que ao testar o efeito dos íons de Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ em uma concentração de 10 mM a atividade da enzima produzida por este microrganismo foi aumentada, outros autores como Yoone e colaboradores (1994) e Bakaree e colaboradores (2005) também relataram a mesma atividade estimulando fortemente a atividade celulolítica. Da mesma forma Wang e colaboradores (2009) também informaram que *Paenibacillus sp.* mostrou atividade máxima da enzima na presença de íons de Ca^{2+} .

O perfil proteico eletroforético do complexo enzimático obtido de acordo com o descrito no item 3.12.2 apresentou três bandas com massas moleculares distintas. Pode ser visualizado no gel que a concentração maior de proteínas se encontra com aproximadamente 80kDa e podemos notar outras duas bandas com uma menor concentração de proteínas com 26kDa e 16kDa respectivamente. Já no zimograma pode-se sugerir que as proteínas com atividade enzimática para degradação de CMC são as com massa molecular de 80kDa (circunferência vermelha na figura) como sugere a figura 24.

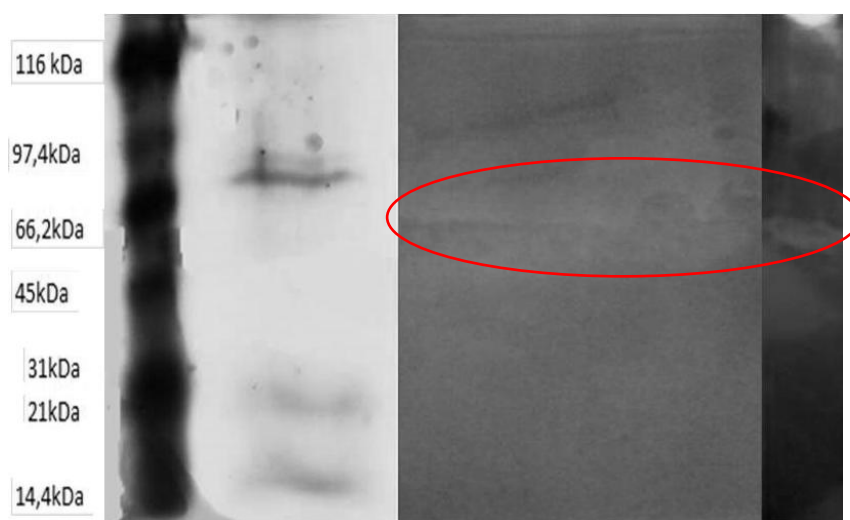


Figura 22 – Perfil eletroforético e zimograma do complexo enzimático

Diversos trabalhos na literatura relatam que as enzimas com atividade celulolítica produzidas por actinobactérias do gênero *Streptomyces sp.* com massa molecular que variavam entre 23kDa e 48kDa (PERITO et al., 1994; WITTMANN, 1994; LI et al, 1998; GARDA et al, 1997; GEORGE et al, 2001; AZZEDDINE et al, 2013). As celulasas produzidas por outras bactérias, como as espécies pertencentes ao gênero *Bacillus sp.*, possuem massa molecular de 40 kDa (MAWADZA et al., 2000). Outras bactérias como a *Alicyclobacillus vulcanalis* secretaram proteínas com massa molecular similar a descrita neste trabalho com igual atividade degradadora quando analisado o zimograma com massas moleculares de 97 kDa, 66 kDa, 62,5 kDa, 53 kDa e 50 kDa (KARLSSON, 2000; BOYCE e WALSH, 2015). *Fibrobacter succinogenes* produz endoglicanases e celobiohidrolases com massa molecular de 65 kDa e 58 kDa, respectivamente (BRUMM et al., 2011).

Determinar os parâmetros cinéticos é um ponto importante para caracterização do complexo enzimático, pois vai elucidar o comportamento do complexo frente a concentração de substrato. Ao utilizar CMC como substrato, a constante de Michaelis-Menten (K_M), e a velocidade máxima V_{max} foram determinados por Lineweaver-Burk lote duplo recíproco. O complexo aqui analisado exibiu uma velocidade máxima (V_{max}) aparente de 19,96 mmol/mim/mL e um K_m aparente de $-0,275$ mg/mL. O baixo K_m e V_{max} mais elevado sugere uma alta afinidade com o substrato CMC (figura 25).

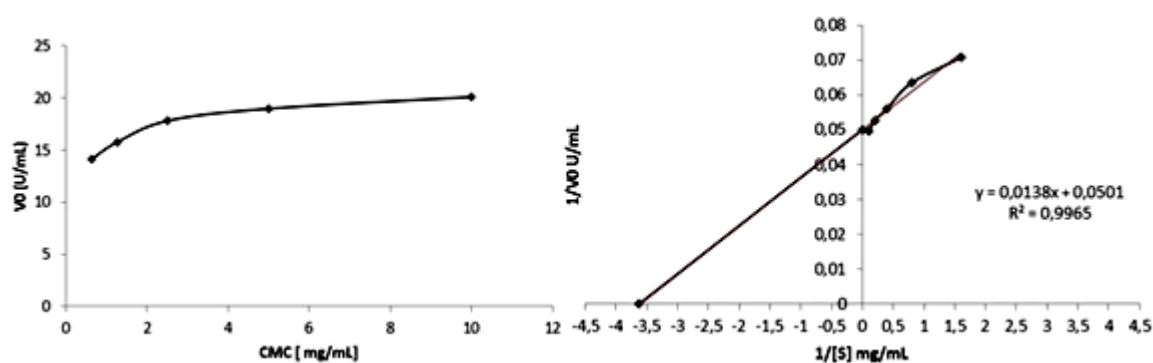


Figura 23 – Curva de Michaelis-Menten e duplo recíproco (Lineweaver-Burk) utilizando CMC como substrato

Outros trabalhos descreveram comportamentos bem diferentes mesmo ao trabalhar com bactérias. Mawadza e colaboradores (2000) também descreveram valor de K_m (1,5 e 1,7 mg mL⁻¹) e V_{max} (1,5 e 0,9 mmol min⁻¹ mg⁻¹) trabalhando com *Bacillus sp.* (BOYCE e WALSH, 2015). CMC utilizando como substrato. Se o valor de K_m é baixo, isto significa que a enzima tinha uma afinidade mais forte com o substrato

no entanto o descrito por esse trabalho é ainda menor. Já trabalhos com fungos descreveram um comportamento ainda mais diferente e com afinidades ainda menores com o substrato (MUHAMMAD et al, 2009; MARIMUTHU et al, 2010;. THI et al, 2010; NARRA et al, 2014).

O produto de hidrólise do complexo aqui testado foi avaliado segundo as condições descritas no item 3.14, com isso pode-se observar que com dez minutos de reação de hidrolise obteve-se um pico em 7,1 minutos, tempo de retenção semelhante ao do padrão de celobiose. Ao injetarmos no CLAE a reação realizada em trinta minutos obtivemos dois picos em tempos de retenção semelhantes ao do padrão de celobiose e glicose, esse mesmo perfil cromatográfico foi observado ao analisarmos a reação de uma hora. Um outro pico foi observado nos perfis cromatográficos das amostras analisadas, este pico foi identificado como ácido acético, no entanto tal pico não pode ser considerado como produto da reação de hidrolise enzimática uma vez que já se esperava que o mesmo aparecesse pois o substrato da reação estava dissolvido em um tampão contendo esta substância.

Ao estudar uma espécie ainda não identifica de *Streptomyces sp.* Soratele e colaboradores (2012) descreveram um comportamento semelhante ao descrito neste trabalho, além disso tais pesquisadores também sugeriram que enzimas estavam envolvidas neste processo, insinuando que a formação de glucose e celobiose sugere a ação seqüencial de endoglucanase, e exoglucanase glucoamilase, enquanto formação de xilose e L-arabinose sugere o envolvimento de xilanase na degradação destes materiais celulósicos. Comportamento parecido com o acima citado já tinham sido citados em 2008 Silva e Gouveia que também estudaram complexos enzimáticos excretados por *Streptomyces sp.* Boyce e Walsh (2015) sugerem que complexos enzimáticos com este tipo de atividade podem ser aplicados na indústria de produção de etanol de segunda geração, pois estudaram bactérias utilizadas nesta indústria com comportamentos bem similares ao acima descrito.

A metodologia do planejamento fatorial, associada à análise de superfícies de respostas, é uma ferramenta fundamentada na teoria estatística, que fornece informações seguras sobre o processo, minimizando o empirismo que envolve técnicas de tentativa e erro (BOX et al., 1978). Ou seja, o estudo do planejamento fatorial, é um teste, em pequena escala, dos procedimentos, materiais e métodos propostos para determinada pesquisa (MACKEY; GASS, 2005). Ou seja, é uma versão reduzida do estudo

completo, que envolve a realização de todos os procedimentos previstos na metodologia de modo a possibilitar alteração ou melhora dos instrumentos na fase que antecede a investigação em si.

Por meio do primeiro delineamento experimental foi possível observar que a temperatura foi um fator significativo na otimização da produção do complexo enzimático com efeito de -2,893. De acordo com o diagrama de Pareto (Figura 26) a temperatura ideal é uma variável que afeta significativamente a produção do complexo. Insinuando que a temperatura ótima para produção do complexo é próxima de 40°C. o que corrobora os resultados encontrados quando avaliou-se os fatores isolados, anteriormente citados neste trabalho. Outro sim foi verificado que não houve interação significativa entre as variáveis avaliadas neste primeiro planejamento.

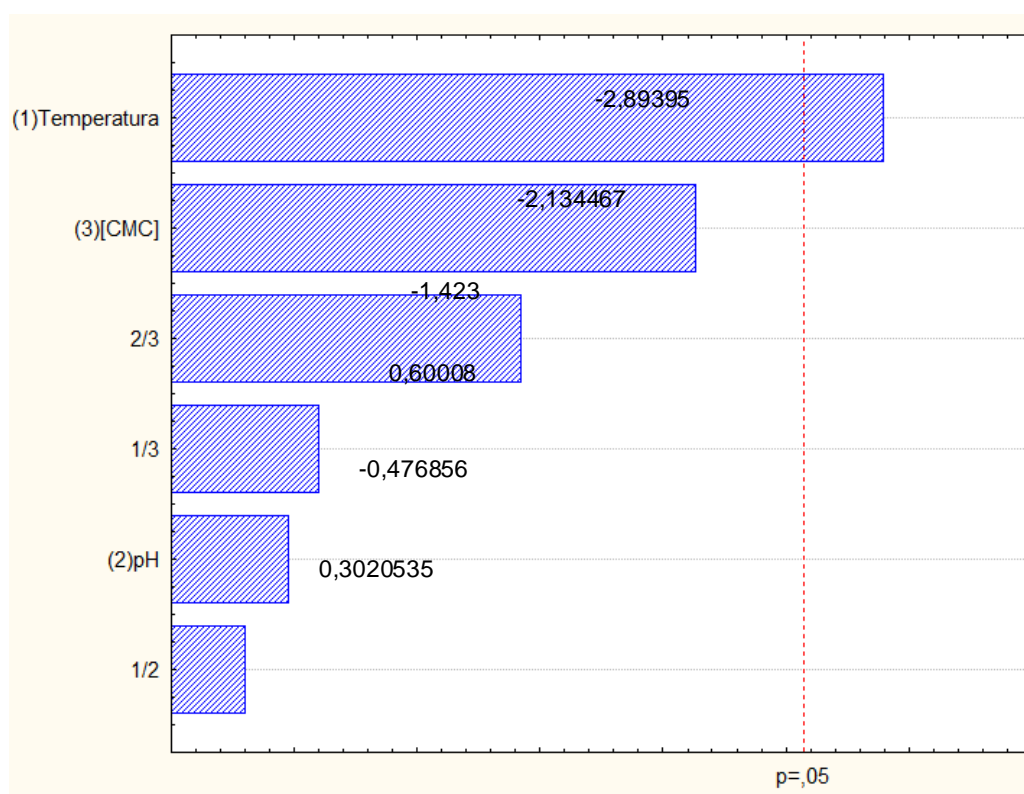


Figura 24 – Diagrama de Pareto do primeiro planejamento com efeitos do planejamento utilizando como variável de resposta CMC_{case} e variáveis dependentes CMC, temperatura e pH

Como observado na figura 27 o gráfico de superfície mostra que quando relacionado as variáveis temperatura e pH (figura 27A), há uma maior atividade quando submetido à uma temperatura menor juntamente com um pH inferior (figura 27B). Já quando relacionamos a temperatura e concentração de CMC podemos observar que a

maior atividade encontrasse quando a temperatura é menor e existe uma maior concentração de CMC, fato também observado quando avaliado as variáveis isoladas.

