



**ALENIR NAVES DE SALES**

**PRODUÇÃO DE CELULASES E XILANASES  
POR ACTINOBACTÉRIAS ISOLADAS DO  
CERRADO MINEIRO**

**LAVRAS - MG**

**2014**

**ALENIR NAVES DE SALES**

**PRODUÇÃO DE CELULASES E XILANASES POR  
ACTINOBACTÉRIAS ISOLADAS DO CERRADO MINEIRO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de Doutor.

Orientador

Dr. Disney Ribeiro Dias

Coorientadora

Dra. Rosane Freitas Schwan

**LAVRAS - MG**

**2013**

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e  
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Sales, Alenir Naves de.

Produção de celulases e xilanases por actinobactérias isoladas do cerrado mineiro / Alenir Naves de Sales. – Lavras : UFLA, 2013.  
91 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2013.  
Orientador: Disney Ribeiro Dias.  
Bibliografia.

1. Solos de cerrado. 2. Biodiversidade de actinobactérias. 3. Enzimas. 4. Biotecnologia. 5. Resíduos lignocelulósicos. 6. Microbiologia industrial. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 660.634

**ALENIR NAVES DE SALES**

**PRODUÇÃO DE CELULASES E XILANASES POR  
ACTINOBACTÉRIAS ISOLADAS DO CERRADO MINEIRO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 21 de novembro de 2013.

Dr. Whasley Ferreira Duarte	UFLA
Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli	UFLA
Dra. Carolina Valeriano	UFLA
Dra. Patrícia de Fátima Pereira Goulart	UNILAVRAS

Dr. Disney Ribeiro Dias  
Orientador

Dra. Rosane Freitas Schwan  
Coorientadora

**LAVRAS – MG**

**2013**

*A Deus, a luz da minha vida.  
À minha querida família.*

## **DEDICO AGRADECIMENTOS**

A Deus, por sua bondade, proteção, inspiração e por ter sido meu refúgio e fortaleza em todos os momentos, principalmente nos mais probantes.

Ao professor Dr. Disney Ribeiro Dias, pela orientação durante a realização deste trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, pelo suporte acadêmico.

Aos meus queridos filhos, Mateus e Lívia, minha alegria e motivação.

Aos meus pais, pelo incentivo e ao meu esposo Gil, pelo companheirismo.

Às colegas do laboratório de enzimas microbianas, Fernanda, Karla, Suzana e Kelly, pessoas íntegras e prestativas, pelo apoio constante e amizade.

À Simone, pelos conselhos e amizade.

À querida amiga Angélica, pela participação direta neste trabalho e pela estreita amizade estabelecida.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Biologia, pela oportunidade para a realização do doutorado.

À FAPEMIG, pelo suporte financeiro.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a concretização deste projeto,

**Muito obrigada!**

*“Ó Deus, eu penso os Teus pensamentos depois de Ti.”*

## RESUMO GERAL

De maneira geral, o solo representa um dos mais diversos e heterogêneos habitats para Bacteria e Archaea no planeta. Dentre as bactérias, o Filo Actinobacteria, constituído por microrganismos gram-positivos, se destaca por sua ampla aplicação biotecnológica, como produtor de uma infinidade de compostos bioativos, incluindo antibióticos, enzimas e vários outros metabólitos de interesse industrial. As actinobactérias têm sido isoladas em vários biomas, em todo o mundo. Entretanto, o Cerrado brasileiro, cuja riqueza da biodiversidade é expressiva, tem sido pouco explorado na bioprospecção de espécies de actinobactérias com possíveis aplicações biotecnológicas. Desse modo, no presente trabalho, objetivou-se isolar actinobactérias do solo do Cerrado brasileiro durante a estação de alta pluviosidade. Um total de 1.432 estirpes de actinobactérias foram isoladas nos municípios de Arcos, Passos e Luminárias (Minas Gerais, Brasil). Os solos foram caracterizados por meio de análises químicas e microbiológicas. As análises microbiológicas levaram à identificação de nove gêneros (*Streptomyces*, *Artrobacter*, *Rhodococcus*, *Amycolatopsis*, *Microbacterium*, *Frankia*, *Leifsonia*, *Nakamurella* e *Kitasatospora*) e 92 espécies distintas, na estação de alta pluviosidade. Os valores de pH das amostras de solo das três regiões variaram de 4,1 a 5,5. Não houve diferença significativa nas concentrações de fósforo, magnésio e matéria orgânica dos solos, entre as áreas estudadas. As amostras da área de Arcos apresentaram grandes quantidades de alumínio, o que parece não ter afetado as populações de actinobactérias encontradas. Os presentes dados sugerem que o número e a diversidade de espécies de actinobactérias em solos tropicais representam um amplo recurso, ainda pouco explorado, para a produção de compostos bioativos. A aplicação biotecnológica das actinobactérias identificadas foi avaliada quanto à capacidade dos isolados para a produção de enzimas dos complexos celulolítico e xilanolítico. Foram avaliadas as estirpes isoladas nas estações de alta e de baixa pluviosidade, sendo estas últimas provenientes de outro trabalho, realizado no mesmo local de amostragem. Testes semiquantitativos preliminares, feitos em placas de Petri contendo CMC e xilana de madeira de faia como fontes de carbono, indicaram, entre as 92 espécies identificadas, 11 potenciais produtoras de enzimas, todas pertencentes ao gênero *Streptomyces*. As espécies foram subsequentemente cultivadas nos mesmos substratos, em fermentação submersa e analisadas quanto à produção das enzimas endoglucanase,  $\alpha$ -glicosidase, endoxilanase e  $\alpha$ -xilosidase. Os melhores resultados foram obtidos na produção da enzima endoxilanase por *Streptomyces termium*. A estirpe foi posteriormente cultivada em resíduos lignocelulósicos (bagaço e palha de cana-de-açúcar e casca de cacau) *in natura* e pré-tratados. O



meio contendo bagaço de cana *in natura* apresentou melhores resultados para a produção da enzima endoxilanase. Um modelo experimental foi, então, proposto, a fim de otimizar a produção da enzima no referido substrato, variando-se as concentrações de bagaço de cana, de extrato de levedura e do pH do meio de cultivo. Os resultados mostraram que a mais alta produção da enzima (25,8 vezes maior) ocorreu quando se associaram 2,75% de bagaço de cana e 1,0 g/L de extrato de levedura ao meio de cultivo alcalino (pH 9,7). A partir dos resultados obtidos pode-se sugerir o uso da espécie *Streptomyces termitum* em processos biotecnológicos, devido à produção de endoxilanase em um meio de cultivo simples e econômico.

Palavras-chave: Enzimas. Biodiversidade de actinobactérias. Cerrado. Solos. Otimização

## GENERAL ABSTRACT

In general, the soil is one of the most diverse and heterogeneous habitats for *Bacteria* and *Archaea* in the planet. Among *bacteria*, *Phylum Actinobacteria*, consisting of micro-organisms Gram-positives, stands out for its wide biotechnological application, such as producing of bioactive compounds, including antibiotics, enzymes and several other metabolites of industrial interest. The Actinobacterias have been isolated in various biomass, all over the world. However, the Brazilian *Cerrado*, whose rich biodiversity is significant, has been poorly explored in the bioprospecting of actinobacterias species with potential biotechnological applications. Thus, this study aimed to isolate actinobacterias from Brazilian Cerrado soil during the season of high rainfall. A total of 1.432 actinobacterias strains were isolated in the municipalities, *Arcos*, *Passos* and *Luminárias* (Minas Gerais State, Brazil). The soils were characterised by chemical and microbiological analysis. The microbiological analysis led to the identification of nine genus (*Streptomyces*, *Artrobacter*, *Rhodococcus*, *Amycolatopsis*, *Microbacterium*, *Frankia*, *Leifsonia*, *Nakamurella* e *Kitasatospora*) and 92 distinct species in the season of high rainfall. The pH values of the soil samples from three regions varied from 4.1 to 5.5. There was not significant difference in the concentrations of phosphorus, magnesium and organic matter in the soils, among the studied areas. The samples from *Arcos* area showed large amounts of aluminum, which does not seem to have affected the actinobacterias populations found. The present data suggest that the number and diversity of actinobacterias species in tropical soils represent a vast resource, still little explored, for the production of bioactive compounds. The biotechnological application of actinobacterias identified was assessed as the ability of the isolated to produce enzymes of cellulolytic and xylanolytic complex. The strains isolated were evaluated in both seasons studied, high and low rainfall, being these last from another study, realized in the same sampling site. Preliminary semi-quantitative tests, made in Petri plates containing carboxymethylcellulose CMC and beech wood xylan as carbon sources, indicated, among the 92 species identified, 11 potential species producing enzymes, all belonging to the *Streptomyces* genus. The species were subsequently grown in the same substrates in submerged fermentation and analyzed for the enzymes production endoglucanase,  $\beta$ -glucosidase, endoxyylanase and  $\beta$ -xylosidase. The best results were obtained in endoxyylanase enzyme production by *Streptomyces termitum*. Subsequently, the strain was grown on lignocellulosic residues (bagasse and straw sugar cane and cocoa

straw) *in natura* and pre-treated. The medium containing sugar cane bagasse *in natura* showed best results for the production of endoxylanase enzyme. An experimental model was then, proposed to optimize the production of the enzyme in said substrate, varying concentrations of sugar cane bagasse, yeast extract and pH from the medium culture. The results showed that the highest enzyme production (25.8 times higher) was when combining 2.75% sugar cane bagasse and 1.0 g/L of yeast extract to the medium culture alkaline (pH 9.7). From the results obtained may suggest the use of *Streptomyces termitum* species in biotechnological processes, due to production of endoxylanase in a medium culture simple and economical.

Keywords: Enzymes. Biodiversity of Actinobacterias. Cerrado. Soils. Optimization.

## SUMÁRIO

	<b>PRIMEIRA PARTE</b> .....	12
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>3</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	14
<b>3.1</b>	<b>O cerrado brasileiro e a diversidade microbiana do solo.</b> .....	14
<b>3.2</b>	<b>Características gerais e aplicações biotecnológicas das actinobactérias</b> .....	15
<b>3.3</b>	<b>Resíduos lignocelulósicos</b> .....	17
<b>3.4</b>	<b>Estrutura da parede celular vegetal</b> .....	20
<b>3.5</b>	<b>Tecnologias de pré-tratamento</b> .....	22
<b>3.6</b>	<b>Hidrólise enzimática</b> .....	24
<b>3.6.1</b>	<b>Microrganismos produtores de enzimas hidrolíticas</b> .....	26
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	29
	<b>SEGUNDA PARTE – ARTIGOS</b> .....	35
	<b>ARTIGO 1 Ecologia de actinobactérias do solo do Cerrado brasileiro durante estação de alta pluviosidade</b> .....	35
	<b>ARTIGO 2 Otimização da produção de endoxilanase por <i>Streptomyces termitum</i> utilizando bagaço de cana-de-açúcar como substrato indutor</b> .....	59

## PRIMEIRA PARTE

### 1 INTRODUÇÃO

De maneira geral, o solo representa um dos mais diversos e heterogêneos habitats para microrganismos no planeta, abrigando grande variedade de fungos, leveduras, algas, protozoários e bactérias.

Dentre as bactérias, o Filo Actinobacteria, constituído por microrganismos gram-positivos, encontrados nos mais diversos habitats, se destaca por sua ampla aplicação biotecnológica, como produtor de uma infinidade de compostos bioativos, incluindo antibióticos, enzimas e vários outros metabólitos de interesse industrial. Tais bactérias têm sido isoladas em vários biomas, em todo o mundo. Entretanto, o Cerrado brasileiro, cuja riqueza da biodiversidade é expressiva, tem sido pouco explorado na bioprospecção de espécies de actinobactérias com possíveis aplicações biotecnológicas.

Integrando a grande diversidade taxonômica dentro do Filo Actinobacteria, o gênero *Streptomyces* compreende bactérias filamentosas que sofrem diferenciação e esporulação, sendo a fonte mais promissora de compostos comercialmente importantes, incluindo antibióticos e enzimas.

As enzimas envolvidas na degradação da lignocelulose, polímero constituinte da parede celular vegetal, são, principalmente, as celulasas e as xilanases, cuja ação sinérgica cliva o polímero em unidades monoméricas potencialmente fermentáveis. A produção industrial dessas enzimas, entretanto, é, geralmente, limitada pelo custo do substrato utilizado para cultivo dos microrganismos. Neste contexto, a utilização de resíduos agroindustriais, como componentes do meio de crescimento microbiano, pode representar uma redução de custos na produção de importantes enzimas, além de proporcionar vantagens ambientais pela sua retirada do meio ambiente.