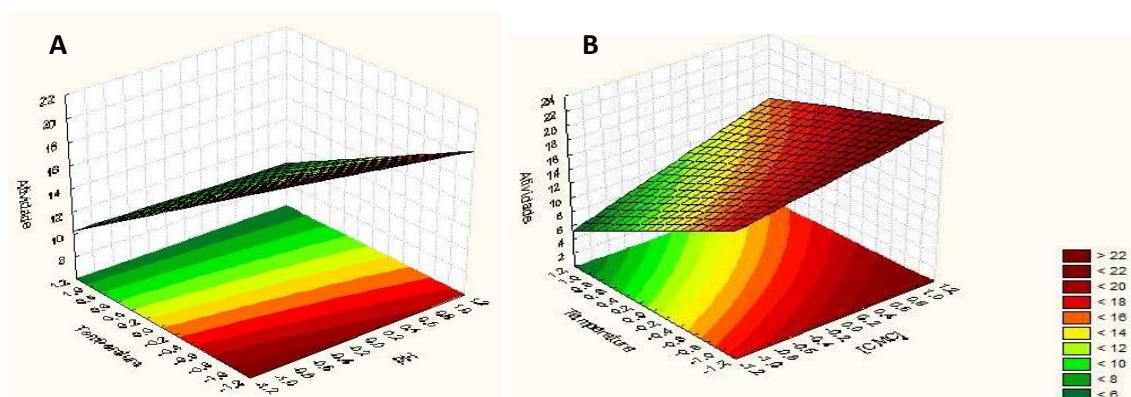


Figura 25 – Superfície de resposta relação entre temperatura X pH (A) e temperatura X [CMC] (B).

Com base no primeiro planejamento e com a finalidade de aperfeiçoar o processo de produção do complexo enzimático, um novo delineamento composto central com pontos rotacionais (DCCR) foi realizado. E verificou-se que apesar de ter-se alterado os níveis das variáveis não houve correlação significativa entre as variáveis. Apesar de não ser observada qualquer interação vale salientar que o diagrama de Pareto (Figura 28) revelou que a temperatura e o pH influencia de maneira positiva para produção do complexo.



Figura 26 - Diagrama de Pareto do segundo planejamento com efeitos do planejamento utilizando como variável de resposta CMC_{Case} e variáveis dependentes CMC, temperatura e pH

O gráfico de superfície de resposta do segundo delineamento (Figura 29) sugere que existem dois pontos onde houve uma maior atividade das enzimas quando relacionado as variáveis temperatura e pH (figura 29A), um deles indica que o ponto ótimo de produção é quando utiliza-se a maior temperatura analisada e o menor pH, o outro ponto seria quando utiliza-se a menor temperatura e maior pH testados. No entanto acredita-se que isso seja devido o intervalo analisado está dentro do intervalo do ótimo. Além disso quando comparado as análises dos fatores isolados todas as variáveis estão no intervalo do “ótimo” descrito acima neste trabalho. Já para correlação entre temperatura e concentração de substrato verifica-se um comportamento um tanto diferente onde o ótimo sugerido é na menor temperatura e menor [CMC] (Figura 29B).

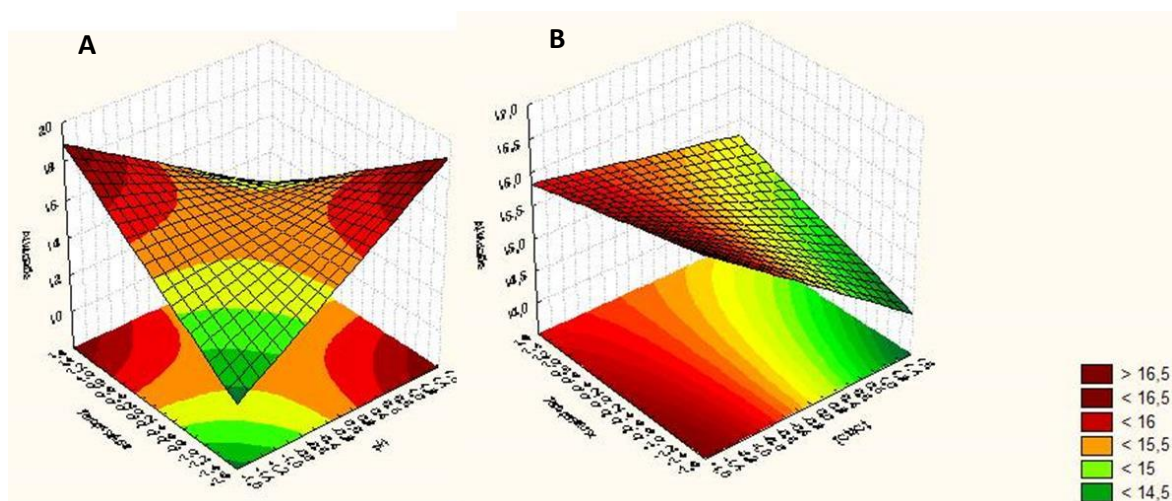


Figura 27 - Superfície de res posta relação entre temperatura X pH e temperatura X CMC

Ao longos dos anos diversos autores vem descrevendo comportamentos de produção de enzimas celulolíticas por micro-organismos semelhantes aos descrito neste trabalho por exemplo (SAXENA et al., 2007; FERREIRA et al, 2011; SANTOS et al,2011; SARATALE et al., 2012). Prasad e Sethi (2013) descreveram como ótimas condições (temperatura de 45° e maior concentração de CMC testados) parecidas com as sugeridas por este trabalho no entanto este se diferencia dos demais pois além do planejamento ele é composto pela análise dos fatores isolados sendo assim se destaca do do trabalho de Prasad e Sethi (2013) por conseguir gerar um complexo ativo em menos tempo e com maior atividade enzimática. Verificou-se também que trabalhos que obtiveram valores maiores de produção enzimática em sua maioria são realizados em fermentação sólida, o que dificulta a purificação e aumenta os gastos para produção

(ALANI et al, 2008; ARUNACHALAM et al, 2010; HSU et al, 2011; SERATALE et al, 2012; BAJAJ et al, 2014)

4.4 Identificação da Actinobactéria

4.4.1 Identificação Morfológica

A actinobactéria 171x foi identificado morfológicamente em nível de gênero, Figura 30, pela técnica de microcultivo. Onde foi classificado como *Streptomyces* sp. Segundo o manual de sistemática bacteriológica de Bergey as actinobactérias são bactérias Gram-positivas, que formam longos filamentos finos ramificados e que podem originar cadeias de esporos em forma de espirais longas, curtas ou verticiladas, como foi observado na micromorfologia dos isolados em estudo (WILLIAMS et al.,1989). Alguns autores sugerem uma predominância do gênero *Streptomyces* (TUMONELA et al. 2000; VIJAYAKUMAR et al., 2007; CEYLAN, OKMEN, UGUR, 2008; VELHO-PEREIRA e KAMAT, 2012).

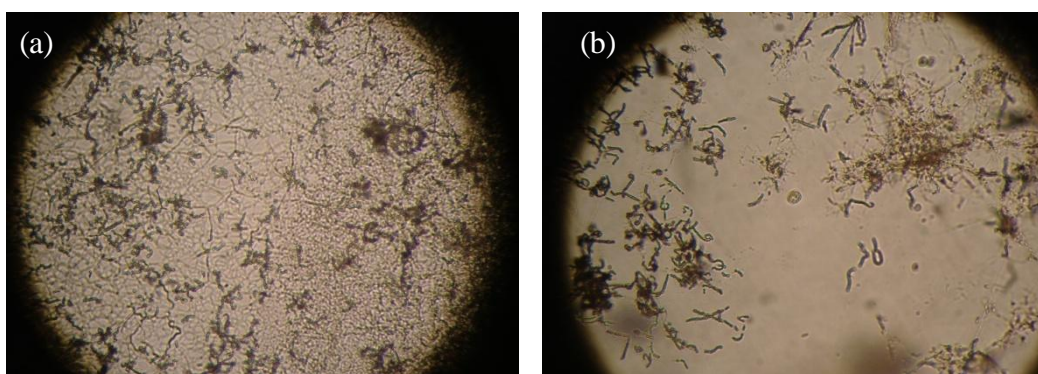


Figura 28- Micromorfologia do gênero investigado por microscopia óptica (a) e (b)

4.4.2 Identificação Molecular

Para a análise molecular, foi selecionado a actinobactéria que obteve melhor desempenho nos testes para a atividade enzimática. Este isolado foi submetido a extração de DNA e posteriormente para amplificação da região 16S do rDNA e sequenciamento. Feita a extração de DNA total e após o sequenciamento das amostras, obteve-se uma sequência de nucleotídeos e ao analisá-la no banco de dados do NCBI obtivemos a confirmação do gênero e identificação da espécie, sendo assim classificado como *Streptomyces capoamus*.

5. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, pode-se inferir que:

- Dentre os isolados da caatinga estudados existem alguns com a capacidade de produzir enzimas ou complexos enzimáticos com atividade celulolítica;
- Em meio aos isolados selecionados a cepa 171X, identificada como *Streptomyces capoamus* produz um complexo ativo com 48 horas e com atividade relativamente alta;
- O aumento na concentração do substrato influencia diretamente na produção do complexo enzimático;
- A temperatura ótima para produção do complexo enzimático estudado é 45°C;
- O pH ótimo para produção do complexo é 4,0.

Quanto a caracterização do complexo enzimático pode-se inferir que:

- A temperatura ótima da atividade enzimática do complexo celulolítico estudado é 60°C;
- Os pH's variando entre 2,5 e 8 não influenciam a atividade enzimática do complexo celulolítico estudado;
- O complexo produzido é estável em temperaturas que variam de 50°C a 80°C, não tendo perda de atividades maiores que 20% ;
- O complexo produzido é estável em pH's que variam de 2,5 a 9, não tendo perda de atividades maiores que 15% ;
- Os íons testados não afetam a atividade enzimática do complexo celulolítico estudado;
- Foi comprovada a atividade do complexo pelo método do zimograma e sua provável massa molecular;
- O complexo celulolítico estudado tem comportamento Michaeliano
- O produto de hidrolise enzimática sugere que o complexo enzimático seja compostos por endoglucanases.
- O delineamento experimental sugere que o complexo deve ser produzido em condições próximas a: temperatura de 40°C, pH 4 e 2,5 g/L de CMC

Estes complexo tem potencial para utilização em tratamentos ambientais e nas industrias de produtos de limpeza por possuir alta estabilidade em condições adversas

6. PESPECTIVAS

- Purificar o complexo por métodos cromatográficos;
- Definir substrato específico;
- Produzir em escala piloto;
- Sequenciar a enzima.

7. REFERÊNCIAS

ABDEL-BANAT, B. M. A.; HOSHIDA, H.; ANO, A.; NONKLANG, S.; AKADA, R. High-temperature fermentation: how can processes for ethanol production at high temperatures become superior to the traditional process using mesophilic yeast? **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, n. 4, p. 861-867, 2010.

AGUIAR, C. L.; MENEZES, T. J. B. Produção de celulases e xilanases por *Aspergillus Níger* IZ- 9 usando fermentação submersa sobre bagaço de cana-de-açúcar. **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 18, n. 1, p. 57-70, 2000.