O Brasil tem ocupado posição de destaque entre os produtores mundiais de gêneros agrícolas tropicais, tais como a cana-de-açúcar e o cacau. Proporcionalmente à quantidade de matéria-prima de interesse econômico que essas culturas disponibilizam, como o caldo da cana-de-açúcar e as amêndoas do cacau, obtêm-se resíduos que podem ser aproveitados de maneira alternativa, agregando valor a essas culturas e minimizando problemas ambientais, oriundos da sua deposição no meio ambiente.

A bioprospecção de actinobactérias com potencial hidrolítico, aliada ao cultivo desses microrganismos em substrato lignocelulósico, em condições de produção enzimática otimizadas, é relevante para o desenvolvimento de processos com vantagens econômicas e ambientais.

A partir do exposto, o presente trabalho foi realizado com os objetivos de isolar actinobactérias do solo do cerrado mineiro e avaliar o potencial dos isolados na produção de enzimas do complexo celulolítico e xilanolítico, quando cultivadas em resíduos lignocelulósicos.

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 O cerrado brasileiro e a diversidade microbiana do solo

Dentre os biomas brasileiros, o Cerrado ocupa o segundo lugar em extensão, abrangendo uma área de, aproximadamente, 1,8 milhão de km<sup>2</sup> (cerca de 25% do território brasileiro), cortando o país no sentido nordeste-sudoeste (GOMES et al., 2000).

A riqueza de espécies, tanto da flora quanto da fauna, é muito expressiva, representando cerca de 30% da biodiversidade brasileira. Entretanto, a microbiota desses solos, que constitui excelente fonte para a busca de novas enzimas, fármacos, entre outros compostos, tem sido pouco explorada (AGUIAR; CAMARGO, 2004; GOMES et al., 2000). Além do mais, o Cerrado está sendo destruído em velocidade muitas vezes superior à capacidade de a comunidade científica promover o conhecimento necessário para a sua proteção e conservação. Estratégias prudentes, ainda que insipientes, têm sido adotadas com a criação de unidades de conservação nos locais e nas regiões ainda expressivos (AGUIAR; CAMARGO, 2004).

De maneira geral, o solo constitui ambiente rico em microbiota, abrigando grande variedade de bactérias, actinobactérias, fungos, algas e protozoários, o que o torna um dos locais mais dinâmicos de interações biológicas e sede de diversas reações bioquímicas.

Representando um dos mais diversos e heterogêneos habitats para Bacteria e Archaea no planeta, o solo abriga comunidade procariótica com mais alta diversidade do que a presente na maioria de outros habitats naturais. Além da alta diversidade, contém também elevado número de procariotos, da ordem de  $10^7$ - $10^{10}$  células por grama de solo seco. A diversidade microbiana pode ser considerada parte integral do ecossistema e pode ser utilizada como indicador biológico de qualidade e de fertilidade do solo. Esta alta diversidade genômica

pode ser explicada pelo elevado tamanho populacional, pela capacidade de acumular alto número de mutações e pela natureza das interações que as diversas populações estabelecem entre si (ELSAS; JANSSON; TREVORS, 2006).

### **3.2 Características gerais e aplicações biotecnológicas das actinobactérias**

Integrando a microbiota do solo, encontra-se um dos maiores grupos do domínio Bacteria, o Filo Actinobacteria, que pode também ter outros habitats, como os ambientes marinhos ou áridos extremos. Algumas actinobactérias vivem em estreita associação com organismos superiores, como os seres humanos, onde constituem mais de um terço da microbiota saudável. Encontram-se também em nódulos simbióticos de certas espécies de árvores e arbustos, onde atuam como fixadores do nitrogênio atmosférico, proporcionando nutrição ao hospedeiro em ambiente nutriente-limitante (MIAO; DAVIES, 2010).

O Filo Actinobacteria agrupa bactérias gram-positivas, normalmente, com elevado conteúdo de guanina-citosina (65%-75% G + C) em seu DNA e com genomas que variam entre 2,5-Mb a 9,7-Mb. O sequenciamento do gene 16S rRNA levou ao reconhecimento de 39 famílias e 130 gêneros, incluindo 5 subclasses e 14 subordens, o que representa uma das maiores unidades taxonômicas em termos de número e variedade de espécies identificadas dentro do domínio *Bacteria* (VENTURA et al., 2007). No entanto, exceto por seu padrão de ramificação na árvore de rRNA 16S, até recentemente não se conheciam características moleculares, bioquímicas ou fisiológicas que pudessem distinguir espécies desse grupo das demais bactérias. Atualmente, por meio de análise genômica, proteínas específicas deste grupo puderam ser identificadas. Essas proteínas contribuem para definir e circunscrever o Filo Actinobacteria e um número de subgrupos dentro dele, para fornecer



informações úteis sobre a inter-relação entre os subgrupos, além de fornecer potenciais alvos para o desenvolvimento de drogas que são específicas de actinobactérias (GAO et al., 2006).

As actinobactérias são microrganismos que exibem alta diversidade morfológica, variando a partir de cocos a formas de hifas fragmentadas ou micélio ramificado altamente diferenciado, bem adaptado à penetração e à degradação de substratos insolúveis, tais como a lignocelulose. Elas também exibem propriedades fisiológicas e metabólicas diversas, como a produção de enzimas extracelulares e a formação de ampla variedade de metabólitos secundários (TUNCER et al., 1999; VENURA et al., 2007).

Desde a descoberta dos antibióticos, na década de 1940, o Filo Actinobacteria tem recebido muita atenção, especialmente o gênero *Streptomyces*, que se destacou como a principal fonte de fármacos. *Streptomyces* são bactérias filamentosas do solo que sofrem diferenciação e esporulação, e produzem elevado número de compostos bioativos, incluindo antibióticos e enzimas (GARG; PARRY, 2010). O uso de enzimas hidrolíticas para a obtenção de nutrientes solúveis a partir de carboidratos, como a quitina e a celulose, lhes permite interagir com outros microrganismos (CHATER et al., 2010).

As enzimas microbianas envolvidas na degradação da lignocelulose, como endoxilanasas, peroxidase e celulasas, podem ter aplicações biotecnológicas com a vantagem de apresentarem alta especificidade, condições leves de reação, ausência de inibidores de hidrólise química tóxicos, como vanilina e furaldeído e sem perda de substrato devido a modificações químicas. Os produtos da hidrólise enzimática podem ser convertidos, posteriormente, em combustíveis líquidos, proteína de célula única, solventes e outros produtos químicos, pelo uso seletivo de microrganismos fermentadores (TUNCER et al., 1999).

Actinobactérias endofíticas, com a capacidade intrínseca de colonizar os tecidos internos das plantas, atuam efetivamente como agentes de biocontrole. Encontram-se também, entre seus metabólitos secundários, compostos com atividade antifúngica, que têm protegido uma série de espécies de plantas contra fungos fitopatogênicos. Além disso, muitas estirpes de actinobactérias têm sido utilizadas industrialmente, como, por exemplo, nos processos de biorremediação, destruição de xenobióticos tóxicos, produção de vitaminas, transformação e produção química fina e, mais recentemente, no desenvolvimento de biocombustíveis (COOMBS; MICHELSEN; FRANCO, 2004; MIAO; DAVIES, 2010).

### **3.3 Resíduos lignocelulósicos**

A biomassa lignocelulósica inclui resíduos agrícolas, como palhas, cascas, caules, hastes, bagaços e farelos, os quais podem ser originados de cereais (arroz, trigo, milho, sorgo), legumes (tomate, feijão, soja), frutas (banana, manga, coco), além de madeiras decíduas e coníferas, café, cacau, algodão, amendoim, juta, azeitona e resíduos da indústria de polpa e papel (SAHA, 2003; SÁNCHEZ; CARDONA, 2008; VANDAMME, 2009).

Nos últimos anos tem havido tendência crescente de utilização de resíduos agroindustriais como matérias-primas para a produção de produtos químicos e produtos com valor agregado, como etanol, proteínas de célula única, enzimas, ácidos orgânicos, aminoácidos e metabólitos secundários biologicamente ativos, entre outros (PANDEY et al., 2000). Os resíduos também são utilizados, atualmente, para a produção de biogás, para a geração de calor, vapor ou eletricidade; eles atraem cada vez mais a atenção por constituírem matéria-prima renovável, abundante e de baixo custo (VANDAMME, 2009).

A utilização de resíduos agroindustriais em bioprocessos, além de proporcionar substratos alternativos, ajuda a resolver os problemas de poluição oriundos de sua deposição no ambiente (PANDEY et al., 2000).

No Brasil, desde 1986, uma série de projetos de pesquisa vem sendo desenvolvida, com a finalidade de agregar valor a produtos e a subprodutos agrícolas tropicais, devido à geração de grande quantidade de resíduos agrícolas (SOCCOL; VANDENBERGHE, 2003).

Diversos processos e produtos têm sido relatados por utilizarem o bagaço de cana-de-açúcar como matéria-prima. Eles incluem geração de eletricidade, produção de celulose e de papel, produtos à base de fermentação e processos de bioconversão (PANDEY et al., 2000).

O bagaço da cana-de-açúcar (ou bagaço, como, geralmente, é chamado) é um resíduo fibroso obtido após o esmagamento e a extração do suco da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) (PANDEY et al., 2000). É produzido em grandes quantidades pelas indústrias de açúcar e álcool, principalmente em países tropicais, como Brasil, Índia, Cuba, China, México, Indonésia e Colômbia. Cerca de 540 milhões de toneladas secas de cana-de-açúcar são processadas, anualmente, em todo o mundo. Geralmente, cada tonelada gera 280 kg de bagaço, sendo aproximadamente 50% desse resíduo utilizado, em usinas de destilaria, como fonte de energia e o restante, estocado (CARDONA; QUINTERO; PAZ, 2010).

Morfologicamente, o bagaço apresenta grande heterogeneidade, sendo constituído por feixe de fibras e outros elementos estruturais, tais como vasos, parênquima e células epiteliais; é composto por cerca de 40%-45% de celulose, 30%-35% de hemicelulose e 20%-30% de lignina (PENG et al., 2009). Quimicamente, o bagaço contém em torno de 50% de  $\alpha$ - celulose, 30% de pentosanas e 2,4% de cinzas (PANDEY; SOCCOL; NIGAM, 2000; SANJUAN et al., 2001).

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, com produção estimada de 652.015,9 milhões de toneladas, em 2013 (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2013). Esta produção considerável leva ao acúmulo de subprodutos, principalmente de palha de cana, de folhas frescas e de bagaço.

No atual sistema de produção no Brasil, a palha é queimada, para permitir a colheita manual da cana, ou permanece no campo após a colheita mecanizada. Atualmente, com o predomínio desta última, enormes quantidades de palha estão disponíveis como matéria-prima. Ao mesmo tempo, existem, ainda, incertezas quanto à quantidade de palha que deve permanecer no campo para a preservação do solo, uma vez que os valores variam entre os diferentes tipos de solos e pouca informação desta biomassa está atualmente disponível (SILVA et al., 2010).

Outra cultura economicamente importante em vários países tropicais é o cacau. Suas amêndoas são utilizadas, principalmente, na produção de chocolate e também na indústria farmacêutica e de cosméticos (KALVATCHEV; GARZARO; CEDEZO, 1998).

Na safra de cacau de 2008-2009, a produção foi superior a 3,5 milhões de toneladas (INTERNATIONAL COCOA ORGANIZATION - ICCO, 2013), das quais 170.530 t foram produzidas no Brasil (COMISSÃO EXECUTIVA DO PLANO DA LAVOURA CACAUEIRA - CEPLAC, 2009). No entanto, para cada tonelada de amêndoa produzida, são geradas 10 t de cascas, que são consideradas resíduo indesejável da indústria de cacau/chocolate (FIGUEIRA; JANICK; BEMILLER, 1993; KALVATCHEV; GARZARO; CEDEZO, 1998). Normalmente, as cascas apodrecem nas plantações, produzindo mau cheiro e podendo propagar doenças, como a podridão-parda (BARAZARTE; SANGRONIS; UNAI, 2008; DONKOH et al., 1991; FIGUEIRA; JANICK; BEMILLER, 1993; KALVATCHEV; GARZARO; CEDEZO, 1998).

Em virtude da grande importância dos resíduos agroindustriais, existe considerável interesse no desenvolvimento de métodos para a produção biológica de combustíveis e produtos químicos que ofereçam vantagens econômicas, ambientais e estratégicas. Todavia, tais processos constituem tarefa bastante desafiadora, devido à complexa estrutura da parede celular vegetal (ABRAMSON; SHOSEYOV; SHANI, 2010).

### 3.4 Estrutura da parede celular vegetal

A lignocelulose é a mais abundante biomassa renovável e, segundo dados de Sánchez e Cardona (2008), sua produção anual é da ordem  $1 \times 10^{10}$  MT, em todo o mundo. Ela é constituída por três tipos de polímeros, celulose, hemicelulose e lignina, que estão fortemente entrelaçados e quimicamente ligados por forças não covalentes e por ligações covalentes cruzadas, conforme Figura 1.