AKINOLA, G. E. ; OLONILA, O. T.; ADEBAYO-TAYO, B. C. “Production of cellulases by *Trichoderma* species”. **Academia Arena**, vol. 4, no. 12, p. 27–37, 2012.

ALANI, F.A.; WILLIAM, A.; ANDERSON, A.; MURRAY, M-Y. New isolate of *Streptomyces* sp. with novel thermoalkalotolerant cellulases. **Biotechnology Letters**, v.30, p.123-126, 2008.

ALVIRA, P.; TOMÁS-PEJÓ, M.; BALLESTEROS, M.; NEGRO, M.J. . Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4851-4861, 2010.

AMINOV, R.I. The role of antibiotics and antibiotic resistance in nature. **Environ Microbiol**, v.11, p.2970–2988, 2009

ANDERSSON, D.I.; HUGHES, D. Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? **Nature Reviews Microbiology**, v.8, p.260–271, 2010.

ARO, N.; PAKULA, T.; PENTTILA, M. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. **FEMS Microbiology Reviews**, v.29, n.4, p.719-739, 2005.

ARUNACHALAM, R.; WESELY, E.G.; GEORGE, J.; ANNADURAI, G. Novel approaches for identification of *Streptomyces noboritoensis* TBG-V20 with cellulose production. **Current Research Bacteriology**, v.3, n.1, p.15-26, 2010.

AWAFO, V. A.; CHAHAL, D. S.; SIMPSON, B. K. Optimization of ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 60868) and *Pichia stipitilis* Y-7124. A response surface model for simultaneous hydrolysis and fermentation of wheat straw. **Journal of Food Biochemistry**, v. 22, n. 6, p. 489-510, 1998.

Azzeddine, B., Abdelaziz, M., Estelle, C., Mouloud, K., Nawel, B., Nabila, B., Francis, D. E A Said, B. OPTIMIZATION AND PARTIAL CHARACTERIZATION OF ENDOGLUCANASE PRODUCED BY STREPTOMYCES SP. B-PNG23 **Arch. Biol. Sci., Belgrade**, 65 (2), 549-558, 2013

BADOTTI, F.; DÁRIO, M. G.; ALVES, S. L.; CORDIOLI, M. L. A.; MILETTI, L. C.; ARAUJO, P. S.; STAMBUK, B. U. Switching the mode of sucrose utilization by *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbial Cell Factories**, v. 7, n. 4, p. 1-11, 2008.

BAI, F. W.; ANDERSON, W. A.; MOO-YOUNG, M. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. **Biotechnology Advances**, v. 26, n. 1, p. 89-105, Jan./Feb. 2008.

Bakare MK, Adewale IO, Ajai A, Shonukan OO. Purification and characterization of cellulase from the wild-type and two improved mutants of *Pseudomonas fluorescens*. **Afri J Biotechnol**. 2005;4:898–904.

Barakat, A., Monlau, F., Steyer, J.P., Carrerre, H., 2012. Effect of lignin-derived and furan compounds found in lignocellulosic hydrolysates on biomethane production. **Bioresour. Technol**. 104, 90-99.

BARBE, V.; BOUZON, M.; MANGENOT, S.; BADET B.; POULAIN, J.; SEGURENS, B.; VALLENET, D.; MARLIÈRE, P.; WEISSENBAACH, J.. Complete genome sequence of *Streptomyces cattleya* NRRL 8057, a producer of antibiotics and fluorometabolites. **Journal of Bacteriology**, v. 193, p.5055–5056, 2011.

BÉGUIN, P. Molecular biology of cellulose degradation. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 44, p. 219-248, 1990.

Begum F, Absar N, Alam MS (2009). Purification and characterization of extracellular cellulase from *A. oryzae* ITCC-4857.01. **J. Appl. Sci. Res.** 5:1645-1651.

BHAT, M. K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology Advances**, New York, v. 18, n. 5, p. 355-383, 2000.

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

BOM, E. P. S.; GÍRIO F.; PEREIRA JUNIOR. N. Enzimas na produção de etanol. In: BON, E.P.S., FERRARA, M. A., CORVO, M. L. Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado. Rio de Janeiro: Interciência, 2008. p. 241-271.

Boyce, A. e Walsh, G. Characterisation of a novel thermostable endoglucanase from *Alicyclobacillus vulcanalis* of potential application in bioethanol production. **Appl Microbiol Biotechnol** (2015) DOI 10.1007/s00253-015-6474-8

BRÖTZ-OESTERHELT, H.; BRUNNER, N.A. How many modes of action should an antibiotic have? **Current Opinion in Pharmacology**, v.8, p.564–573, 2008.

Brumm, P., Mead, D., Boyum, J., Drinkwater, C., Gowda, K., Stevenson, D., Weime, P. Functional Annotation of *Fibrobacter succinogenes* S85 Carbohydrate Active Enzymes. **Appl Biochem Biotechnol** (2011) 163:649 – 657

CAMASSOLA, M.; DILLON, A. J. P. Biological pretreatment of sugar cane bagasse for the production of cellulases and xylanases by *Penicillium achinulatum*. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 29, p. 642-647, 2009.

CEYLAN, O.; OKMEN, G.; UGUR, A. Isolation of soil *Streptomyces* as source antibiotics active against antibiotic-resistant bacteria. **EurAsian Journal of BioSciences**. V. 2, p. 73-82, 2008.

CHANDRA, M.; KALRA, A.; SANGWAN, N. S.; Sangwan, R.S. “Biochemical and proteomic characterization of a novel extracellular β -glucosidase from *Trichoderma citrinoviride*,” **Molecular Biotechnology**, v. 53, p. 289–299, 2013

CHOPRA, I.; HESSE, L.; O’NEILL, A. J. Exploiting current understanding of antibiotic action for discovery of new drugs. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford v.3, p.14S–15S, 2002.

Coral, G.K.; B. Arikan; M.N. Naldi and H.G. Venmez (2002). Some properties of crude carboxymethyl cellulase of *Aspergillus niger* Z10 wild-type strain. **Turk. J. Biol.**, 26:209-213.

CRAWFORD, D. L.; MCCOY, E. Cellulases of *Thermomonospora fusca* and *Streptomyces thermodiastaticus*. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.24, n.1, p. 150 - 152, 1972.

DA LIMA, O. G.; MONACHC, F.D.; I.L.; D'ALBUQUERQUE, I.L.; BETTÒLO, G.B. The identification of ciclacidine an antibiotic from *streptomyces capoamus* sp. **Tetrahedron Letters**, V. 9, N.4, p. 471-473, 1968.

DA VINHA, F. N. M. ; GRAVINA-OLIVEIRA, M. P. ; FRANCO, M.N.; MACRAE, A.; DA SILVA BON, E.P.; NASCIMENTO, R.P.; COELHO, R. R. Cellulase production by *Streptomyces viridobrunneus* SCPE-09 using lignocellulosic biomass as inducer substrate. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, vol. 164, no. 3, p. 256–267, 2011.

DANIEL, R. A.; ERRINGTON, J. Control of cell morphogenesis in bacteria: two distinct ways to make a rod-shaped cell. **Cell**, v.113, n.6, p.767–776, 2003.

DASHTBAN, M.; QIN, W..Overexpression of an exotic thermotolerant β -glucosidase in *Trichoderma reesei* and its significant increase in cellulolytic activity and saccharification of barley straw,” **Microbial Cell Factories**, v. 11, n. 63, p. 1–15, 2012.

DE LIMA, A. L. G.; NASCIMENTO, R. P.; BOM, E. P. S.; COELHO, R. R. R. *Streptomyces drozdowiczii* cellulase production using agroindustrial by-products and its potential use in the detergent and textile industries. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, n.2, p.272-277, 2005.

DUTTA, T; SAHOO, R; SENGUPTA, R; RAY, S. S; BHATTACHARJE, A and GHOSH, S. Novel cellulases from an extremophilic filamentous fungi *Penicillium citrinum*: production and characterization. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 35, p. 275-282, 2008.

El-Sersy NA, Abd-Elnaby H, Abou-Elela GM, Ibrahim HAH, Toukhy NM (2010). Optimization, economization and characterization of cellulase produced by marine *Streptomyces ruber*. *Afr. J. Biotechnol.* 9:6355-6364.

ESPOSITO, E.; SILVA, M. Systematics and environmental application of the genus *Trichoderma*. **Critical Reviews in Microbiology**, Boca Raton, v. 24, n. 2, p. 89-98, 1998.

ETTERS, J.N.; ANNIS, P.A. Textile Enzyme Use: A Developing Technology. **American Dyestuff Reporter**, v.5, p.18–23, 1998.

FLÄRDH, K. Essential role of DivIVA in polar growth and morphogenesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2). **Molecular Microbiology**, v.49, p.1523–1536, 2003. The first demonstration of the key role of DivIVA in cell polarity in *Streptomyces*.

FLÄRDH, K. Growth polarity and cell division in *Streptomyces*. **Current Opinion in Microbiology**, v.6, p.564–571, 2003.

Foreman, P.K.; Brown, D.; Dankmeyer, L.; Dean, R.; Diener, S.; Dunncoleman, N.S.; Goedegebuur, F.; Houfek, T.D.; England, D.J.; Kelley, A.S.; Meerman, H.J.; Mitchell, T.; Mitchinson, C.; Olivares, H.A.; Teunissen, P. J. M.; Yao, J.; Ward, M. Transcriptional regulation of biomass-degrading enzymes in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. **The Journal of Biological Chemistry, Bethesda**, v. 278, n. 34, p. 31988-31997, 2003.

GALBE, M.; ZACCHI, G. A review of the production of ethanol from softwood. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 56, p. 618-628, 2002.

GARDA, A. L. et al. Two genes encoding an endoglucanase and a cellulase-binding protein are clustered and coregulated by a TTA codon in *Streptomyces halstedii* JM8. **Biochemical Journal**, Hoboken, United States, v. 324, p. 403 - 11, 1997.

Gaur, R. and Tiwari, S. Isolation, production, purification and characterization of an organic-solvent-thermostable alkalophilic cellulase from *Bacillus vallismortis* RG-07. **BMC Biotechnology** (2015) 15:19

GEORGE, S. P.; AHMAD A., RAO, M. B. Studies on carboxymethylcellulase produced by an alkalothermophilic actinomycete. **Bioresource Technology**, Amsterdam, Netherlands, v. 77, p. 171 - 5, 2001.

Gomes, Joseph; Terler, Katherine; Kratzer, Regina; Kainz, Elke; Steiner, Walter, 2007: Production of thermostable beta-mannosidase by a strain of *Thermoascus aurantiacus*: Isolation, partial purification and characterization of the enzyme. **Enzyme and Microbial Technology** 40(4): 969-975

GOMEZ, L. D.; STEELE-KING, C. G; MCQUEEN-MASON, S. J. Sustainable liquid biofuels from biomass: the writing's on the walls. **New Phytologist**, Cambridge, v. 178, n. 3, p. 473-485, 2008.

GRIGOREVSKI-LIMA, A. L.; NASCIMENTO, R. P.; BON, E. P. S.; COELHO, R. R. R. *Streptomyces drozdowiczii* cellulase production using agro-industrial by-products and its potential use in the detergent and textile industries. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, n. 2, p. 272–277, 2005.

H. NAKAZAWA, T. KAWAI, N. IDA *et al.*, Construction of a recombinant *Trichoderma reesei* strain expressing *Aspergillus aculeatus* β -glucosidase 1 for efficient biomass conversion. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 109, n. 1, p. 92–99, 2012

HAKI, G D and RAKSHIT, S K. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. **Bioresource Technol**, v. 89, p. 17 -34, 2003.

HARTMEIER, W. Immobilized biocatalysts. Berlin-Heidelberg: Springer- Verlag, 1988.

HOPWOOD, D. A. *Streptomyces in Nature and Medicine* (Oxford Univ. Press, New York, 2007). An excellent account of the history of *Streptomyces* research by the founder of *S. coelicolor* genetics.

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

IMMANUEL, G.; AKILA BHAGWAT, C.M.; IYAPPA, R. P.; ESAKKIRAJ, P.; PALAVESAM, A. Production and Partial purification of Cellulase by *Aspergillus niger* and *A. fumigatus* fermented in coir waste and sawdust. **Internet Journal of Microbiology**, v.3, n.1, 2007.

ISHAQUE, M.; KLUEPFEL, D. Cellulase complex of a mesophilic *Streptomyces* strain. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, Canada, v. 26, p. 183-189, 1980.

JADHAV, A. R.; GIRDE, A. V.; MORE. S.M.; MORE S.B; SAIQUA KHAN. Cellulase Production by utilizing Agricultural Wastes Research. **Journal of Agriculture and Forestry Sciences**, v. 1, n.7, p. 6-9, 2013.

JAGER, S; BRUMBAUER, A; FEHER, E RECZER, K;KISS, L. Production and characterization of β -glucosidases from different *Aspergillus strains*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.17, p. 455-461, 2001.

JANG, H.; CHEN, K. Production and characterization of thermostable cellulases from *Streptomyces* transformant T3e1. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.19, p.263-268, 2003.

KALOGERIS, E P; CHRISTAKOPOULOS, P; KATAPODIS, A; ALEXIOU, S; VLACHOU, D. K and MACRIS, B.J. Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus* under solid state cultivation of agricultural wastes. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 16, p. 7623-7629, 2008.

KANG, S.W.; PARK, Y.S.; LEE, J.S.; HONG, S.I.; KIM, S.W. Production of cellulases and hemicellulases by *Aspergillus niger* KK2 from lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, Essex, v. 91, p.153-156, 2004.

KATO S, HARUTA S, CUI ZJ, ISHII M, IGARASHI Y. Network relationships of bacteria in a stable mixed culture. **Microbial Ecology**. 2008;56(3):403-11.

KENNEDY, J. F.; CABRAL, J. M. S. Enzyme immobilization. In: *Enzyme Technology*. Rehm. H.j. e reed g., editors. v. 7A, p. 347-406 Weinheim: VCH. 1987.

KHAN, M.D. M. H.; ALI, S.; FAKHRU'L-RAZI, A.; ALAM, M.D. Z. Use of fungi for the bioconversion of rice straw into cellulase enzymes. **Journal of Environmental Science and Health Part B**, v. 42, p. 381-386, 2007.

KHAN, S.T. Streptomyces associated with a marine sponge Haliclona sp.; biosynthetic genes for secondary metabolites and products. *Environ Microbiol Black Sci Pub.* 2011;13:391–403.

Kim JY, Hur SH, Hong JH. Purification and characterization of an alkaline cellulase from a newly isolated alkalophilic Bacillus sp. HSH-810. **Biotechnol Lett.** 2005;27:313–6.

KIMURA, S.; LAOSINCHAI, W.; ITOH, T.; CUI, X. J.; LINDER, C. R.; BROWN, R. M. Jr. Immunogold labeling of rosette terminal cellulose-synthesizing complexes in the vascular plant Vigna angularis. **The Plant Cell**, v. 11, p. 2075-2085, 1999.

KNAUF, M.; MONIRUZZAMAN, M. Lignocellulosic biomass processing: a perspective. **International Sugar Journal**, v. 106, p. 147-150, 2004.

KOHANSKI, M.A.; DWYER, D.J.; COLLINS, J.J. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. **Nat Rev Microbiol.** 2010;8:423–35.

KUBICEK, C.P. The cellulase proteins of Trichoderma reesei : structure, multiplicity, mode of action and regulation of formation. **Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology**, Berlin, v. 45, p. 1-27, 1992.

LARTIGUE, D. J. Immobilized enzymes for industrial reactors. Basic enzymology. In: MESSING, R. A. New York: Academic Press Inc.. p. 11-38. 1975.

LATIFIAN, M.; ESFAHANI, Z.H.; BARZEGAR, M. Evaluation of culture conditions for cellulase production by two Trichoderma reesei mutants under solid-state fermentation conditions. **Bioresource Technology**, Essex, v. 98, p. 3634-3637, 2007.

Lee YJ, Kim BK, Lee BH, Jo KI, Lee NK, Chung CH, et al. Purification and characterization of cellulase produced by Bacillus amyoliquefaciens DL-3 utilizing rice hull. **Bioresour Technol.** 2008;99:378–86.

LEE, H. L.; CHANG, C. K.; JENG, W. Y.; WANG, A.H.; LIANG, P.H. Mutations in the substrate entrance region of β -glucosidase from *Trichoderma reesei* improve enzyme activity and thermostability,” **Protein Engineering, Design and Selection**, v. 25, n.11, pp. 733–740, 2012.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. Princípios de Bioquímica. 3a Ed. São Paulo: Sarvier, 2002. 975p.

LI, X., LIN, W.; GAO, P.; CHEN, F. Endoglucanase S, a novel endocellulase exhibiting exoglucanase activity from a newly isolated *Streptomyces* sp LX. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, United Kingdom, v. 85, p. 347 - 58, 1998.

LI, X.; GAO, P. CMC-liquefying enzyme a low molecular mass initial cellulosedecomposing cellulases responsible for fragmentation from *Streptomyces* sp. LX. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, United Kingdom, v. 83, p. 59 -66, 1997.

LI, X.; GAO, P. Isolation and partial characterization of cellulose-degrading strain of *Streptomyces* sp. LX from soil. **Letters in Applied Microbiology**, v.22, p.209-213, 1996.

Lima AO, Quecine MC, Fungaro MH, Andreote FD, Maccheroni W, Jr, Araújo WL, Silva-Filho MC, Pizzirani-Kleiner AA, Azevedo JL (2005). Molecular characterization of a beta-1,4-endoglucanase from an endophytic *Bacillus pumilus* strain. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 68:57-65.

LIMING, X.; XUELIANG, S. High-yield cellulose production by *Trichoderma reesei* ZU-02 on corn cob residue. **Bioresourse Technology**, Essex, v. 91, p. 259-262, 2004.

Lusterio DD, Suizo FG, Labunos NM, Valledor MN, Ueda S, Kawai S, et al. Alkali-resistant, alkaline endo-1,4- β -glucanase produced by *Bacillus* sp. PKM-5430. **Biosci Biotechnol Biochem.** 1992;56:1671–2.

MAEDA, R. N.; BARCELOS, C. A. ; ANNA, L. M. M. S. ; PEREIRA, N. . Cellulase production by *penicillium funiculosum* and its application in the hydrolysis of sugar cane bagasse for second generation ethanol production by fed batch operation. **Journal of Biotechnology**, v. 163, p. 38-44, 2012.

MANDELS, M.; WEBER, J. Production of cellulases .**Advances in Chemistry Series**, Washington, v. 95, p. 391-414, 1969.

Marimuthu, J., Ah-Reum, J., Kyoung-Mi, L., Won- II, S., Deok-Kun, O., Yeong-Suk, K., In-Won, K., Jung-Kul, L., 2010. Characterization of endo-b-1,4-glucanase from a novel strain of *Penicillium pinophilum* KMJ601. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 85, 1005e1014.

MARTINEZ, J.L.; FAJARDO, A.; GARMENDIA, L.; HERNANDEZ, A.; LINARES, J.F.; MARTINEZ-SOLANO, L.; SÁNCHEZ, M;B. A global view of antibiotic resistance. **FEMS Microbiology Reviews**, v.33, p.44–65, 2009.

Mawadza C, Hatti-Kaul R, Zvauya R, Mattiasson B. Purification and characterization of cellulases produced by two *Bacillus* strains. **J Biotechnol.** 2000;83:177–87.

MEDIGAN; MARTINKO; PARKER. *Biology of microorganisms*, Illinois: 10th edition.

MEKALA, N.K.; SINGHANIA, R.R.; SUKURAMAN, R.K.; PNADEY, A. Cellulase production under solid-state fermentation by *Trichoderma reesei* RutC-30: statistical optimization of process parameters. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 151, p. 122-131, 2008.

MENDES, B. A. B. **Obtenção, caracterização e aplicação de farinha das cascas de abacaxi e de manga Carvalho.** 2013, 77f Dissertação de Mestrado (mestre em engenharia de alimentos) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual Do Sudoeste Da Bahia - Uesb, Itapetinga, 2013.

Mendes, M. M. G. da S., Pereira, S. A., e Oliveira, R. L., da Silva, L. A. de O., Duvoisin Jr. S., & Albuquerque, P. M. (2015). Screening of Amazon fungi for the production of hydrolytic enzymes. **African Journal of Microbiology Research**, 9(10), 741-748.

MIRANDA, M.; KAM, T.L.; WENSHENG, Q. The prospects of cellulase- producing bacteria for the bioconversion of lignocellulosic biomass. **International Journal of Biological Sciences**, v.5, p.500-516, 2009.

MORAIS, S. A. L.; NASCIMENTO, E. A.; MELO, D. C. Análise da madeira de Pinus oocarpa parte I: estudo dos constituintes macromoleculares e extrativos voláteis. *Revista Árvore* [online], v.29, n.3, p. 461-470, 2005.

MUTHUVELAYUDHAM, R.; VIRUTHAGIRI, T. Fermentative production and kinetics of cellulase protein on *Trichoderma reesei* using sugarcane bagasse and rice straw. ***African Journal of Biotechnology***, Nairobi, v. 5, n. 20, p. 1873-1881, 2006.

NAGAR, S.; GUPTA, V.K.; KUMAR, D.; KUMAR, L.; KUHAD, R.C. Production and optimization of cellulase-free, alkali-stable xylanase by *Bacillus pumilus* SV-85S in submerged fermentation. ***Journal of Industrial Microbiology Biotechnology***, v.37, p.71-83, 2010.

Narra, M., Dixit, G., Divecha, J., Datta, M., Shah, A.R., 2012. Production of cellulases by solid state fermentation with *Aspergillus terreus* and enzymatic hydrolysis of mild-alkali treated rice straw. ***Bioresour. Technol.*** 121, 355-361.

Narra, M., Dixit, G., Divecha, J., Kumar, K., Madamwar, D., Shah, A.R. Production, purification and characterization of a novel GH 12 family endoglucanase from *Aspergillus terreus* and its application in enzymatic degradation of delignified rice straw ***International Biodeterioration & Biodegradation*** 88 (2014) 150-161

NASCIMENTO, R. P.; JUNIOR, N. A.; PEREIRA, N.; BON, E. P. S.; COELHO, R. R. R. "Brewer's spent grain and corn steep liquor as substrates for cellulolytic enzymes production by *Streptomyces malaysiensis*". ***Letters in Applied Microbiology***, v. 48, n.5, p. 529–535, 2009.

NIKAIDO H. Multidrug Resistance in bacteria. ***Annual Review Biochemistry***, v.78, p.119–46, 2009.

OKEKE, B.C.; PATERSON, A. Simultaneous production and induction of cellulolytic and xylanolytic enzymes in a *Streptomyces* sp. ***World Journal of Microbiology and Biotechnology***, v.8, p.483-487, 1992.

OMURA S, IKEDA H, ISHIKAWA J, *et al.* Genome sequence of an industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*: deducing the ability of producing secondary metabolites. *Proc Natl Acad Sci.* 2001;98:12215–20.

PAES, F. A. S.; LIMA, A. M. N.; HAKAMADA, R. E.; BARROS, N. F. Impacto do manejo dos resíduos da colheita, do preparo do solo e da adubação na produtividade de eucalipto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 37, p.1081-1090, 2013

PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V.T. Biotechnological potential of agroindustrial residues. I: sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, Essex, v. 74, p. 69-80, 2000.

PATZER, S.I.; VOLKMAR, B. Gene cluster involved in the biosynthesis of griseobactin, a catechol-peptide siderophore of *Streptomyces* sp. ATCC 700974. **Journal of Bacteriology**, v.192, p.426–435, 2010.

PERITO, B. et al. Characterization and sequence analysis of a *Streptomyces rochei* A2 endoglucanase-encoding gene. **Gene**, Amsterdam, Netherlands, v. 148, p. 119 - 24, 1994.