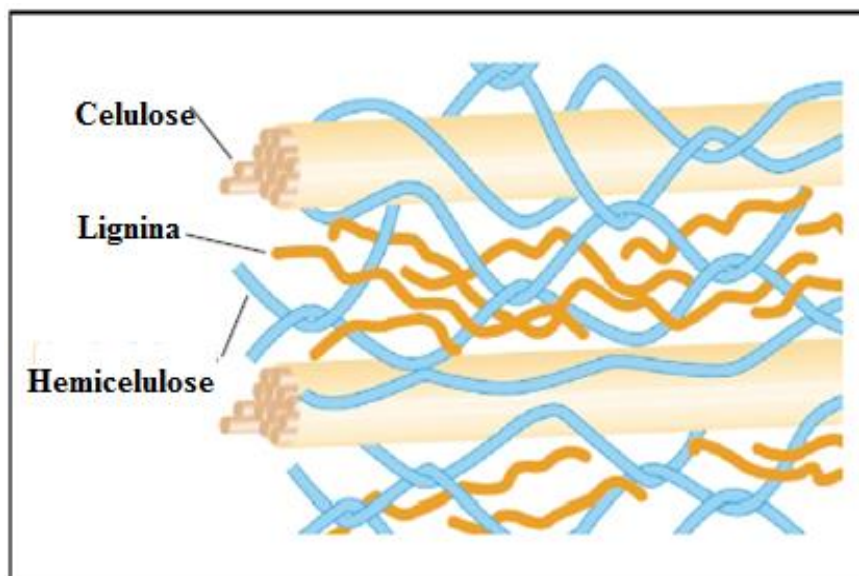


Figura 1 Representação esquemática da parede secundária lignificada. Adaptado de Boudet et al. (2003)

Todas as paredes celulares dos vegetais superiores contêm celulose, um homopolímero composto de subunidades de D-glicose unidas por ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4, formando o dímero celobiose. Esses formam longas cadeias unidas por pontes de hidrogênio e forças de van der Waals. A celulose, geralmente, está presente como uma forma cristalina e uma pequena quantidade de cadeia de celulose não organizada forma a celulose amorfa, que é a forma mais susceptível à degradação enzimática (PÉREZ et al., 2002).

As hemiceluloses, o segundo material vegetal mais abundante, são heteropolissacarídeos que estão conectados com a celulose e a lignina da parede celular; as ligações com a celulose ocorrem através de pontes de hidrogênio e com a lignina, por meio de ligações covalentes.

Quimicamente, as hemiceluloses são polímeros ramificados de baixo peso molecular, com um grau de polimerização de 8-200, cuja fórmula geral é  $(C_5H_8O_4)_n$ . Os principais resíduos de açúcar que as constituem são D-xilose, L-arabinose, D-glucose, D-galactose, D-manose, D-ácido glucurônico, 4-*O*-metil-D-ácido glucurônico, D-ácido galacturônico e, em menor extensão, L-ramnose, L-fucose, e vários açúcares neutros *O*-metilados. Os açúcares estão unidos por ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4- e, algumas vezes, por ligações  $\beta$ -1,3 (PENG et al., 2009).

A principal diferença entre a celulose e a hemicelulose é que esta última tem ramos com cadeias laterais curtas constituídos de diferentes açúcares e a celulose consiste de oligômeros facilmente hidrolisáveis (SÁNCHEZ, 2009).

A lignina está ligada à celulose e à hemicelulose por meio de um elo físico que é uma barreira impenetrável na parede celular vegetal. É um polímero aromático sintetizado a partir de precursores fenilpropanoides, que confere suporte estrutural, impermeabilidade e resistência contra o ataque microbiano e o estresse oxidativo. Estruturalmente, a lignina é um heteropolímero amorfo, não

solúvel em água e opticamente inativo, consistindo de unidades fenilpropanos unidas por diferentes tipos de ligações (PÉREZ et al., 2002).

Ao se considerarem os materiais da parede, ressalta-se que há diferenças substanciais nas paredes de plantas superiores, tanto qualitativa como quantitativamente (PAULY; KEEGSTRA, 2008).

O aproveitamento dos componentes da parede celular é uma tarefa bastante desafiadora porque sua estrutura é naturalmente resistente à decomposição por forças mecânicas e microbianas, visando atender às necessidades dos vegetais de completar o seu ciclo de vida (PAULY; KEEGSTRA, 2008).

A despeito dos desafios mencionados, os resíduos já têm sido utilizados com sucesso em alguns meios de cultura para a produção de enzimas. Entretanto, para a bioconversão da biomassa lignocelulósica em açúcares, de forma eficaz e econômica, algumas vezes um pré-tratamento tem sido aplicado (GRIGOREVSKI-LIMA et al., 2013).

### **3.5 Tecnologias de pré-tratamento**

A hidrólise da lignocelulose em monossacarídeos é tecnicamente desafiadora, devido a fatores físico-químicos, estruturais e composicionais. Assim, uma etapa de pré-tratamento é importante para quebrar a estrutura da lignina e romper a estrutura cristalina da celulose, facilitando a acessibilidade de enzimas à celulose durante o processo de hidrólise (Figura 2).

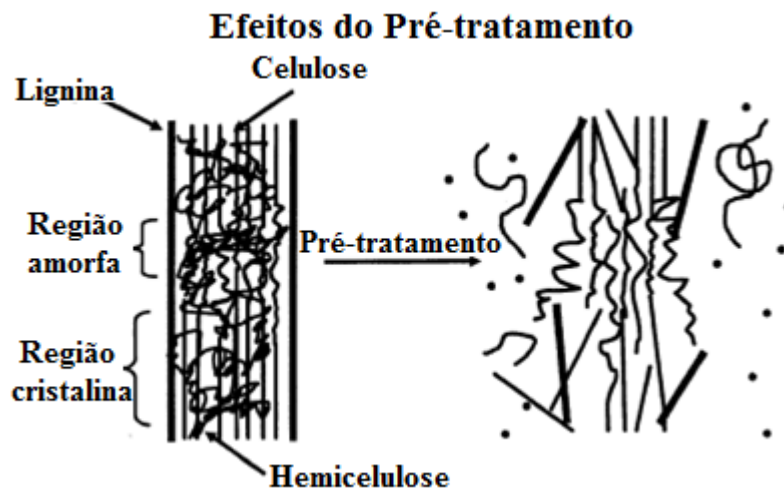


Figura 2 Efeitos do pré-tratamento de material lignocelulósico  
Adaptado de Mosier et al. (2005)

Grande número de modalidades de pré-tratamento tem sido investigado em grande variedade de tipos de matérias-primas, considerando-se que diferentes materiais lignocelulósicos têm diferentes propriedades físico-químicas (ALVIRA, 2010). De acordo com as diferentes fontes de energia que consomem, os processos de pré-tratamento são classificados em biológicos, físicos, químicos ou físico-químicos.

As modalidades de pré-tratamentos biológicos utilizam microrganismos, principalmente fungo marrom e branco, e o fungo causador da podridão-mole, que degradam lignina e hemicelulose e muito pouco de celulose, mais resistente do que os outros componentes (SÁNCHEZ, 2009).

Os processos de pré-tratamentos físicos têm como objetivos reduzir o tamanho da partícula e a cristalinidade da celulose, a fim de aumentar a superfície específica e reduzir o grau de polimerização (SUN; CHENG, 2002).

Várias modalidades de pré-tratamentos físico-químicos têm sido estudadas, incluindo explosão a vapor de  $\text{SO}_2$ , água líquida quente, explosão de fibra de amônia, oxidação úmida e explosão de  $\text{CO}_2$ .



O material lignocelulósico pode também ser submetido a diferentes modalidades de tratamentos químicos, incluindo pré-tratamentos alcalinos, ácidos, ozonólise ou organosolv (CARVALHEIRO et al., 2008).

As tecnologias que utilizam pré-tratamento ácido têm como principal objetivo solubilizar a fração hemicelulósica da biomassa e tornar a celulose mais acessível às enzimas durante a fase de hidrólise. Este tipo de pré-tratamento pode ser realizado com ácido concentrado ou diluído, e também em alta temperatura (por exemplo, 180 °C), durante um curto período de tempo (15 minutos) ou em temperaturas mais baixas (por exemplo, 120 °C), por um maior período de tempo (30-90 minutos) (SAHA et al., 2005).

### **3.6 Hidrólise enzimática**

O objetivo da hidrólise enzimática é despolimerizar os polissacarídeos da fração sólida insolúvel em água, sendo esses constituídos principalmente por celulose. Três classes de enzimas agem sinergicamente para hidrolisar a celulose: as endo- $\beta$ -1,4-glucanases, que atacam a parte endógena da cadeia de celulose, as celobio-hidrolases que atacam as extremidades do polímero, liberando celobiose que é finalmente clivada em duas moléculas de glicose por ação das  $\beta$ -glicosidases (Figura 3).

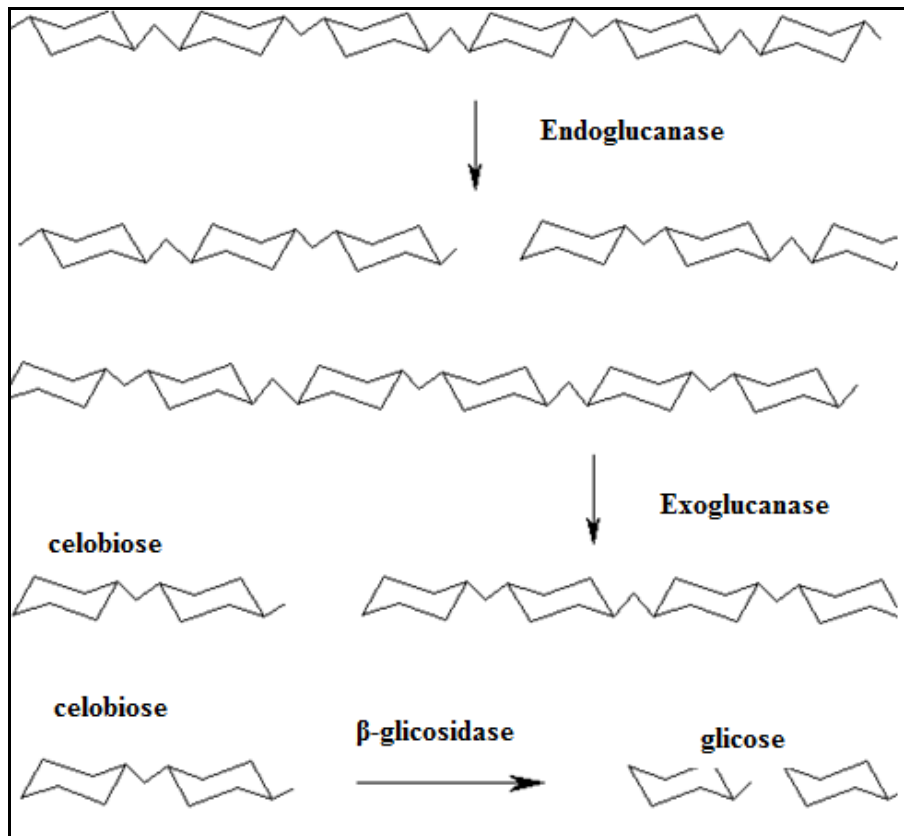


Figura 3 Ação das enzimas celulolíticas nas microfibras de celulose  
Adaptado de Soetaert e Vandamme (2009)

Embora enzimas similares estejam envolvidas na biodegradação de celulose e hemicelulose, mais enzimas são necessárias para a completa degradação desta última, devido à sua maior heterogeneidade. As hemiceluloses são biodegradadas em açúcares pela ação cooperativa de uma variedade de enzimas hidrolíticas, ou hemicelulases, que são frequentemente classificadas de acordo com a sua ação sobre substratos distintos: endo-1,4-β-xilanase gera oligossacarídeos a partir da clivagem da xilana e xilana1,4-β-xilosidase produz xilose a partir de oligossacarídeos (Figura 4).

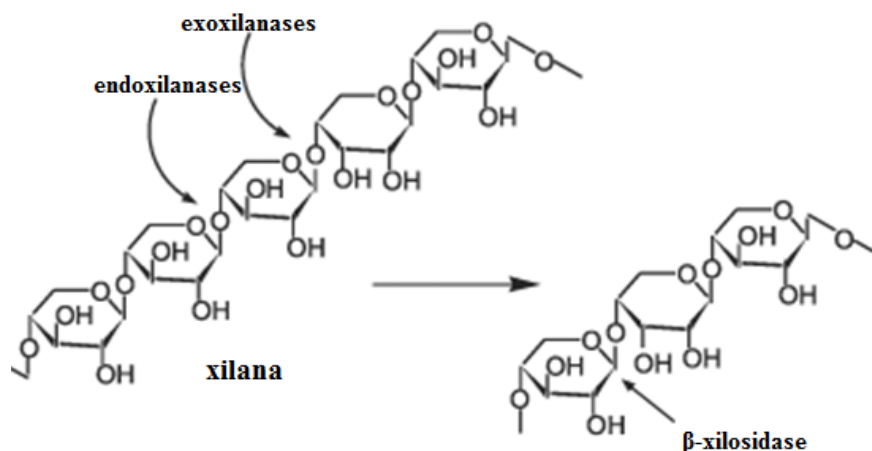


Figura 4 Ação das enzimas xilanolíticas nas microfibras de xilana  
Adaptado de Soetaert e Vandamme (2009)

Além disso, enzimas acessórias, incluindo hemicelulases e ligninasas, podem também desempenhar papel na hidrólise, melhorando o acesso das principais enzimas à celulose (SÁNCHEZ, 2009).

O alto custo de produção de enzimas é, muitas vezes, considerado grande desafio nos processos de aproveitamento da biomassa lignocelulósica (SÁNCHEZ, 2009).

### 3.6.1 Microrganismos produtores de enzimas hidrolíticas

Os microrganismos têm dois tipos de sistemas enzimáticos extracelulares que são o sistema hidrolítico, que produz hidrolases e é responsável pela degradação de celulose e hemicelulose e um único sistema lignolítico oxidativo e extracelular, que despolimeriza a lignina (PÉREZ et al., 2002).

Os microrganismos celulolíticos desempenham importante papel na biosfera pela reciclagem da celulose, o mais abundante carboidrato produzido pelos vegetais. Assim, o isolamento e a triagem de microrganismos produtores

de celulase são de suma importância, tendo em vista a procura de novas enzimas e a melhoria de suas aplicações biotecnológicas (KASANA et al., 2008).

Vários tipos de microrganismos podem produzir celulases para a hidrólise de materiais lignocelulósicos, incluindo ampla variedade de fungos filamentosos aeróbicos, actinobactérias aeróbicas, bactérias anaeróbicas hipertermofílicas e fungos anaeróbios (OLOFSSON; BERTILSSON; LIDÉ, 2008).

Os fungos que têm sido notificados para a produção de celulases incluem *Sclerotium rolfsii*, *Penicillium chrysosporium* e espécies de *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Schizophyllum* e *Penicillium*. De todos esses gêneros, *Trichoderma* tem sido mais extensivamente estudado (OLOFSSON; BERTILSSON; LIDÉ, 2008).

Dentre as bactérias, as pertencentes aos gêneros *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Bacillus*, *Thermomonospora*, *Ruminococcus*, *Bacteriodes*, *Erwinia*, *Acetovibrio*, *Microbispora* e *Streptomyces* também podem produzir hidrolases (SUN; CHENG, 2002).

Uma espécie de actinobactéria que habita o solo e é moderadamente termofílica, *Termobifida fusca* secreta celulases e outras enzimas que degradam carboidratos. Usando métodos bioquímicos clássicos, seis diferentes celulases foram identificadas, sendo quatro endocelulases e duas exocelulases. Além disso, uma  $\beta$ -glicosidase intracelular, uma xiloglucanase extracelular, duas xilanases e uma família GH 81 $\beta$ -1,3-glucanase foram clonadas e caracterizadas. As celulases secretadas são grande possibilidade para a utilização na degradação de produtos agrícolas e resíduos para a produção de açúcares que podem, posteriormente, ser convertidos em etanol (LYKIDS et al., 2007).

*Streptomyces viridobrunneus* SCPE-09, espécie de actinobactéria isolada de plantação de cana-de-açúcar no Brasil, foi selecionada como produtora de celulase utilizando resíduos agroindustriais. O microrganismo foi capaz de

crescer e produzir CMCase utilizando farelo de trigo ou bagaço de cana-de-açúcar como fontes de carbono e líquido de milho como fonte de nitrogênio (VINHA et al., 2011).

As xilanases têm sido isoladas de fungos termofílicos e mesofílicos, bactérias aeróbias e alguns gêneros ruminais. Xilanases termofílicas têm sido descritas em actinobactérias, como *Thermomonospora* e *Actinomadura*. As xilanases de actinobactérias são ativas em pH 6,0-7,0, porém, xilanases ativas em pH alcalino têm sido descritas a partir de *Bacillus* sp. ou *Streptomyces viridosporus* (PÉREZ et al., 2002).

A produção de xilanase por *Streptomyces* sp. RCK-2010, isolada do solo na Índia, foi otimizada variando-se as condições de cultivo e as fontes de carbono e nitrogênio. Entre as várias fontes de carbono testadas, a espécie produziu maiores índices de xilanase em farelo de trigo e, entre as fontes de nitrogênio, mais altas concentrações da enzima foram verificadas em extrato de carne, seguido de peptona (KUMAR et al., 2012).

A degradação da lignina tem sido descrita principalmente por fungos, mas também tem sido relatada em actinobactérias do gênero *Streptomyces*. Os sistemas enzimáticos de actinobactérias são capazes de solubilizar a lignina, separando-a da celulose de materiais lignocelulósicos como madeira e bagaço (PÉREZ et al., 2002).

A produção de enzimas extracelulares que degradam lignocelulose, tais como endoxilanase, endoglucanase e peroxidase, foi verificada durante o crescimento de *Streptomyces* sp. F2621, em diferentes condições ambientais, por Tuncer et al. (2004) e outra estirpe de actinobactéria, identificada como *Micromonospora carbonacea*, foi capaz de degradar celulose e hemicelulose em processos de compostagem de palha de arroz (KAUSAR et al., 2011).

## REFERÊNCIAS

ABRAMSON, M.; SHOSEYOV, O.; SHANI, Z. Plant cell wall reconstruction toward improved lignocellulosic production and processability. **Plant Science**, Shannon, v. 178, n. 2, p. 61-72, Feb. 2010.

AGUIAR, L. M. S.; CAMARGO, J. A. **Cerrado**: ecologia e caracterização. Brasília: EMBRAPA Informação Tecnológica, 2004. 249 p.

ALVIRA, P. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. **Bioresource Technology**, Essex, v. 101, n. 13, p. 4851-4861, July 2010.

BARAZARTE, H.; SANGRONIS, E.; UNAI, E. La cascara de cacao (*Theobroma cacao* L.): una posible fuente comercial de pectinas. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, Caracas, v. 58, n. 1, p. 64-70, feb. 2008.

BOUDET, A. M. et al. Lignins and lignocellulosics: a better control of synthesis for new and improved uses. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 8, n. 12, p. 576-581, Dec. 2003.

CARDONA, C. A.; QUINTERO, J. A.; PAZ, I. C. Production of bioethanol from sugarcane bagasse: status and perspectives. **Bioresource Technology**, Essex, v. 101, n. 13, p. 4754-4766, July 2010.

CARVALHEIRO, F. et al. Hemicellulose biorefineries: a review on biomass pretreatments. **Journal of Scientific & Industrial Research**, Melbourne, v. 67, p. 849-864, Nov. 2008.

CHATER, K. F. et al. The complex extracellular biology of *Streptomyces*. **Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 34, n. 2, p. 171-198, Mar. 2010.

COMISSÃO EXECUTIVA DO PLANO DA LAVOURA CACAUEIRA.

**Cacau:** informações de mercado: 09/11/2009 a 02/01/2010. Brasília, 2009.

Disponível em:

<<http://www.ceplac.gov.br/paginas/infomercado/informacoes%20de%20mercado%204.pdf>>. Acesso em: 10 jul. 2013.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar, safra 2013, segundo levantamento, agosto/2013.** Disponível em:

<[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13\\_08\\_08\\_09\\_39\\_29\\_boletim\\_cana\\_portugues\\_-\\_abril\\_2013\\_1o\\_lev.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_08_08_09_39_29_boletim_cana_portugues_-_abril_2013_1o_lev.pdf)>. Acesso em: 10 out. 2013.

COOMBS, J. T.; MICHELSEN, P. P.; FRANCO, C. M. M. Evaluation of endophytic actinobacteria as antagonists of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* in wheat. **Biological Control**, Orlando, v. 29, n. 3, p. 359-366, Mar. 2004.

DONKOH, A. et al. Chemical composition of cocoa pod husk and its effect on growth and food efficiency in broiler chicks. **Animal Feed Science Technology**, Amsterdam, v. 35, n. 1/2, p. 161-169, Oct. 1991.

ELSAS, J. D. van; JANSSON, J. K.; TREVORS, J. T. **Modern soil microbiology**. 2<sup>nd</sup> ed. Boca Raton: CRC, 2006. 646 p.

FIGUEIRA, A.; JANICK, J.; BEMILLER, J. N. New products from *Theobroma cacao*: seed pulp and pod gum. In: JANICK, J.; SIMIN, J. E. (Ed.). **New crops**. New York: Wiley, 1993. p. 475-478.

GAO, B. et al. Signature proteins that are distinctive characteristics of Actinobacteria and their subgroups. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 90, n. 1, p. 69-91, July 2006.

GARG, R. P.; PARRY, R. J. Regulation of valanimycin biosynthesis in *Streptomyces viridifaciens*: characterization of VlmI as a *Streptomyces* antibiotic regulatory protein. **Microbiology**, New York, v. 156, n. 2, p. 472-483, Nov. 2010.

GOMES, R. C. et al. Chitinolytic activity of actinomycetes from a cerrado soil and their potential in biocontrol. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 30, n. 2, p. 146-150, Feb. 2000.

GRIGOREVSKI-LIMA, A. L. et al. Production and partial characterization of cellulases and xylanases from *Trichoderma atroviride* 676 using lignocellulosic residual. **Biomass & Microbiology**, London, v. 156, n. 4, p. 472-483, Feb. 2013.

INTERNATIONAL COCOA ORGANIZATION. **Latest quarterly bulletin of cocoa statistics**. Disponível em: <<http://www.icco.org/about/press2.aspx?Id=15411756>>. Acesso em: 10 jun. 2013.

KALVATCHEV, Z.; GARZARO, D.; CEDEZO, F. G. Theobroma cacao L.: un nuevo enfoque para nutrición y salud. **Agroalimentaria**, Caracas, v. 6, n. 6, p. 23-25, jun. 1998.

KASANA, R. C. et al. A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using gram's iodine. **Current Microbiology**, New York, v. 57, n. 5, p. 503-507, Nov. 2008.

KAUSAR, H. et al. Isolation and screening of potential actinobacteria for rapid composting of rice straw. **Biodegradation**, Dordrecht, v. 22, n. 2, p. 367-375, Apr. 2011.

KUMAR, A. et al. Xylanase production from an alkalophilic actinomycete isolate *Streptomyces* sp. RCK-2010, its characterization and application in saccharification of second generation biomass. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Amsterdam, v. 74, n. 3/4, p. 170-177, Feb. 2012.

LYKIDIS, A. et al. Genome sequence and analyses of the soil cellulolytic Actinomycete *Thermobifida fusca* YX. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 189, n. 6, p. 2477-2486, Mar. 2007.



MIAO, V.; DAVIES, J. Actinobacteria: the good, the bad, and the ugly. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 98, p. 143-150, Apr. 2010.

MOSIER, N. et al. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, Essex, v. 96, n. 6, p. 673-686, Apr. 2005.

OLOFSSON, K.; BERTILSSON, M.; LIDÉ, G. A short review on SSF: an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks. **Biotechnology for Biofuels**, London, v. 1, n. 7, p. 1-14, May 2008.

PANDEY, A. et al. Biotechnological potential of agro-industrial residues: I., sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, Essex, v. 74, n. 1, p. 69-80, Aug. 2000.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P. Biotechnological potential of agro-industrial residues: II., cassava bagasse. **Bioresource Technology**, Essex, v. 74, n. 1, p. 81-87, Aug. 2000.

PAULY, M.; KEEGSTRA, K. Cell-wall carbohydrates and their modification as a resource for biofuels. **The Plant Journal**, Oxford, v. 54, n. 4, p. 559-568, May 2008.

PENG, F. et al. Comparative study of hemicelluloses obtained by graded ethanol precipitation from sugarcane bagasse. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 57, n. 18, p. 6305-6317, June 2009.

PÉREZ, J. et al. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. **International Microbiology**, Madrid, v. 5, n. 5, p. 53-63, June 2002.

SAHA, B. C. Hemicellulose bioconversion. **Journal of Industrial Microbiology Biotechnology**, Hampshire, v. 30, n. 5, p. 279-291, May 2003.

SAHA, B. C. et al. Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw to ethanol. **Process Biochemistry**, London, v. 40, n. 12, p. 3693-3700, Dec. 2005.

SÁNCHEZ, C. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology Advances**, New York, v. 27, n. 2, p. 185-190, Mar. 2009.