PERSSON, I.; TJERNELD, F.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fungal cellulolytic enzyme production: A review. **Process Biochemistry**, London, v. 26, n. 2, p. 65-74, 1991.

PRASAD, M.P.; SETHI R. Optimization of cellulase production from a novel bacterial isolate *Mesorhizobium* sp. From marine source, *Journal of Enzyme Research*, v.4, n.1, 2013, p.39-45.

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

SADDLER, J.N.; CHAN, M.K.H. Conversion of pretreated lignocellulosic substrates to ethanol by *Clostridium thermocellum* in mono- and co-culture with *Clostridium thermosaccharolyticum* and *Clostridium thermohydrosulfuricum*. **Canadian Journal of Microbiology**, v.30, p.212-220, 1985.

Sadhu S, Saha P, Sen SK, Mayilraj S, Maiti TK. Production, purification and characterization of a novel thermotolerant endoglucanase (CMCase) from *Bacillus* strain isolated from cow dung. **Springer Plus**, 2013, 2:10. <http://www.springerplus.com/content/2/1/10> (25)

SADHU, S.; SAHA, P.; MAYILRAJ, S.; MAITI, T. K. Lactose-enhanced cellulase production by *Microbacterium* sp. isolated from fecal matter of Zebra (*Equus zebra*). **Current Microbiology**, v.62, p.1050-1055, 2011.

SADHU, S.; SAHA, P.; MAYILRAJ, S.; MAITI, T.K. Characterization of a *Bosea* sp. strain SF5 (MTCC 10045) isolated from compost soil capable of producing cellulase. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, v.2, n.2, p.576-591, 2012

SAHA, S.; ROY, R. N; SEN, S. K.; RAY, A. K. Characterization of cellulase-producing bacteria from the digestive tract of tilapia, *Oreochromis mossambica* (Peters) and grass carp, *Ctenopharyngodon idella* (Valenciennes). **Aquaculture Research**, v.37, p.380-388, 2006.

SANTOS, F. A.. Utilização das Cinzas de Cana-de-açúcar como Material Pozolânico na Produção de Concreto.. -- Araçatuba, SP : Fatec , 2013.

SARATALE, G.D.; CHEN, S.D.; LO, Y.C.; SARATALE, R.G.; CHANG, J.S. Outlook of biohydrogen production from lignocellulosic feedstock using dark fermentation e a review. **Journal of Scientific & Industrial Research**, v.67, p.962-979, 2008

SARATALE, G.D.; SARATALE, R.G.; LO, Y-C.; CHANG, J.S. Multicomponent cellulase production by *Cellulomonas biazotea* NCIM-2550 and their applications for cellulosic biohydrogen production. **Biotechnology Progress**, v.26, p.406-416, 2010.

SCHMIDELL, W.; BORZANI, W.; AQUARONE, E.; LIMA U. A. Biotecnologia Industrial, Processos Fermentativos e Enzimáticos. v. 3, editora Edgard Blücher Ltda, São Paulo, 2001, p. 516.

SILVA, L. A. O. ; Carmona, E.C. . Production and characterization of extracellular xylanase by *trichoderma inhamatum*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 150, p. 117/1599-0291-125, 2008.

SILVA, O. G. Produção de etanol com a utilização do bagaço de cana-de-açúcar. Araçatuba, SP: Fatec, 2010, 45f.

Silva, Joanna Cysneiros e Gouveia, Ester Ribeiro. Some Properties Of Endoglucanases Produced By *Streptomyces* Spp. In Medium Based On Sugar Cane Bagasse. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 02, n. 02: p. 60-70, 2008

SINGHANIA, R.R.; SUKUMARAN, R.K.; PANDEY, A. Improved cellulose production by *Trichoderma reesei* RutC-30 under SSF through process optimization. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 142, p. 60-70, 2007.

SOARES, P. **Conversão da Celulose pela tecnologia Organosolv**. v. 3, NAIPE/USP, São Paulo, SP, 2011

SPANO, L.; MEDEIROS, J.; MANDELS, M. **Enzymatic hydrolysis of cellulosic waste to glucose**, editor United States Army Natick Laboratories, Food Sciences Laboratory, Pollution Abatement Division, 1975, 62 p.

STÖHR, C.; GLOGAU, U.; MÄTSCHKE, M.; TISCHNER, R. Evidence for the involvement of plasma-membrane-bound nitrate reductase in signal transduction during blue light stimulation of nitrate uptake in *Chlorella saccharophila*. **Planta**, v.197, p.613-618, 1995.

Sujit, S.J., Saurabh, S.D., Tae-SU, K., In-Won, K., Jung-Kul, L., 2013. Characterization of a novel endo-b-1,4-glucanase from *Armillaria gemina* and its application in biomass hydrolysis. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-013-4894-x>

Tahir SR, Bakhsh A, Rao AQ, Naz M, Saleem M. Isolation, purification and characterization of extracellular β -glucosidase from *Bacillus* sp. **Adva Environ Biol Report**. 2009;3:269.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Fisiologia vegetal*. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004, p. 343-353.

Thi, H.P., Dinh, T.Q., Ngoc, M.N., 2010. Optimization of endoglucanase production by *Aspergillus niger* VTCC-F021. **Aust. J. Basic Appl. Sci.** 4, 4151e4157.

TUOMELA ET AL. Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. **Bioresource Technology**. 72 (2): 169-183, 2000.

VELHO-PEREIRA, S.; KAMAT, N. M. Screening of actinobacteria for antimicrobial activities by a modified "Cross-Streak" method. **Nature Precedings**, p. 1-16, 2012.

VENKATESWARAN, S.; DEMAIN, A.L. The *Clostridium thermocellum*, *Clostridium thermosaccharolyticum* ethanol production process: nutritional studies and scaledown. **Chemical Engineering Communications**, v.45, p.53-60, 1986.

VIJAYAKUMAR, R.; MUTHUKUMAR, C.; THAJUDDIN, N.; PANNEERSELVAM, A.; SARAVANAMUTHU, R. Studies on the diversity of actinomycetes in the Palk Strait region of Bay of Bengal, India. **Actinomycetologica**, v. 21, p. 59–65, 2007.

VILA-GISBERT, S.; URBANO, A.; CARRENO, M.C. Model studies towards the challenging angularlyoxygenated core of several angucyclinones from an oxidative dearomatization strategy. **Chemical Communications**, v. 49, p. 3561-3563, 2013.

Wang X, Yu X, Xu Y. Homologous expression, purification and characterization of a novel high-alkaline and thermal stable lipase from *Burkholderia cepacia* ATCC 25416. **Enzy Microb Technol**. 2009;45:94–102.

WATVE, M.G.; TICKOO, R.; JOG, M.M.; BHOLE, B.D. How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? **Archives of Microbiology**. v.176, p.386–390, 2001.

WHITAKER, J. R. Principles of enzymology for the food sciences. 2 ed. New York: marcel Dekker Inc. 1994, 648 p.

WILLIAMS, S. T.; SHARPE, M. E.; HOLT, J. G. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. New York: Williams e Wilkins, v. 4, 1989, 2648 p.

Wilson, K. (2000). **Biomolecular interactions: In: Practical biochemistry, principles and techniques**. (eds Wilson, K. and Walker, J.). Fifth edition. Cambridge University Press. pp. 373.

WITMANN, S. et al. Purification e characterization of the CelB endoglucanase from *Streptomyces lividans* 66 and DNA sequences of the encoding gene. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, p. 701 - 3, 1994.

Yoon S, Kim MK, Hong JS, Kim MS. Production of polygalacturonase from *Ganoderma lucidum*. **Korean J Mycol**. 1994;22:286–97.

ZANIN, G. M.; MORAES, F.F. **Enzimas como Agentes Biotecnológicos**. Legis Summa: Ribeirão Preto, cap.4, p.35-85. 2004.

ANEXOS

ligninase production excreted by actinomycetes Amazonian from urban solid waste

Leonor Alves de Oliveira¹, Paula dos Reis Corrêa², Rafael Lopes e Oliveira³, José Fernando Thomé Jucá⁴.

¹Ph.D. Professor, Department of Antibiotics, UFPE / UFAM

²Biologist, M.Sc., Ph.D. Student in Civil Engineering, UFPE, Recife-PE

³Biologist, M.Sc., Ph.D. Student in Biotechnology UFAM, Manaus-AM

⁴Ph.D. Professor, Civil Engineering Department, UFPE, Recife-PE

Departamento de Antibióticos, UFPE - Av. Jorn. Aníbal Fernandes, Cidade Universitária, Recife, 50740-560. Telefone: (81) 2126-7450
laodls@yahoo.com.br – (81) 8924-6167 – Endereço Av. Jorn. Aníbal Fernandes, Cidade Universitária, Recife, 50740-560- Brasil.

ABSTRACT

In this study was accomplished micromorphology and molecular identification of 10 actinomycetes were performed, there was a prevalence on the genus Streptomyces sp, subsequently this strain was inoculated in liquid medium, containing carbon and nitrogen as sources, ligno-cellulosic compounds characterized municipal solid waste to obtain enzyme complexes, through the fermentation process. Enzymes: lipase, ligninase, cellulase and hemicellulase were quantified, especially for the production of laccase and manganese peroxidase, the micro-organism 6T, identified as Streptomyces sp genus, produced 49.7 U/L and 9.7 U/L of manganese peroxidase and laccase, respectively, enzymes involved in the degradation of lignin, the compound characterized as recalcitrant, difficult treatments degradation of MSW, enabling the use of these micro-organisms to obtain hydrolytic enzymes of industrial interest and the optimization of waste digestion systems.

Keywords: municipal solid waste MSW, enzymatic detection, actinomycetes, fermenting liquid

1. INTRODUCTION

Urban population growth, along with the changing habits of the population, has resulted in a sharp increase in the consumption of goods and products, with a consequent generation of solid waste (Singh *et al*, 2011).

Solid wastes are defined according to Brazilian Association of Technical Standards - NBR 10.004 (2004) as any material found in solid and semi-solid state resulting from industrial, household, hospital, commercial, agricultural and sweeping services, which also comprises the sludge originating from water treatment systems, equipment and

facilities for pollution control, and certain liquids considered inadequate for disposal in the public sewerage system or water bodies.

According to the Brazilian Association of Public Cleaning and Waste (Abrelpe, 2012), the composition of municipal solid waste is very heterogeneous and influenced by socio-economic, climatic and also educational aspects.

The search for new technologies for the use of these wastes in fermentation processes for micro-organisms that produce hydrolytic enzymes (cellulases, hemicellulases, lipases, laccases and manganese peroxidases) with several industrial applications is very important, because it can add economic value to waste and present it in an environmentally friendly manner, following what has been proposed by the National Solid Waste Guidelines (Law No. 12.305/10 regulated by the Decree No. 7.404/10, Brazil).

The enzyme production is a promising field for the synthesis of compounds of highly added value (Roveda *et al.* 2010). The potential application of ligninolytic enzymes has been subject of extensive academic and industrial interest due to its ability to biodegrade a number of toxic and recalcitrant pollutants (Duran and Esposito, 2000).

Cellulolytic enzymes are necessary to convert cellulose into glucose units. (Lynd *et al.*, 2002). Hemicellulases are of great importance to disrupt the blending of cellulose and hemicellulose present in the plant cell wall. Therefore, hemicellulases also have a role to increase the efficiency of enzymatic hydrolysis of cellulase in biomass (Farinas, 2011).

Lipases belong to the group of hydrolases which catalyze the conversion of triglycerides into free fatty acids and glycerol. (Messias *et al.*, 2011).

Ligninases are enzymes that degrade lignin by an oxidative process, the ligninolytic complex is formed by manganese peroxidase (MnP), lignin peroxidase (LiP) and laccase enzymes, all of which produced in different combinations with each other. (Nerud and Mirsucova, 1996; Pelaez *et al.*, 1995).

According to Mussato *et al.* (2007), it is advantageous to use enzymes in industry because they are natural, non-toxic and specific to certain actions. Moreover, they are

able to change the characteristics of various types of waste, helping to reduce environmental pollution, replacing severe chemical processes.