SÁNCHEZ, Ó. J.; CARDONA, C. A. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. **Bioresource Technology**, Essex, v. 99, n. 13, p. 5270-5295, Sept. 2008.

SANJUAN, R. et al. Morphological and chemical composition of pith and fibers from Mexican sugarcane bagasse. **Holz als Roh-und Werkstoff**, Berlin, v. 59, n. 6, p. 447-450, Dec. 2001.

SILVA, A. S. et al. Milling pretreatment of sugarcane bagasse and straw for enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation. **Bioresource Technology**, Essex, v. 101, n. 19, p. 7402-7409, Oct. 2010.

SOCCOL, R. S.; VANDENBERGHE, L. P. S. Overview of applied solidstatefermentation in Brazil. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 13, n. 2/3, p. 205-218, Oct. 2003.

SOETAERT, W.; VANDAMME, E. **Industrial biotechnology: sustainable growth and economic success**. Weinheim: Wiley-VCH, 2009. 499 p.

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technology**, Essex, v. 83, n. 1, p. 1-11, May 2002.

TUNCER, M. et al. Optimization of extracellular endoxylanase, endoglucanase and peroxidase production by *Streptomyces sp.* F2621 isolated in Turkey. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 97, n. 4, p. 783-791, Oct. 2004.

TUNCER, M. et al. Optimization of extracellular lignocellulolytic enzyme production by a thermophilic actinomycete *Thermomonospora fusca* BD25. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 25, n. 1/2, p. 38-47, July 1999.

VANDAMME, E. J. Agro-industrial residue utilization for industrial biotechnology products. In: NIGAM, P. S.; PANDEY, A. (Ed.). **Biotechnology for agro-industrial residues utilisation: utilisation of agro-residues**. New York: Springer, 2009. p. 3-10.

VENTURA, M. et al. Genomics of actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 71, n. 3, p. 495-548, Sept. 2007.

VINHA, F. N. M. da et al. Cellulase production by streptomyces viridobrunneus SCPE-09 using lignocellulosic biomass as inducer substrate. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 164, n. 3, p. 256-267, June 2011.

## SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

### ARTIGO 1

#### **Ecologia de actinobactérias do solo do Cerrado brasileiro durante estação de alta pluviosidade**

##### **Resumo**

Um total de 1.432 estirpes de actinobactérias foi isolado do solo do Cerrado brasileiro, nos municípios de Arcos, Passos e Luminárias (Minas Gerais, Brasil). Os solos foram caracterizados por meio de análises químicas e microbiológicas. Foram identificados nove gêneros (*Streptomyces*, *Artrobacter*, *Rhodococcus*, *Amycolatopsis*, *Microbacterium*, *Frankia*, *Leifsonia*, *Nakamurella* e *Kitasatospora*) e 92 espécies distintas na estação de alta pluviosidade. Os valores de pH das amostras de solo das três regiões variaram de 4,1 a 5,5. Não houve diferença significativa nas concentrações de fósforo, magnésio e matéria orgânica dos solos, entre as áreas estudadas. As amostras provenientes de Arcos apresentaram grandes quantidades de alumínio, o que parece não ter afetado as populações de actinobactérias. Os presentes dados sugerem que o número e a diversidade de espécies de actinobactérias em solos tropicais representam amplo recurso, ainda pouco explorado, para a produção de compostos bioativos.

**Termos para indexação:** Actinobactéria – Solos brasileiros – Rep-PCR.

As informações contidas no presente artigo foram publicadas na revista Biomed Research International em 2013, com o título *Brazilian Cerrado Soil Actinobacteria Ecology*. No artigo publicado, constam as informações relativas à estação de baixa pluviosidade, obtidas por Monique Silva.

**Abstract**

A total of 1.432 actinobacterias strains were isolated from the Brazilian Cerrado soil in the municipalities, *Arcos*, *Passos* and *Luminárias* (Minas Gerais, Brazil). The soils were characterised by chemical and microbiological analysis. Nine genus were identified (*Streptomyces*, *Artrobacter*, *Rhodococcus*, *Amycolatopsis*, *Microbacterium*, *Frankia*, *Leifsonia*, *Nakamurella* and *Kitasatospora*) and 92 distinct species in the season of high rainfall. The pH values of the soil samples from three regions varied from 4.1 to 5.5. There was not significant difference in the concentrations of phosphorus, magnesium and organic matter in the soils, among the studied areas. The samples from *Arcos* area showed large amounts of aluminum, which does not seem to have affected the actinobacterias populations. The present data suggest that the number and diversity of actinobacterias species in tropical soils represent a vast resource, still little explored, for the production of bioactive compounds.

**Keywords:** Actinobacteria. Brazilian soils. Rep-PCR.

The information contained in this article were published in the journal BioMed Research International in 2013, under the title Brazilian Cerrado Soil Actinobacteria Ecology. In the published article contained information relating to the low rainfall season, obtained by Monique Silva.

## 1 Introdução

As actinobactérias são um grupo distinto de bactérias que estão amplamente distribuídas na natureza (ZUCCHI; GUIDOLIN; CÔNSOLI, 2011). O Filo Actinobactéria abrange 39 famílias e 130 gêneros, incluindo 5 subclasses e 14 subordens (VENTURA et al., 2007), aos quais têm sido dada atenção especial em aplicações biotecnológicas, que são o resultado natural de sua grande diversidade metabólica (MIAO; DAVIES, 2010).

As actinobactérias são a fonte mais comum de antibióticos e promissora fonte de grande variedade de enzimas, inibidores enzimáticos e vitaminas (GARG; PARRY, 2010). Na natureza, as actinobactérias desempenham importante papel no ciclo de compostos orgânicos e também na produção de matéria orgânica, incluindo a produção de pigmentos escuros, chamados melanina, que estão relacionados com o solo ácido húmico (GOMES et al., 1996).

*Streptomyces* é o gênero mais comum de actinobactérias encontrado no solo, constituindo até 90% dos isolados. No entanto, novas abordagens para o isolamento de actinobactérias do solo têm revelado que outros gêneros também estão presentes em números significativos. Muitas novas espécies têm sido isoladas e a maior parte dos isolados é capaz de produzir metabólitos secundários (ZUCCHI; GUIDOLIN; CÔNSOLI, 2011).

Desde o primeiro antibiótico de *Actinobacterium*, relatado há mais de 50 anos, mais de 4.000 novos compostos bioativos foram descobertos. Portanto, a busca por novas espécies ou estirpes do grupo é de interesse primordial para o campo da biotecnologia (SCHATZ; BUGIE; WAKSMAN, 1944).

A taxonomia de actinobactérias é extremamente complexa e a classificação, usando apenas os métodos tradicionais, que são baseados nas características morfológicas e fisiológicas, tem levado a muitos grupos

supragenéricos heterogêneos. Recentemente, três abordagens principais têm sido sugeridas para identificar espécies de actinobactérias, que são a quimiotaxonomia (diferenciação de espécies pela composição química), a taxonomia numérica (diferenciação de espécies pelo número de similaridade fenotípica) e a sistemática molecular (uso de estudo do DNA para a diferenciação das espécies). Uma combinação das três técnicas se torna mais completa (ZUCCHI; GUIDOLIN; CÔNSOLI, 2011).

Os solos do cerrado brasileiro têm expressiva biodiversidade. Alguns desses solos têm sido descritos como habitats com elevada atividade biológica, mas não têm sido amplamente explorados para a pesquisa e a descoberta de novas espécies de actinobactérias.

Neste estudo foi realizado o isolamento de espécies de actinobactérias do solo do Cerrado brasileiro na estação de alta pluviosidade, bem como a comparação das comunidades de actinobactérias com as características físico-químicas desses solos.

## **2 Materiais e Métodos**

### **2.1 Amostragem do solo**

Quinze amostras compostas de solo foram coletadas durante o mês de janeiro (estação chuvosa), nos municípios de Passos, Arcos e Luminárias, em Minas Gerais. Esses solos são altamente conservados (nativos) e as localizações estão georreferenciadas na Figura 1 e na Tabela 1.

Cada amostra foi obtida de acordo com o procedimento de Lima et al. (2009). Doze subamostras de 75 a 100 g foram coletadas de cada ponto, em dois círculos concêntricos, com raios de 3 e 6 m a partir de um ponto central e a 20 cm de profundidade, com auxílio de um trado flambado. O material coletado em

cada ponto foi homogeneizado em saco plástico estéril e armazenado, a 4 °C, para análises posteriores.

## 2.2 Análises físico-químicas dos solos

Aproximadamente 200 g de cada amostra de solo foram submetidos a análises físico-químicas, de acordo com o protocolo da Embrapa. Foram avaliadas as concentrações de potássio (K), fósforo (P), alumínio (Al), magnésio (Mg), matéria orgânica (MO), hidrogênio e alumínio (Al+H) e bases intercambiáveis (SB), bem como o pH e a textura dos solos.

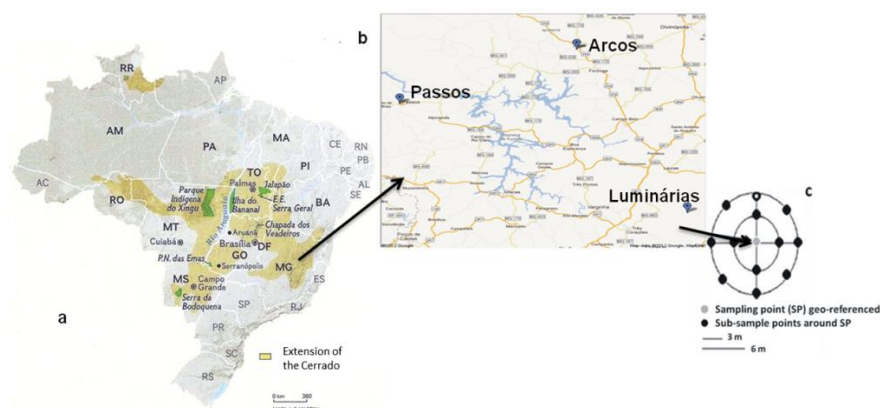


Figura 1 (a) Localização do solo do Cerrado em Minas Gerais, Brasil. (b) Locais de coleta das amostras. (c) Distribuição dos pontos de amostragem. Esquema do ponto de amostragem: uma amostra composta de solo (12 subamostras) foi coletada ao redor de cada ponto de amostragem

Tabela 1 Localização e descrição dos locais de coleta de solos do Cerrado brasileiro



Nome do local		Localização
<b>Região de Passos</b>	Ponto 1	20°49'57.7"S; 046°30'29.3"W
	Ponto 2	20°49'56.8"S; 046°30'30.1"W
	Ponto 3	20°49'48.0"S; 046°30'54.9"W
	Ponto 4	20°49'47.1"S; 046°30'54.5"W
	Ponto 5	20°49'47.8"S; 046°30'51.5"W
<b>Região de Luminárias</b>	Ponto 6	21°37'51.0"S; 044°58'22.7"W
	Ponto 7	21°37'50.6"S; 044°58'22.7"W
	Ponto 8	21°37'51.5"S; 044°59'11.0"W
	Ponto 9	21°37'55.3"S; 044°59'29.3"W
	Ponto 10	21°37'54.6"S; 044°59'54.0"W
<b>Região de Arcos</b>	Ponto 11	20°16'27.7"S; 045°29'14.6"W
	Ponto 12	20°14'47.9"S; 045°25'35.9"W
	Ponto 13	20°14'51"S; 045°31'40.8"W
	Ponto 14	20°14'48.6"S; 045°31'33.4"W
	Ponto 15	20°14'58.0"S; 045°31'54.0"W

### 2.3 Isolamento e purificação das culturas

Dez gramas de cada amostra composta de solo foram adicionados a 90 mL de água peptonada estéril (peptona bacteriológica, 1 g/L) e homogeneizados, sob agitação a 130 rpm, por 10 minutos, seguindo-se das diluições seriadas (diluições de  $10^{-1}$  a  $10^{-8}$ ).

Alíquotas de 100  $\mu$ l das diluições foram utilizadas para o plaqueamento por espalhamento em superfície nos meios Aaronson's, conforme utilizado por Silva et al. (2009) e no meio vitamina-ácido húmico, de acordo com Hayakawa e Yoshida (1987). As placas foram incubadas, a 28 °C, por 72 a 120 horas.

Colônias isoladas em número igual à raiz quadrada do número dos diferentes morfotipos foram cultivadas, a 28 °C, por 72 a 120 horas, em 500  $\mu$ l de caldo nutriente suplementado com glicerol, a uma concentração final de 20%. Os isolados foram purificados por meio de sucessivas repicagens e, então, preservados por congelamento, a -20 °C. As estirpes foram, posteriormente, reativadas em ágar nutriente por incubação a 28 °C, por 72 a 120 horas e, em

seguida, foram caracterizadas quanto à morfologia das colônias (tamanho, forma, elevação, brilho, cor e textura) por comparação com as colônias que foram originalmente isoladas a partir dos meios de cultura. As colônias puras foram preservadas sob as condições acima descritas.

O programa Sisvar (STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM INSTITUTE - SAS INSTITUTE, 2005) foi utilizado para análises estatísticas das diferenças entre os meios de cultivo.

#### **2.4 PCR com *primers* específicos para a amplificação seletiva de Actinobactérias**

O DNA genômico total foi extraído conforme metodologia descrita por Pereira et al. (2012). As culturas puras dos vários morfotipos coloniais foram caracterizadas por *primers* específicos para actinobactérias, de acordo com Schäfer, Jäckel e Kämpfer (2010) (Tabela 2). Os *primers* bacterianos universais 27f e 1492r foram utilizados como controle. As actinobactérias foram, subsequentemente, submetidas à caracterização molecular por REP-PCR, conforme descrito no item 2.5.

#### **2.5 Caracterização molecular baseada nas sequências palindrômicas extragênicas repetitivas (Rep-PCR)**

A caracterização molecular dos isolados selecionados foi realizada por REP-PCR, como descrito por Mohapatra, Broersma e Mazumder (2007). Para tanto, adicionaram-se 2 µL de DNA a 12,5 µl de Taq PCR Master Mix (Qiagen, São Paulo, Brazil), 8 µl H<sub>2</sub>O, 0,25 µl de albumina de soro bovino (BSA), 0,25 µl de formamida e 2 µl do *primer* GTG<sub>5</sub> (5'-GTG GTG GTG GTG GTG-3') [17]. A PCR realizou-se sob as seguintes condições de ciclagem: 5 minutos de

desnaturação inicial a 94 °C; 30 ciclos de 95 °C, por 30 segundos; 45 °C, por 60 segundos e 60 °C, por 5 minutos e uma elongação final, a 60 °C, por 16 minutos.

Os produtos da PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose a 2% em tampão TAE a 60 volts, por quatro horas, corados com SYBR Green (Invitrogen, Foster City, CA, USA) e visualizados em transluminador. Os perfis do Rep-PCR foram analisados e agrupados no programa Bionumerics 2.50 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium).

## **2.6 Amplificação e sequenciamento do gene 16S rRNA**

Os isolados representativos de cada perfil do Rep-PCR foram selecionados para amplificação do gene 16S rRNA, conforme metodologia descrita por Pereira et al. (2012). A PCR foi realizada acrescentando-se 2 µl de DNA a 30 µl de Taq PCR Master Mix (Qiagen, São Paulo, Brazil), 26 µl of H<sub>2</sub>O, 1 µl do *primer* 27f (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 1 µl do *primer* 1512r (5'-ACGGCTACCTTGTTACGACT-3').

A reação de PCR foi realizada sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 95 °C, por 10 minutos; 25 ciclos, a 93 °C, por 1 minuto; 50 °C, por 1 minuto; 72 °C, por 1 minuto e 30 segundos e uma elongação final, a 72 °C, por 5 minutos. A presença dos produtos da PCR foi confirmada por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE a 70 volts, por 30 minutos, coradas com SYBR Green (Invitrogen, Foster City, CA, USA) e visualizados em um transluminador. O sequenciamento dos amplicons foi realizado pela Macrogen Inc. (Seoul, South Korea) e as sequências comparadas com a base de dados do Gen Bank, utilizando-se o algoritmo BLAST (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION - NCBI, 2013).

Tabela 2 *Primers* específicos para actinobactérias utilizados nas comunidades bacterianas dos solos do Brasil, de acordo com Schäfer, Jäckel e Kämpfer (2010)

<i>Primers</i>	Sequência (5' – 3')	<i>Primers</i>	Fragmento Amplificado (bp)	Condições PCR
27f	GAG TTT GAT CMT GGC TCA G	<i>Primer</i> bacteriano universal	~1500	Desnaturação por 5 min, a 95 °C; 30 ciclos: desnaturação, a 92 °C, por 60 s; anelamento, a 55 °C, por 60 s e extensão, a 72,°C, por 60 s; extensão final, por 10 min, a 72 °C.
1492r	ACG GYT ACC TTG TTA CGA CTT	<i>Primer</i> específico para Actinobactéria	~270	
Com2xf	AAA CTC AAA GGA ATT GAC GG			
Ac1186r	CTT CCT CCG AGT TGA CCC	<i>Primer</i> específico para Actinobactéria	~640	
SC-Act-235aS20	CGC GGC CTA TCA GCT TGT TG			
SC-Act-878aA19	CCG TAC TCC CCA GGC GGG G			

### 3 Resultados e discussão

#### 3.1 Caracterização físico-química das amostras de solo do Cerrado

As propriedades químicas e bioquímicas do solo do Cerrado de Passos, Luminárias e Arcos são mostradas na Tabela 3.

As amostras de solo foram coletadas em janeiro de 2010 (alta pluviosidade, 1.000-2.100 mm). Uma observação importante é a heterogeneidade da distribuição de microrganismos no solo. Este efeito, contudo, foi minimizado por meio da coleta das amostras em diferentes pontos em cada área estudada e homogeneização das amostras individuais, a fim de obter amostra composta.

Os valores de pH dos solos variaram de 5,3 a 5,5, de 5,0 a 5,4 e de 4,1 a 5,0, para as regiões de Passos, Luminárias e Arcos, respectivamente. Esses solos apresentam elevada acidez (COELHO; DROZDOWICZ, 1978).

Observaram-se diferenças na textura dos solos nas regiões de Arcos, Passos e Luminárias, tendo a região de Arcos apresentado textura exclusivamente argilosa; em Luminárias, variou de arenosa a argilosa, enquanto em Passos predominou a textura média. Os valores de matéria orgânica nas três regiões avaliadas foram estatisticamente iguais, provavelmente devido às semelhanças na vegetação e aos perfis de mata ciliar peculiares (CASTRO et al., 2008). De maneira geral, as características físicas e químicas de todos os solos avaliados foram semelhantes.

A região de Arcos apresentou grande quantidade de alumínio (~2,4 mg/dm<sup>3</sup>) (Tabela 3). Elevada quantidade de alumínio no solo pode causar toxicidade nos vegetais, visto que o alumínio complexa com outros elementos, como, por exemplo, os nutrientes essenciais, indisponibilizando-os e promovendo, dessa forma, o empobrecimento do solo (RUGGIERO et al.,

2002). Estudos sobre os efeitos do alumínio em microrganismos são extremamente escassos. Neste estudo, entretanto, a microbiota não foi afetada pelos elevados níveis de alumínio, o que pode ser comprovado pela similaridade com as populações avaliadas em outros locais de amostragem.

Os microrganismos são a chave para os processos biogeoquímicos no solo. Portanto, é importante avaliar as propriedades físico-químicas do solo e como essas propriedades se relacionam com os diferentes perfis microbianos (PEIXOTO et al., 2010); as mudanças no solo afetam as populações microbianas nativas.

As variações sazonais na umidade e pH do solo podem levar a mudanças nos padrões de distribuição das espécies microbianas. Por exemplo, bactérias preferem condições neutras a alcalinas, ao passo que leveduras e fungos filamentosos preferem condições ácidas (BRESOLIN et al., 2010). A elevada acidez verificada nos solos do Cerrado é consistente com os resultados encontrados nos solos de cerrado descritos em outros estudos (PECZYNSKA-CZUCH; MORDARSKI, 1988; SCHWARZENBACH; ENKERL; WIDMER, 2007), o que, provavelmente, se deve à presença das populações vegetativas e microbianas características.

O Cerrado brasileiro abrange uma vasta área, representando cerca de 25% do território brasileiro (BAFANA et al., 2010). Apesar do baixo valor de pH (~5,0), elevada quantidade de alumínio e de ferro, e baixo teor de nutrientes, esses solos são amplamente utilizados na agricultura e, além disso, em um dos poucos estudos com a microbiota destes solos foi relatado elevado número de actinobactérias (COELHO; DROSDOWICZ, 1978).

Tabela 3 Características químicas e físicas das amostras de solo do Cerrado brasileiro

Amostras	pH	P mg/dm <sup>3</sup>	K mg/dm <sup>3</sup>	Mg mg/dm <sup>3</sup>	Al mg/dm <sup>3</sup>	H+Al Cmol/dm <sup>3</sup>	MO dag/Kg	SB mg/dm <sup>3</sup>	Textura	
PA	Ponto 1	5,3±0,1a	1,5±0,1a	25±1a	0,1±0,0a	0,6±0,1a	3,6±0,1a	1,4±0,1a	0,3±0,1a	Arenoso
	Ponto 2	5,4±0,1a	1,5±0,1a	56±2a	0,1±0,0a	0,6±0,1a	4,5±0,1a	2,0±0,1a	0,4±0,1a	Média
	Ponto 3	5,5±0,1a	1,2±0,1a	33±1a	0,2±0,0a	0,4±0,1a	2,6±0,1a	1,1±0,1a	0,3±0,1a	Média
	Ponto 4	5,5±0,1a	1,0±0,1a	70±1b	0,1±0,0a	0,5±0,1a	3,6±0,1a	1,5±0,1a	0,5±0,1a	Média
	Ponto 5	5,4±0,1a	0,7±0,1a	9±1b	0,1±0,0a	0,1±0,1a	1,7±0,1a	0,4±0,1b	0,2±0,1a	Média
LU	Ponto 6	5,4±0,1a	1,2±0,1a	28±1a	0,2±0,0a	0,5±0,1a	7,9±0,1a	3,4±0,1a	0,3±0,1a	Argilosa
	Ponto 7	5,0±0,1a	1,5±0,1a	20±1a	0,1±0,0a	0,5±0,1a	7,9±0,1a	2,6±0,1a	0,3±0,1a	Argilosa
	Ponto 8	5,1±0,1a	1,2±0,1a	11±1b	0,2±0,0a	0,3±0,1a	2,6±0,1a	1,1±0,1a	0,2±0,1a	Arenoso
	Ponto 9	5,2±0,1a	2,0±0,1a	20±1a	0,1±0,0a	0,9±0,2a	7,0±0,1a	2,4±0,1a	0,3±0,1a	Média
	Ponto 10	5,1±0,1a	1,5±0,1a	34±1a	0,1±0,0a	0,8±0,1a	8,8±0,3b	2,7±0,1a	0,3±0,1a	Argilosa
AC	Ponto 11	5,0±0,1a	1,2±0,1a	48±1a	0,1±0,0a	0,6±0,1a	4,0±0,1a	1,6±0,1a	0,7±0,1a	Argilosa
	Ponto 12	4,6±0,1a	0,7±0,1a	39±1a	0,1±0,0a	1,0±0,1a	6,3±0,1a	2,0±0,1a	0,3±0,1a	Argilosa
	Ponto 13	4,1±0,1a	1,8±0,1a	27±1a	0,3±0,0a	2,1±0,1b	15,3±1b	3,4±0,1a	0,3±0,1a	Argilosa
	Ponto 14	4,1±0,1a	1,8±0,1a	33±1a	0,1±0,0a	2,4±0,1b	17,1±2b	4,0±0,1a	0,3±0,1a	Argilosa
	Ponto 15	5,0±0,1a	1,8±0,1a	69±2b	0,1±0,0a	1,8±0,1b	12,3±1b	2,7±0,1a	0,4±0,1a	Argilosa

Médias dos valores duplicados±desvio padrão. Letras distintas indicam diferenças significativas (P<0,05)

Abreviações: PA - Passos; LU - Luminárias; AR – Arcos; MO – matéria orgânica; SB – soma de bases trocáveis (Ca, Mg, Na e K)

### 3.2 Isolamento e caracterização microbiológica

Ambos os meios de cultura testados (Aaronsons's e vitamina-ácido húmico) foram eficientes para o crescimento de actinobactérias presentes em todas as amostras de solo, sobressaindo-se o meio Aaronsons's (Tabela 4).

Table 4 Densidade populacional de actinobactéria em log UFC/g de solo, em diferentes meios

	Meio Aaronsons's	Meio vitamina-ácido húmico
Arcos	9,1±0,2 <sup>a</sup>	7,2±0,1 <sup>b</sup>
Luminárias	8,9±0,2 <sup>a</sup>	7,1±0,1 <sup>b</sup>
Passos	8,8±0,1 <sup>a</sup>	7,2±0,2 <sup>b</sup>

Médias dos valores duplicados±desvio padrão. Letras distintas indicam diferenças significativas (P<0,05)

O meio de cultura vitamina-ácido húmico é mais indicado para o isolamento de bactérias filamentosas e, como a composição nutricional de ambos os meios é bastante variável, justificam-se as diferenças nas densidades populacionais observadas. O ácido húmico é um composto formado por estruturas aromáticas, com porções de cadeias alifáticas estáveis, unidas por pontes de hidrogênio, contendo grupos carboxílicos, carbonilas, fenílicos, alcoólicos e hidroquinonas, entre outros, enquanto a caseína, que é a fonte de carbono do meio Aaronsons's, é uma proteína de mais fácil hidrólise, fato que, provavelmente, favoreceu a maior densidade populacional observada no segundo meio citado (SILVA FILHO; SILVA, 2002).