The main sources of production of enzymes are the micro-organisms (Coelho and Amaral, 2013). These sources are considered attractive and low cost producers of these metabolites, which grow in large quantities and in a relatively short time. Another advantage of producing enzymes is not being subject to seasonal and geographical issues, besides the possibility of using inexpensive raw materials (Zimme *et al.*, 2009). The use of enzymes is considered one of the largest sectors of the biotechnology industry (Braga *et al.*, 1999).

Microorganisms, especially Actinobacteria, are Gram-positive, filamentous. There are eight known genus: *Arthrobacter* sp., *Corynebacterium* sp., *Nocardia* sp, *Rhodococcus* sp., *Streptomyces* sp., *Mycobacterium* sp., *Actinomyces* sp., *Bifidobacterium* sp. And *Butyrivibrio* sp .They have morphological and cell cycle aspects differentiated from other Gram-positive organisms. They are also classified in aerobic, anaerobic or microaerophilic (Lacaz *et al.*, 2002). The secondary metabolism of these micro-organisms has been studied in the past 50 years and may be applied for several purposes for the health, agriculture and / or environment (Qin *et al.*, 2011).

The *Streptomyces* genus is the most studied one among the actinomycetes, known worldwide for the ability of excreting lytic enzymes and the decomposition of organic matter, especially polymers such as lignocellulose, starch and chitin (Araujo, 1988; Goodfellow, 1988; Getha *et al.*, 2005; Moreira and Siqueira 2002; Araújo *et al.*, 2014). The production of secondary metabolites by actinomycetes has been linked to cellular differentiation in their morphology, such as the production of spores, which may be limited or inhibited by nutritional deficiencies.

In this study 8 actinomycetes were identified using micromorphology and molecular analysis, later used on liquid fermentation process, using as a source of nitrogen and carbon the lignocellulosic compounds found in municipal solid waste, with the aim of selecting strains with greater potential for the production of enzymes involved in the degradation of lignin and cellulose, as a way to add economic value to this waste and propose the use of these micro-organisms in optimizing digestion of municipal solid waste.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Municipal solid waste

The MSW was collected in the landfill CTR of Candeias, located in the metropolitan area of Recife -PE (Brazil), on 27/07/2012.

The sample was characterized gravimetrically in the laboratory of the Research Group on Solid Waste of UFPE. The fractionation was developed according to predefined characteristics (Firmo et al, 2013): a) Organic Waste, b) Waste Garden, c) Paper and Cardboard, d) Wood, e) Plastic, f) Textile, g) Sanitary Materials, h) Metals, i) Glass, k) Rubber and j) other.

After classification, the lignocellulosic fractions were weighed and incubated at 105°C until a constant weight was found. After two weeks, the samples presented constant weight, and were crushed in an industrial processor (Cutter - Siemens CR-4L), with the aim to increase the contact surface of the sample.

In order to determine the biochemical composition, the method used by Melo (Melo, 2010) was followed, in which 3 grams of samples were used contemplating three stages with the aim of extracting compounds such as lipids, tannins and simple sugars, respectively. The first stage concerns the extraction with Cyclohexane solvent, the second one with ethyl alcohol and, finally, the third one with water. In order to obtain the results for the cellulose, hemicellulose and lignin, a methodology that follows the rules of the Brazilian Association of Pulp and Paper and NBR 7989:2010 (pulp and wood - Determination of acid insoluble lignin) was used, in which the sample was submitted to acid extraction by a reflux system for the characterization of cellulose and hemicellulose, and then to calcination at the temperature of 75°C for characterizing the lignin.

2.2. Micro-organisms

Eight strains of Actinomycetes were reactivated. They were called: 1N, 1X, 2X, 4H, 6C, 7N, 12Q and 20G isolated from the rhizosphere of *Paullinia cupana* (Guaraná) in the region of Maués - AM (Matias, 2010) with latitude of 03 ° 23'01 "south and longitude of 57 ° 43'07" west, with an altitude of 25 meters above sea level, preserved maintained

4°C in the collection of the Laboratory of Microbiology, of the Department of Antibiotics in the Federal University of Pernambuco. The samples were grown in liquid medium ISP-2 under the stirring of 180 rpm at 37°C for 48 hours. Subsequently, it was time for these samples to be taken into solid medium: ISP2 (Yeast Malt Agar), ISP3 (Oat Meal Agar), ISP4 (Salt-starch Agar), ISP7 (Tyrosine Agar), and incubated at 37 °C for 7-10 days.

The identification of the studied strains in this work was performed by the micromorphologic analysis according to the method described by Shirling and Gottlieb (1996). After growth, microscopic and macroscopic analyses were carried out in order to test color of the substrate mycelium, aerial mycelium color and pigment production or absence. According to these features, 10 strains were identified to the genus level.

2.2.2 Molecular identification

DNA extraction was performed through the culture grown in a liquid medium ISP-2 for 48 h at 37 °C. Subsequently, the sample was centrifuged and DNA extraction was performed using the Wizard Genomic DNA Purification kit (Promega), according to manufacturer's instructions. The DNA sequence was assessed by electrophoresis on agarose gel, then, performed amplification of the 16S rRNA gene through the technique of polymerase chain reaction (PCR), using universal oligonucleotides (fD15'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; rD15'-AAGGAGGTGATCCAGCC -3'). The reaction consisted in a mixture of 50 ng of DNA, 10 pmoles of each oligonucleotides, 200 mM of dNTP, 1.5 mM of MgCl₂, 1X buffer, 1 U Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen Life Technologies), for a final volume of 25 µL. The reaction conditions : 5 min of denaturation at 94°C, followed by 25 cycles of 1 min at 94°C, 30 s at 52°C and 2 min at 72°C, a final extension of 10 min at 72°C. The amplification product was analyzed by electrophoresis in 1.2% agarose gel and, subsequently, the sample was sent for sequencing. The sample was sequenced by Macrogen and this sequence was compared to all sequences in Genbank, using the software Blast of the National Center for Biotechnology Information (NCBI) (www.ncbi.nlm.nih.gov). The sequence was aligned with the software Clustal and the phylogenetic tree was constructed using Mega 5.5. Topology was assessed by analyzing bootstrap (1,000 resampling).

2.3. Obtaining enzyme complexes.

In order to obtain the enzyme complexes using MSW as the carbon source, initially the 10 actinomycetes strains were grown in solid media ISP-2 and at 37°C for 7 days to obtain and verify the purity of mycelial cultures. The pre-inoculums were obtained by fermentations for 48 hours of cultivation in 50 ml liquid media ISP-2, 6 inoculated with agar block of 8 mm diameter were incubated at 37°C, under stirring of 180 rpm. In order to obtain the enzyme complex, the liquid medium was used and modified ISP-2 MSW plus 10% (v/v), inoculated with 10% (v/v) of the pre-inoculum and incubated for 96 hours at 37°C, under stirring of 180 rpm (Lyra *et al.*, 1964). After this cultivation period, the liquid medium was centrifuged at 10.000 rpm for 10 minutes and the supernatant corresponded to the enzyme complex secreted by these microorganisms using MSW as the carbon source.

Subsequently, the enzyme complexes were submitted to the quantification of: cellulases: CMCase (3.2.1.4) and β -glucosidase (3.2.1.21), xylanases (3.2.1.8), lipases (3.1.1.3), manganese peroxidases (1.11.1.13) and laccase (1.10.3.2).

2.4. Determination of enzymatic activities

The quantification of endoglucanasic activity (CMCase) was evaluated according to the methodology proposed by Ghose (1987), using as substrate carboxy methyl cellulose (CMC). One unit of enzyme was defined as the amount of enzyme required to liberate $1\mu\text{mol min}^{-1} \text{ml}^{-1}$ reducing sugar in test conditions (glucose used as standard).

For the measurement of β -glucosidases, the methodology proposed by Kovács *et al.* (2009) was used, using p-nitrophenyl β -D-glucoside (pNPG) as substrate. One international unit of β -glucosidase activity releases $1\mu\text{mol PNP}$ per minute under the test conditions.

Xylanase activity was determined through the quantitation of total reducing sugar, using as substrate birchwoodxylan (1% w/v) using the method of dinitrosalicilic acid. One unit of enzyme was defined as the amount of enzyme required to liberate $1\mu\text{mol 1 min}^{-1} \text{ml}^{-1}$ xylose under the test conditions (Silva *et al.*, 2008).

The proteolytic activity was determined at 25° C using 1% of casein (w/v) in buffer 0.2M Tris-HCl, pH 7.4 as substrate. One unit of protease activity was defined as the amount of enzyme required to increase the absorbance of 0.01 at 280 nm under the

conditions of time and temperature of incubation of the test, the results were expressed in U/ml^{-1} (Leighton *et al.*, 1973).

The lipase activity was dosed according to the method proposed by Winker & Stuckmann (1979) using the synthetic substrate p-NPP (p-nitrophenylpalmitate). The lipolytic activity was calculated as U ($\mu\text{mol}/\text{mg}$). One activity unit (U) was defined as the amount of enzyme that released 1 μmol de p-NP mL^{-1} under the conditions of the test.

The laccase activity was performed according to the protocol of Leonowicz and Grzywnowicz (1981). They were accompanied by changes in absorbance at 525 nm ($\epsilon = 44600 \text{ l. M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) for up to 10 minutes. One enzyme unit (U) was defined as the amount of enzyme required to oxidize 1 μmol of substrate per minute.

The activity of manganese peroxidase (MnP) was performed according to Kuwahara *et al.*, (1984), was measured spectrophotometrically at 610 nm ($\epsilon = 4460 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). All analyzes used a boiled culture medium as control. One unit of activity was defined as the amount of enzyme required to oxidize 1 μmol of substrate per minute.

2.5. Determination of total protein

The protein determination was carried out through the method of Bradford using bovine serum albumin as standard (Bradford *et al.*, 1976).

3. RESULTS and DISCUSSION

The biochemical and elementary characterization quantifies the chemical content present in the waste and can split them into cellulose, hemicellulose, lipids, lignin, total organic carbon and total nitrogen. The knowledge of the data is very important because it can estimate the biotechnological potential of these residues through their use as substrates for the enzymatic complexes. These data are also decisive for the choice of micro-organisms to be used in biotechnological processes, since they indicate the sources of nutrients available to microbial metabolism. Figure 1 shows the data obtained from characterization tests conducted with elementary biochemistry and municipal solid waste.

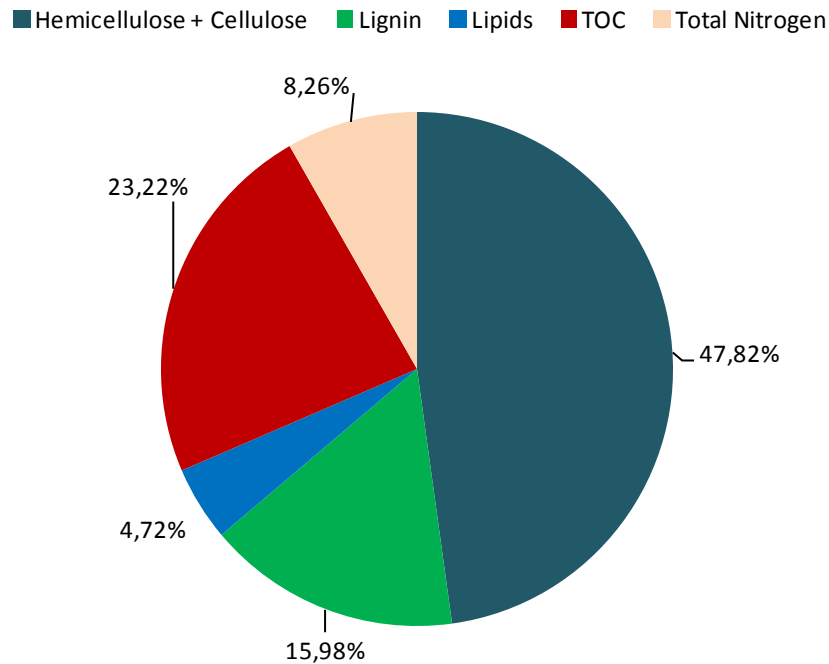


Figure 1 - Elementary and Biochemical Characterization of MSW.