Huddleston et al. (1997) encontraram uma população cultivável de *Streptomyces* de, aproximadamente, 8,0 log UFC/g no solo. Em estudos anteriores, o número de isolados de actinobactérias desses solos foi da mesma ordem de magnitude (~8,8 log UFC/g de solo), semelhantemente ao número de



isolados na região avaliada neste estudo. Estes resultados sugerem que o solo do Cerrado representa um vasto potencial, pouco explorado, para o isolamento de actinobactérias.

Os solos tropicais contêm inúmeros micro-habitats pouco explorados microbiologicamente. Segundo Zucchi, Guidolin e Cònsoli (2011), das 16.013 novas espécies de fungos descritas ao longo do período de dez anos (de 1981 to 1990), 49% eram de países tropicais. Esta observação pode ser estendida a outros grupos microbianos, incluindo actinobactérias, para os quais não há estatísticas disponíveis em relação aos solos tropicais brasileiros.

Um total de 1.432 isolados foi caracterizado e os isolados de cada região foram submetidos a análises para agrupamento. Os isolados de cada região (188) foram caracterizados por Rep-PCR e 78 diferentes perfis de bandas foram obtidos (Figura 3).

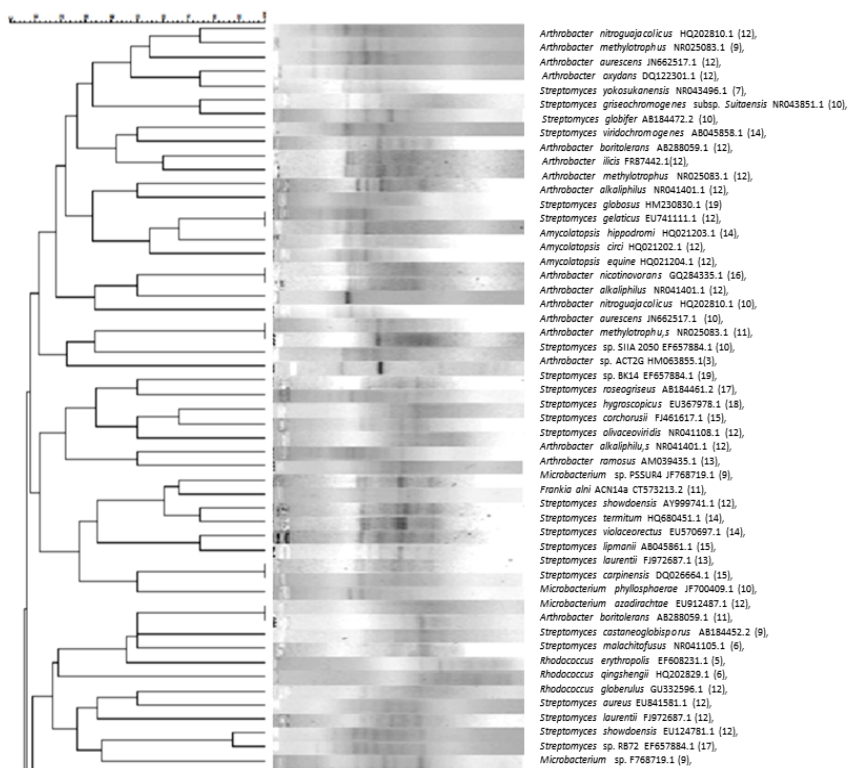
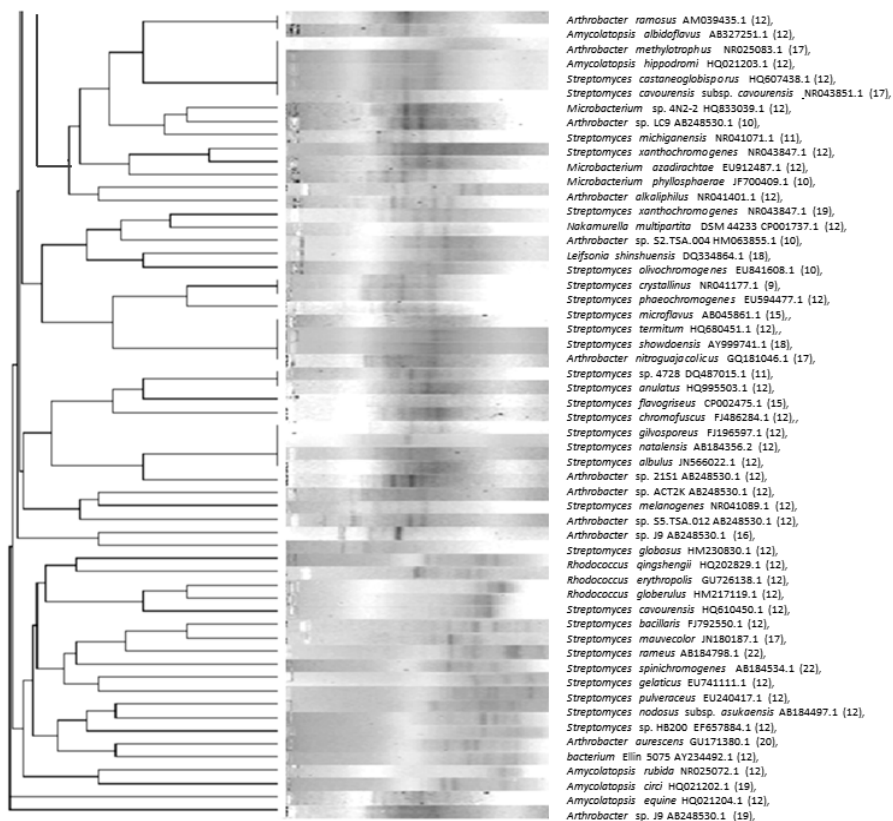


Figura 3 Análises de similaridade entre os perfis de bandas (Rep-PCR) dos isolados de actinobactérias dos solos do Cerrado brasileiro de três regiões: Arcos, Passos e Luminárias, MG.

(...continua...)



### 3.3 Identificação e distribuição dos isolados

As análises dos produtos de amplificação da sequência do gene 16S rRNA levaram à identificação de nove gêneros de actinobactérias (*Streptomyces*, *Arthrobacter*, *Rhodococcus*, *Amycolatopsis*, *Microbacterium*, *Frankia*, *Leifsonia*, *Nakamurella* e *Kitasatospora*) e 92 espécies distintas dentro dos gêneros (Figura 3 e Tabela 5).

Os gêneros *Streptomyces*, *Arthrobacter*, *Rhodococcus*, *Amycolatopsis* e *Microbacterium* foram encontrados em todas as regiões avaliadas. *Leifsonia*,

*Nakamurella* e *Kitasatospora* foram encontrados apenas na região de Arcos e o gênero *Frankia* foi encontrado apenas na região de Luminárias (Tabela 5).

As actinobactérias são bactérias gram-positivas, morfológica e fisiologicamente muito diversas, com elevado conteúdo de GC em seu DNA, representando um dos principais filos dentro de domínio Bacteria; são colonizadoras dominantes no solo, onde produzem muitas enzimas para a degradação de macromoléculas, como lignina, celulose, quitina e, parcialmente, amido. Portanto, as actinobactérias são encontradas frequentemente em locais onde materiais orgânicos são degradados (BRESOLIN et al., 2010), o que pode explicar a elevada presença de actinobactérias nos solos do Cerrado brasileiro.

Na natureza, as actinobactérias desempenham papel importante no ciclo de compostos orgânicos, estando também associadas com a produção de matéria orgânica do solo, devido à produção de pigmentos escuros chamados melanina, que estão relacionados, em certos aspectos, com o solo ácido húmico (BRESOLIN et al., 2010; PECZYNSKA-CZOCH; MORDARSKI, 19885).

Na presente pesquisa, os solos estudados foram caracterizados como sendo especialmente ricos no gênero *Streptomyces*, assim como em outros tipos de solos em todo o mundo. O gênero *Streptomyces* tem sido foco de pesquisas devido à aplicabilidade comercial de substâncias produzidas (SKARBEEK; BRADY, 1978).

Membros do gênero *Arthrobacter* estão amplamente distribuídos nos ecossistemas e podem ser isolados de diversos ambientes, como o ar, a água (doce e salgada), o solo, o óleo, as folhas de tabaco, a pele humana e o lodo ativado, e são capazes de degradar poluentes e xenobióticos (BAFANA et al., 2010).

As espécies do gênero *Microbacterium* podem ser isoladas do ar, do solo, da água, dos fungos, dos vegetais e dos humanos, sendo que muitas

espécies também desempenham importante papel na saúde humana, na indústria, na agricultura e em processos biotecnológicos (LIN et al., 2012).

De modo geral, as espécies identificadas neste estudo têm sido previamente mencionadas como importantes para aplicações biotecnológicas. Estudos têm sido conduzidos para a produção de compostos bioativos a partir de fermentações de actinobactérias sobre diferentes substratos.

Tabela 5 Diversidade de actinobactérias em diferentes regiões do Cerrado de Minas Gerais, Brasil, na estação de alta pluviosidade