TOC: total organic carbon MSW: municipal solid waste

According to Achour (2008), young waste have around 90% of TOC in its composition. However, In spite of the fact that the MSW used in this study was young, collected directly from the garbage truck, the value of TOC was approximately 22% lower than that reported in the literature, demonstrating the heterogeneity of young waste, and the need to make these nutrients increase in order to allow the survival of micro-organisms in culture medium.

The fractions of cellulose and hemicellulose were higher (47.82%) than those presented by Achour (2008), as he got in his study around 37% cellulose + hemicellulose. However, Melo (2010), obtained around 45% of this fraction for waste which was considered new, similar to data obtained in this study.

The quantification of these chemicals is very important because it allows sizing the type of enzyme that can be achieved by the excretion of micro-organisms that use waste as a source of nutrients. Due to the heterogeneity of the MSW, it was possible to evaluate the biotechnological potential of the waste in terms of cellulases, xylanases, lipases, manganese peroxidases and laccases. It was started from 10 actinomycetes selected due to its high potential to produce secondary metabolites of biotechnological interest.

Therefore, the 10 lines evaluated in this study were identified in terms of genus level, as shown in Table 1, demonstrating predominance in the genus *Streptomyces* sp. Morphological characteristics of actinomycetes such as branching on the substrate mycelium, aerial mycelium formation and their fragmentation or spore production are factors that assist in the identification of actinomycetes. This genus also shows the type and the number of spores as well as their arrangement (Bull, 2004).

Table 1 - Micro-morphological and molecular identification at the genus level of 10 specimens of actinomycetes.

Isolates	Genus
1X	<i>Paenibacillus</i> sp.
1N	<i>Streptomyces</i> sp.
2X	<i>Streptomyces</i> sp.
4H	<i>Streptomyces</i> sp.
6C	<i>Streptomyces</i> sp.
7N	<i>Moraxella</i> sp.
12Q	<i>Streptomyces</i> sp.
6T	<i>Streptomyces</i> sp.
15I	<i>Streptomyces</i> sp.
4M	<i>Streptomyces</i> sp.

The genus *Streptomyces* sp. (Figure 2) was described in 1943 by Wakman&Henrici, their representatives tolerate more diverse and adverse environments, more than 85% of the existing natural antibiotics are produced from genetically modified micro-organisms, and have high potential for various biotechnological applications (Abreu, 2013).

The 10 strains of actinomycetes, were selected to study the ability to excrete the enzymes lignocellulolytic in the fermentation solid waste. The isolates were molecularly identified, DNA extraction was performed using the Wizard Genomic DNA Purification kit (Promega). The strain was deposited in UFPEDA microbial culture collection center in Brazil. It was preserved at Culture Collection UFPEDA, Department of Antibiotics, Federal University of Pernambuco. Among well-established species three different genus were defended, the 10 strains of actinomycetes showed closest sequence (99%) with type strains is identified as *Streptomyces padanus* (1N), *Paenibacillus taichungensis* (1X), *Streptomyces javensis* (2X), *Streptomyces aburaviensis* (4H), *Streptomyces rameus* (6C), *Moraxella osloensis* (7N), *Streptomyces niveoruber* (12Q), *Streptomyces* sp. (4M), *Streptomyces* sp. (6T), *Streptomyces* sp. (15I)

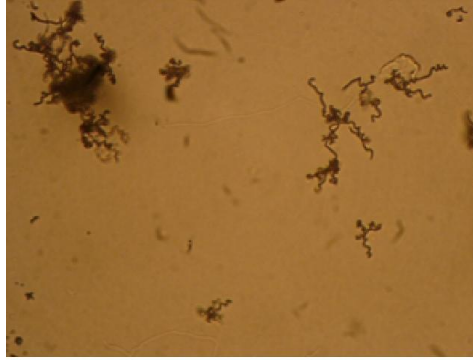


Figure 2 - Micromorphology of *Streptomyces sp* genus investigated by optical microscopy (40x) - Nikon-E200.

Enzyme Activity

This paper first describes the production of cellulases (β -glucosidase and CMCase) and hemicellulases (xylanase) for the evaluated lines, using the MSW as a substrate, with a minimum and maximum production of about 1.5-113 U/L, 2.00-52 U/L and 3.0-67.3 U/L, respectively. Pierozzi *et al.* (2011), using culture medium supplemented with xylan and carboxymethylcellulose, submerged fermentation, evaluated the production of cellulase from yeast strains from Brazilian biodiversity and achieved an average production of CMCase 35 U/L and 40 U/L Xylanase, which is a lower data than the one found in his study.

Duarte (2013) in his study showed xylanase enzyme profile by liquid fermentation using sugarcane bagasse as a substrate and culture medium supplemented with PASPT 1.0% (w/v) as carbon source obtained maximum output of approximately 48.8 U/L, lower than that obtained in the present study.

The micro-organisms that stood out in the production of CMCase were the 1N (*Streptomyces padanus*) with 52 U/L and 339,1 U/mg of protein. However in the production of β -glucosidase stood out to isolated production strain 15N (*Streptomyces sp*) stood out with 113U/mL and 816,6 U/mg of protein. In the production of hemicellulases the highest value obtained was strain 1N (*Streptomyces padanus*) with 67,3 U/L and 438,8 U/mg of protein (Figure 3).

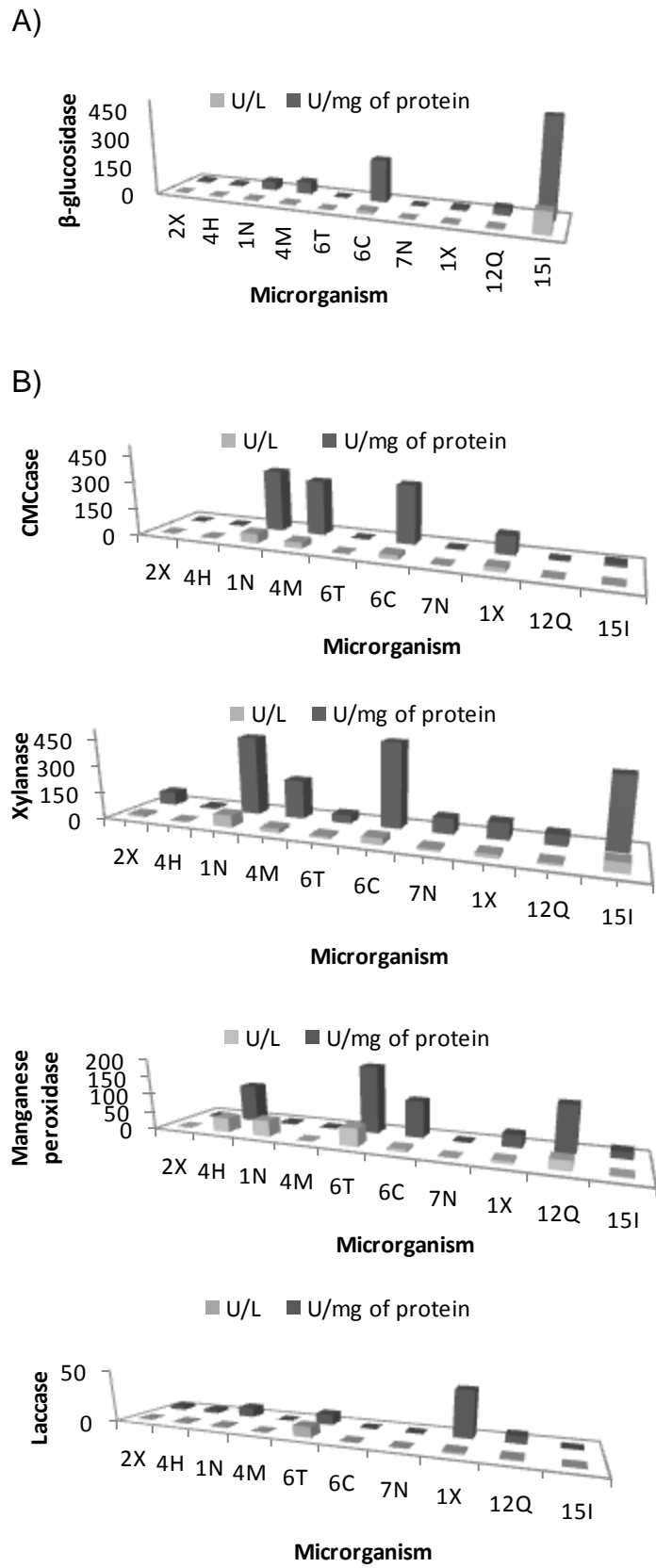


Figure 3 - Enzymatic activity A) β -glucosidase B)CMCase C) Xylanase D) Managanese peroxidase E) Laccase.

These data show the existence of a potential biotechnological application of these actinomycetes in the production of hydrolases, indicating the need for further studies to evaluate the kinetics of enzyme production, and optimum cultivation conditions.

After cellulose, lignin is the second most abundant terrestrial biopolymer, its biosynthesis is a very active research field mainly because of its economic importance, it is important in the degradation of effluents and contaminants, such as phenols, pesticides and lignin present in urban solid waste.

In this study, the production of enzymes was evaluated: laccase, lignin peroxidase and manganese peroxidase complex lignolytic constituents, according to data presented in figure 3, there were no significant results for the enzyme lignin peroxidase. Among the tested strains, those that stood out, showing high values of enzymatic activity (U/L) for both laccase and manganese peroxidase were strain 6T(*Streptomyces sp*) 9.7 U/L and 49.7 U/L), 1N (1.4 U/mL; 44.8 U/mL respectively and specific activity 187,8 U/mg of protein with values for manganese peroxidase, but the higher value of specific activity of laccase was detected 43 U/mg of protein to 1X (*Paenibacillus sp*) strain. However, in relation to the manganese peroxidase activity, it was not significant.

According to Barros (2009), due to the ability to catalyze the oxidation of phenols and other aromatic compounds, and present a low substrate specificity, laccases have been used in various processes, such as removal of lignin in the pulp and paper industries, removal xenobiotics water courses, drug analysis, removal of phenolic compounds from wine clarification of effluents and dyes, among others. Menezes (2009) evaluated the production of lignolytic enzymes from sugarcane bagasse, through a submerged fermentation with *Pleurotus sp*, for a period of 30 days, and obtained activities of 6.23 U/L (day 15) and 4.68 U/L (day 20), respectively, lower than the values presented in this study, with 5 days of fermentation. The high potential of MSW was indicated as substrates for these enzymes, active in lignin degradation. Ramachandran (2013) used *Catalpa ovata* and *Pinus densiflora* as substrate to hydrolysis in liquid fermentation and obtained laccase production of 0.12 U/mL, which is lower than that obtained in the present study.

Lipases are distributed in nature in animals, plants and microorganisms. However, lipases produced by microorganisms are the ones most used industrially because they are more stable. Besides this, they are mostly extracellular, favoring their extraction, isolation and purification. They are considered important due to their utility as catalysts in the procedure of fats and oils in industrial detergents, foods, paper, cosmetics, pharmaceuticals, and organic synthesis.

In the present study using 1% MSW as a carbon source in a liquid medium ISP-2, detected minimum and maximum values for lipolytic activity secreted by these strains corresponding to 0.061 to 0.083 U/ml and 0.207-0.782 U/mg of proteins (Table 2).

Table 2. Lipase enzyme activity against the MSW as substrate

Microorganism	U/mL	U/mg of protein
2X	0.064 ± 0.003	0.395 ± 0.001
4H	0.079 ± 0.003	0.207 ± 0.002
1N	0.068 ± 0.002	0.444 ± 0.003
4M	0.065 ± 0.002	0.591 ± 0.005
6T	0.083 ± 0.003	0.313 ± 0.003
6C	0.061 ± 0.001	0.782 ± 0.002
7N	0.062 ± 0.002	0.430 ± 0.004
1X	0.064 ± 0.001	0.283 ± 0.002
12Q	0.061 ± 0.003	0.296 ± 0.001
15I	0.061 ± 0.001	0.442 ± 0.002

According to Roveda *et al.*, (2010) the composition of the medium may affect the lipase production dramatically. Baron (2005) evaluated the lipase production in two culture media. The first one contained 0.2% KNO₃, 0.1% K₂HPO₄, 0.05% MgSO₄.7H₂O; ZnSO₄.7H₂O 0.043%, 0.11% FeSO₄.7H₂O, 0.015% MnSO₄.4H₂O, 1.25% (NH₄)₂SO₄, 0.5% yeast extract, 2% peptone, meat, and 1% olive oil. The second culture medium contained 0.14% NH₄NO₃; MgSO₄.7H₂O 0.073%, 0.067% KH₂PO₄, 0.01% ZnSO₄.7H₂O; FeSO₄.7H₂O 0.0007%, 0.067% glucose and 2% oil olive. The enzymatic activity obtained with the second culture medium was higher by 7.1 U/mL⁻¹ after 6 days of fermentation at 29°C and 120 rpm. Already with the first culture medium, which was simpler, maximum activity of 3.25 U/mL⁻¹ was obtained after three days of fermentation. The culture media used by authors contained higher amounts of nutrients which the media used for enzyme production in this study, which used the MSW as a substrate without the addition of olive oil or other oil, which justifies the lipase activity obtained as shown in Table 2. Roveda *et al.* (2010) evaluated the lipase production,

using the culture medium collected in the effluent equalizer output, plus olive oil at 1% as a promoter, starting from *Aspergillus* and *Penicillium*, the maximum lipolytic activity in order of 2,250 U/ mL.

Further research can be carried out to optimize the lipase production by selected strains, studying the addition of other nutrients to the MSW. The results obtained in this study indicate the high biotechnological potential of MSW, through the use of actinomycetes in fermentation processes for the production of hydrolytic enzymes of industrial interest and also pointing to the use of these enzymes in induced degradation of MSW. Further studies should be performed to optimize the production of these enzymes by substrate. The greatest potential for enzyme production observed was for activating enzymes of lignin degradation, compound characterized as recalcitrant, difficult degradation treatments of MSW, which enables the use of actinomycetes in digesters, aiming at optimizing the process of biodegradation of municipal solid waste.

4. ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful for the support provided by Amazonas State Research Council (FAPEAM) and CNPq - Ed702008 ME/DO-Edital MCT/CNPq nº 70/2008 and Department of Antibiotics for taking the micro-organisms preserved in their collection.

5. REFERENCES

Abreu P. A., Mecanismos envolvidos na citotoxicidade de uma ditiolpirrolona obtida de *Streptomyces* sp. isolada da Ascídia Eudistona Vannamei. Dissertação de Mestrado: Pós-graduação em Farmacologia, Fortaleza (2013).

Achour F., Caractérisation de La matière organique dans les ordures ménagères. Recherche d'indicateurs de stabilité. Institute National des Sciences Appliquées de Lyon. Lyon. Tese de doutorado p.173 (2008).

Araujo, D. R. C. ; Silva, L. C. N. ; Silva, A. G. ; Araújo, J. M. ; Machado, A. J. ; Correia, M. T. S. ; Silva, Márcia Vanusa Da . . Comparative analysis of anti-*Staphylococcus aureus* action of leaves and fruits of *Anadenanthera colubrina* var. cebil (Griseb.) Altschul.. African Journal of Microbiology Research, v. 8, p. 2690, 2014.

Araujo J. M., Estratégias para isolamento seletivo de actinobacterias. In: Melo IS, Azevedo JL. (Eds.). Ecologia microbiana. Jaguariuna: EMBRAPA-CNPMA, pp.351-367 (1988).

Associação Brasileira de Empresas de Limpeza Pública e Resíduos Especiais – ABRELPE. Panorama dos Resíduos Sólidos no Brasil: 2011. ABRELPE. São Paulo p.151 (2012).

Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT. Resíduos Sólidos – Classificação; NBR 10004. São Paulo, (2004).

Baron A. M., Turra V. and Krieger N., Produção e caracterização de lipases de *Penicilliumcorylophilum* IOC 4211. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÕES, 15, Recife (2005).

Barros A. C., Menezes F. F., Zanotto A. P., JR S. D. and Albuquerque P. M., Seleção de fungos amazônicos produtores de laccase. In: 61ª Reunião Anual da SBPC (2009).

Bull A. T., Microbial Diversity and Bioprospecting. 1ª Edição American Society for Microbiology, ASM Press, Washington (2004).

Braga G. U. L., Destéfano R. H. R. and Messias C. L., Protease production during growth and autolysis of submerged *Metarhiziumanisopliae* cultures. Ver. de Microbiol. vol 30, pp. 107-113 (1999).

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

Coelho M. A. S and Amaral P. F. F. 2013. Produção de enzimas. Disponível em: http://www.eq.ufrj.br/biose/nukleo/aulas/Enzimol%20Aplic/eqb706_aula_07.pdf. Acessado em: 02 de abril de 2013.

Duarte G. C., Holocelulases produzidas por *Aspergillusoryzae*: purificação, caracterização e degradação de biomassa lignocelulósica. Tese de Doutorado: Pós Graduação em Biologia Molecular, Brasília, (2013).

Durán N. and Esposito E., Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidases-like compounds in wastewater and soil treatment: A review. *Applied Catalysis B: Environmental*, vol 28, pp. 83-99 (2000).

Farinas C.S., A parede celular vegetal e as enzimas envolvidas na sua degradação. *Empraba Instrumentação*, 13p. (2011).

FIRMO, A. L. B. Estudo numérico e experimental da geração de biogás a partir da degradação de resíduos sólidos urbanos. Tese de doutorado. Programa de Pós-graduação em Engenharia Civil. Universidade Federal de Pernambuco, 268p (2013).

Getha K., Vikineswary S., Wong W. H., Seki T., Ward A. and Goodfellow M., Evaluation of *Streptomyces sp.* Strasin g10 for suppression of *Fusarium* wilt and rhizosphere colonization in pot-grown banana plantlets. *J of Indian Microbiol and Biotechnol* vol 32, pp. 24-32 (2005).

Goodfellow M., William S. T. and Mordarski M., *Actinomycetes in biotechnology*. London, 501p (1988).

- Ghose T. K., Measurement of cellulase activities. *Pure & Applied Chemistry*, vol 59, pp. 257-268 (1987).
- Igoni A. H., Ayotamuno M. J., Eze C. L., Ogaji S. O. T. and Probert S. D., Designs of anaerobic digesters for producing biogas from municipal solid-waste. *Applied Energy*, vol 85, pp. 430-438 (2008).
- Kovács K., Szakacs G. and Zacchi G., Comparative enzymatic hydrolysis of pretreated spruce by supernatants, whole fermentation broths and washed mycelia of *Trichoderma reesei* and *Trichoderma atroviride*. *Bioresour.Technol.* Vol 100, pp. 1350-1357 (2009).
- Kuwahara M., Glenn J. K., Morgan M. A. and Gold M. H., Separation and characterization of two extracellular H₂O dependent oxidases from lipolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Microbiology Letters*, vol 169, pp. 247-250 (1984).
- Lacaz C. S, Porto E., Martins J. E. C., Heins-Vaccari E. M. and Melo, N. T., *Tratado de Micologia Médica*. 9. ed. São Paulo: Sarvier Editora de Livros Médicos (2002).
- Leighton T. J, Doi R. H, Warren R. A. J. and Kelln R. A., The relationship of serine protease activity to RNA polymerase modification and sporulation in *Bacillus subtilis*. *J. Mol. Biol.*, vol 76, pp. 103-122 (1973).
- Leonowicz A. and Grzywnowicz K., Quantitative estimation of laccase forms in some white rot fungi using syringaldazine as a substrate. *Enzyme and Microbial Technol*, vol 3, pp. 55-58, (1981).
- Lynd L. R, Weimer P. J, Van Zy W. H and Pretorius I. S., Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* vol 66, pp. 506-577 (2002).
- Matias S. J., Isolamento de actinobactérias do solo da região Maués/AM e avaliação do potencial antimicrobiano. *Recife*. (2010).
- Lyra, F. D. A, Gonçalves de Lima, O, Coelho, J. S. B, Albuquerque, M. F, Maciel, G. M, Oliveira, L. L, Maciel, M. C. N., Ciclamicina e ciclacidina, Dois novos Antibióticos Produzidos pelo *Streptomyces capoamus* nov. sp. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 36, n. 3, p. 323-334, 1964.
- Menezes C. R, Silva I. S. and Durant L. R., Bagaço de cana: fonte para a produção de enzimas lignocelulolíticas. *Estudos tecnológicos*, vol. 5, pp. 68-78, 2009.
- Melo E. S. R. L., Análise de biodegradabilidade dos materiais que compõem os resíduos sólidos urbanos através de ensaios BMP (BiochemicalMethanePotential). *Recife*. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil). Universidade Federal de Pernambuco (2010).
- Messias J. M, Costa B. Z, Lima V. M. G, Giese E. C, Dekker R. F. H and Barbosa A. M., Lipases microbianas: propriedades e aplicações biotecnológicas. *Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas*, vol 32, pp. 213-234 (2011).

Moreira F. M de S and Siqueira J. O. 2002. Microbiologia e bioquímica do solo. Lavras: UFLA. 626p. (2002).

Mussato S. I, Fernandes M and Milagres A. M. F., Enzimas: Poderosa Ferramenta na Indústria. CiênciaHoje, vol 41, pp. 28-33, (2007).

Nerud F and Mirsucova Z., Distribution of ligninolytic enzymes in white rot fungi. Folia Microbiol, vol 4, pp. 264–66 (1996).

Pelaez F, Martinez M. J and Martinez A. T., Screening of 68 species of basidiomycetes for enzymes involved in lignin degradation. Mycol Reswarch, vol 99, pp. 37–42 (1995).

Pierozzi M, Giesel E. C, Cadete R. M, Rosa C. A and Silva S. S., Seleção de leveduras produtoras de celulasas e xilanas isoladas de reservas naturais brasileiras, Anais: XV Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e XI Encontro Latino Americano de Pós-Graduação – Universidade do Vale do Paraíba (2011).

Qin S., Xing K., Jiang J. H., Xu L. H. and Li W. J., Biodiversity bioactive natural products and biotechnological potential of plant associated endophytic actinobacteria. Applied Microbiol and Biotechnol, vol 89, pp. 457-473 (2011).

Ramachadran P. *et al.*, Optimization of β -Glucosidase Production by a Strain of *Stereum hirsutum* and Its Application in Enzymatic Saccharification. J. Microbiol. Biotechnol., vol 23, pp. 351–356, (2013).

Richard T. L., Municipal solid waste composting: physical and biological processing. Biomass and Bioenergy, vol 3, pp. 163-180 (1992).

Rodrigues K., Identificação, produção de antimicrobianos e complexos enzimáticos de isolados de actinomicetos. Dissertação de Mestrado. Pós Graduação em Microbiologia e Ambiente: Porto Alegre (2006).

Roveda M., Hemkemeier M. and Colla L. M., Avaliação da produção de lipases por diferentes cepas de microrganismos isolados em efluentes de laticínios por fermentação submersa. Ciência e Tecnologia de Alimentos, vol. 1, pp. 126-131 (2010).

SILVA, L. A. O. ; Carmona, E.C. . Production and characterization of extracellular xylanase by *Trichoderma inhamatum*. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 150, p. 117/1599-0291-125, 2008.

Singh R.P. *et al.*, An overview for exploring the Possibilities of Energy Generation from Municipal Solid Waste (MSW) in Indian Scenario. Renewable and Sustainable Energy Reviews, vol. 9, pp. 4797-4808 (2011).

Zimme K. *et al.*, Enzimas microbianas de uso terapêutico e diagnóstico clínico. Revista Liberato, vol. 10, pp. 123-137 (2009).