Região	Total	Actinobactéria
Passos	153	<i>Arthrobacter nitroguajacolicus</i> HQ202810.1(12), <i>Arthrobacter methylotrophus</i> NR025083.1(9), <i>Arthrobacter aurescens</i> JN662517.1(12), <i>Arthrobacter oxydans</i> DQ122301.1(12), <i>Streptomyces yokosukanensis</i> NR043496.1(7), <i>Streptomyces griseochromogenes</i> subsp. <i>suitaensis</i> NR043851.1(10), <i>Streptomyces globifer</i> AB184472.2(10), <i>Streptomyces viridochromogenes</i> AB045858.1(14), <i>Arthrobacter boritolterans</i> AB288059.1(12), <i>Arthrobacter ilicis</i> FR87442.1(12), <i>Arthrobacter methylotrophus</i> NR025083.1(12), <i>Arthrobacter alkaliphilus</i> NR041401.1(12), <i>Streptomyces globosus</i> HM230830.1(19).
Luminárias	414	<i>Streptomyces gelaticus</i> EU741111.1(12), <i>Amycolatopsis hippodromi</i> HQ021203.1(14), <i>Amycolatopsis circi</i> HQ021202.1(12), <i>Amycolatopsis equine</i> HQ021204.1(12), <i>Arthrobacter nicotinovorans</i> GQ284335.1(16), <i>Arthrobacter alkaliphilus</i> NR041401.1(12), <i>Arthrobacter nitroguajacolicus</i> HQ202810.1(10), <i>Arthrobacter aurescens</i> JN662517.1(10), <i>Arthrobacter methylotrophus</i> NR025083.1(11), <i>Streptomyces</i> sp. SIIA 2050 EF657884.1(10), <i>Arthrobacter</i> sp. ACT2G HM063855.1(3), <i>Streptomyces</i> sp. BK14 EF657884.1(19), <i>Streptomyces roseogriseus</i> AB184461.2(17), <i>Streptomyces hygrosopicus</i> EU367978.1(18), <i>Streptomyces corchorusii</i> FJ461617.1(15), <i>Streptomyces olivaceoviridis</i> NR041108.1(12), <i>Arthrobacter alkaliphilus</i> NR041401.1(12), <i>Arthrobacter ramosus</i> AM039435.1(13), <i>Microbacterium</i> sp. PSSUR4 JF768719.1 (9), <i>Frankia alni</i> ACN14a CT573213.2 (11), <i>Streptomyces showdoensis</i> AY999741.1(12), <i>Streptomyces termitum</i> HQ680451.1(14), <i>Streptomyces violaceorectus</i> EU570697.1(14), <i>Streptomyces lipmanii</i> AB045861.1(15), <i>Streptomyces laurentii</i> FJ972687.1(13), <i>Streptomyces carpinensis</i> DQ026664.1(15), <i>Microbacterium phyllosphaerae</i> JF700409.1(10), <i>Microbacterium azadirachtae</i> EU912487.1(12), <i>Arthrobacter boritolterans</i> AB288059.1(11), <i>Streptomyces castaneoglobisporus</i> AB184452.2(9), <i>Streptomyces malachitofusus</i> NR041105.1(6), <i>Rhodococcus erythropolis</i> EF608231.1(5), <i>Rhodococcus qingshengii</i> HQ202829.1(6), <i>Rhodococcus globerulus</i> GU332596.1(12), <i>Streptomyces aureus</i> EU841581.1(12).
Arcos	865	<i>Arthrobacter ramosus</i> AM039435.1(12), <i>Amycolatopsis albidoflavus</i> AB327251.1(12), <i>Arthrobacter methylotrophus</i> NR025083.1(17), <i>Amycolatopsis hippodromi</i> HQ021203.1(12), <i>Streptomyces castaneoglobisporus</i> HQ607438.1(12), NR043851.1(17), <i>Microbacterium</i> sp. 4N2-2 HQ833039.1 (12), <i>Arthrobacter</i> sp. LC9 AB248530.1 (10), <i>Streptomyces michiganensis</i> NR041071.1(11), <i>Streptomyces xanthochromogenes</i> NR043384.1(12), <i>Microbacterium azadirachtae</i> EU912487.1 (12), <i>Microbacterium phyllosphaerae</i> JF700409.1 (10), <i>Arthrobacter alkaliphilus</i> NR041401.1 (12), <i>Streptomyces xanthochromogenes</i> NR043847.1(19), <i>Nakamurella multipartita</i> DSM 44233 CP001737.1 (12), <i>Arthrobacter</i> sp. S2.TSA.004 HM063855.1 (10), <i>Leifsonia shinshuensis</i> DQ334864.1(18), <i>Streptomyces olivochromogenes</i> EU841608.1 (10), <i>Streptomyces crystallinus</i> NR041177.1(9), <i>Streptomyces phaeochromogenes</i> EU594477.1(12), <i>Streptomyces microflavus</i> AB045861.1(15), <i>Streptomyces termitum</i> HQ680451.1(12), <i>Streptomyces showdoensis</i> AY999741.1(18), <i>Arthrobacter nitroguajacolicus</i> GQ181046.1(17), <i>Streptomyces</i> sp. 4728 DQ487015.1 (11), <i>Streptomyces anulatus</i> HQ995503.1(12), <i>Streptomyces flavogriseus</i> CP002475.1(15), <i>Streptomyces chromofuscus</i> FJ486284.1(12), <i>Streptomyces gilvosporeus</i> FJ196597.1(12), <i>Streptomyces natalensis</i> AB184356.2(12), <i>Streptomyces albulus</i> JN566022.1(12), <i>Arthrobacter</i> sp.21S1 AB248530.1 (12), <i>Arthrobacter</i> sp.ACT2K AB248530.1 (12), <i>Streptomyces melanogenes</i> NR041089.1(12), <i>Arthrobacter</i> sp.S5.TSA.012 AB248530.1 (12), <i>Arthrobacter</i> sp.J9 AB248530.1 (16), <i>Streptomyces globosus</i> HM230830.1(12), <i>Rhodococcus qingshengii</i> HQ202829.1(12), <i>Rhodococcus erythropolis</i> GU726138.1(12), <i>Rhodococcus globerulus</i> HM217119.1(12), <i>Streptomyces cavourensis</i> HQ610450.1(12), <i>Streptomyces bacillaris</i> FJ792550.1(12), <i>Streptomyces mauvecolor</i> JN180187.1(17), <i>Streptomyces rameus</i> AB184798.1(22), <i>Streptomyces spinichromogenes</i> AB184534.1(22), <i>Streptomyces gelaticus</i> EU741111.1(12), <i>Streptomyces pulveraceus</i> EU240417.1(12), <i>Streptomyces nodosus</i> subsp. <i>asukaensis</i> AB184497.1(12), <i>Streptomyces</i> sp. HB200 EF657884.1 (12), <i>Arthrobacter aurescens</i> GU171380.1(20), <i>bacterium</i> Ellin 5075 AY234492.1 (12), <i>Amycolatopsis rubida</i> NR025072.1(12), <i>Amycolatopsis circi</i> HQ021202.1(19), <i>Amycolatopsis equine</i> HQ021204.1(12), <i>Streptomyces laurentii</i> FJ972687.1(12), <i>Streptomyces showdoensis</i> EU124781.1 (12), <i>Streptomyces</i> sp. RB72 EF657884.1 (17), <i>Streptomyces xanthocidicus</i> NR043370.1(12), <i>Streptomyces tsukiyonensis</i> AB184594.1(14), <i>Kitasatospora kifunensis</i> AJ781341.1(12), <i>Streptomyces recifensis</i> HM062992.1(19)

## **Conclusão**

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que o solo do Cerrado mineiro é um ambiente rico em populações de actinobactérias, fato, provavelmente, favorecido pela umidade predominante na estação de coleta (chuvosa).

Os aspectos físicos, químicos e nutricionais, característicos de cada região, não afetaram de maneira significativa as comunidades microbianas presentes. Percebeu-se, contudo, influência dos meios de cultura na avaliação da densidade populacional.

Este estudo disponibiliza uma expressiva coleção de actinobactérias com potencial tecnológico para a pesquisa de produtos naturais, bem como contribui para a compreensão da microbiologia do solo, no que diz respeito à densidade populacional e à identificação de espécies de actinobactérias presentes nos solos do Cerrado mineiro.

## REFERÊNCIAS

BAFANA, A. et al. Heavy metal resistance in *Arthrobacter ramosus* strain G2 isolated from mercuric saltcontaminated soil. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 15, n. 1/3, p. 481-486, May 2010.

BRESOLIN, J. D et al. Structure and composition of bacterial and fungal community in soil under soybean monoculture in the Brazilian Cerrado. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 41, n. 2, p. 391-403, Apr./June 2010.

CASTRO, A. P. et al. Diversity of soil fungal communities of Cerrado and its closely surrounding agriculture fields. **Archives of Microbiology**, New York, v. 190, n. 2, p. 129-139, Aug. 2008.

COELHO, R. R. R.; DROZDOWICZ, A. The occurrence of actinomycetes in a Cerrado soil in Brazil. **Revue d'Ecologie et de Biologie du Sol**, Paris, v. 15, p. 459-473, 1978.

GARG, R. P.; PARRY, R. J. Regulation of valanimycin biosynthesis in *Streptomyces viridifaciens*: characterization of VImI as a *Streptomyces* antibiotic regulatory protein. **Microbiology**, New York, v. 156, n. 2, p. 472-483, Nov. 2010.

GOMES, R. C. et al. Elemental, functional group and infrared spectroscopic analysis of actinomycete melanins from Brazilian soils. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 21, n. 1/2, p. 84-88, May 1996.

HAYAKAWA, M.; NANOMURA, H. Humic acid-vitamin agar, a new médium for the selective isolation of soil actinomycetes. **Journal of Fermentation Technology**, Osaka, v. 65, n. 5, p. 501-509, 1987.

HUDDLESTON, A. et al. Molecular detection of streptomycin producing *Streptomyces* in Brazilian soils. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, n. 4, p. 1288-1297, Apr. 1997.



LIMA, A. S. et al. Nitrogen-fixing bacteria communities occurring in soils under different uses in the Western Amazon Region as indicated by nodulation of siratro (*Macropodium artropurpureum*). **Plant and Soil**, The Hague, v. 319, n. 1/2, p. 127-145, June 2009.

LIN, L. et al. The actinobacterium *Microbacterium* sp. 16SH accepts pBBR1-based pPROBE vectors, forms biofilms, invades roots, and fixes N<sub>2</sub> associated with micropropagated sugarcane plants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 93, n. 3, p. 1185-1195, 2012.

MIAO, V.; DAVIES, J. Actinobacteria: the good, the bad, and the ugly. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 98, p. 143-150, Apr. 2010.

MOHAPATRA, B. R.; BROERSMA, K.; MAZUMDER, A. Comparison of five rep-PCR genomic fingerprinting methods for differentiation of fecal *Escherichia coli* from humans, poultry and wild birds. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 277, n. 1, p. 98-106, Dec. 2007.

MOUTTA, R. de O. et al. Comparative response and structural characterization of sugarcane bagasse, straw and bagasse-straw 1:1 mixtures subjected to hydrothermal pretreatment and enzymatic conversion. **Microbial & Biochemical Technology**, Los Angeles, v. S12, 2013. Disponível em: <<http://www.omicsonline.org/1948-5948/JMBT-S12-005.php?aid=13195>>. Acesso em: 10 jan. 2014.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **Basic local alignment search tool**. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>>. Acesso em: 10 ago. 2013.

PECZYNSKA-CZOCH, W.; MORDARSKI, M. Actinomycetes enzymes. In: GOODFELLOW, M.; WILLIAMS, S. T.; MORDARSKI, M. (Ed.). **Actinomycetes in biotechnology**. London: Academic, 1988. p. 219-284.

PEIXOTO, R. S. et al. Decade of land use contributes to changes in chemistry, biochemistry and bacterial community structures of soils in the Cerrado.

**Antonie Van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 98, n. 3, p. 403-413, Oct. 2010.

PEREIRA, G. V. M. et al. A multiphasic approach for the identification of endophytic bacterial in strawberry fruit and their potential for plant growth promotion. **Microbial Ecology**, Ontario, v. 63, n. 2, p. 405-417, Feb. 2012.

RUGGIERO, P. G. C. et al. Soil-vegetation relationships in cerrado (Brazilian savanna) and semideciduous forest, Southeastern Brazil. **Plant Ecology**, Dordrecht, v. 160, n. 1, p. 1-16, May 2002.

SCHÄFER, J.; JÄCKEL, U.; KÄMPFER, P. Development of a new PCR primer system for selective amplification of Actinobacteria. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 311, n. 2, p. 103-112, Oct. 2010.

SCHATZ, A.; BUGIE, E.; WAKSMAN, S. A. Streptomycin, a substance exhibiting antibiotic activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, New York, v. 55, p. 66-69, 1944.

SCHWARZENBACH, K.; ENKERL, I. J.; WIDMER, F. Objective criteria to assess representativity of soil fungal community profiles. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 68, n. 2, p. 358-366, Feb. 2007.

SILVA, C. F. et al. Microbial diversity in a bagasse-based compost prepared for the production of *Agaricus brasiliensis*. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 40, n. 3, p. 590-600, Sept. 2009.

SILVA FILHO, A. V. da; SILVA, M. I. V. da. **Importância das substâncias húmicas para a agricultura**. Disponível em:

<<http://www.emepa.org.br/anais/volume2/av209.pdf>>. Acesso em: 10 mar. 2013.

SKARBEK, J. D.; BRADY, L. R. *Streptomyces cavourensis* sp. nov. (nom. rev.) and *Streptomyces cavourensis* subsp. *washingtonensis* subsp. nov., a chromomycin-producing subspecies. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Reading, v. 28, p. 45-53, 1978.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM INSTITUTE. **Sisvar**. Cary, 2005. Software.

VENTURA, M. et al. Genomics of actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 71, n. 3, p. 495-548, Sept. 2007.

ZUCCHI, T. D.; GUIDOLIN, A. S.; CÔNSOLI, F. L. Isolation and characterization of actinobacteria Ectosymbionts from *Acromyrmex subterraneus brunneus* (Hymenoptera, Formicidae). **Microbiology Research**, Rosemead, v. 166, n. 1, p. 68-76, Jan. 2011.

## ARTIGO 2

### **Otimização da produção de endoxilanase por *Streptomyces termitum* utilizando bagaço de cana-de-açúcar como substrato indutor**

Alenir Naves de Sales<sup>a</sup>, Angélica Cristina de Souza<sup>a</sup>, Disney Ribeiro Dias<sup>b\*</sup>,  
Rosane Freitas Schwan<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Biologia, <sup>b</sup>Departamento de Ciência dos Alimentos,  
Universidade Federal de Lavras (UFLA), Campus Universitário, 37200-000,  
Lavras, MG, Brazil.

## RESUMO

Isolados de actinobactérias, oriundos do solo do Cerrado brasileiro, foram avaliados quanto à capacidade de produção de enzimas dos complexos celulolítico e xilanolítico. Testes semiquantitativos preliminares, feitos em meio contendo CMC e xilana de madeira de faia, indicaram, dentre as 92 espécies avaliadas, 11 potenciais espécies produtoras de enzimas, todas pertencentes ao gênero *Streptomyces*. As espécies foram subsequentemente cultivadas nos mesmos substratos, em fermentação submersa e analisadas quanto à produção das enzimas endoglucanase,  $\alpha$ -glicosidase, endoxilanase e  $\alpha$ -xilosidase. Os melhores resultados foram obtidos na produção da enzima endoxilanase por *Streptomyces termitum*. Posteriormente, a estirpe foi cultivada em resíduos lignocelulósicos (bagaço e palha de cana-de-açúcar e casca de cacau) *in natura* e pré-tratados. Os resultados mostraram que o meio contendo bagaço de cana *in natura* foi o melhor resíduo indutor para a produção da enzima. Um modelo experimental foi, então, proposto, a fim de otimizar a produção da enzima no referido substrato, variando-se as concentrações de bagaço de cana, de extrato de levedura e do pH do meio de cultivo. A mais alta produção da enzima (25,8 vezes maior), quando comparada ao menor valor obtido em um dos ensaios, foi observada quando se associaram 2,75% de bagaço de cana e 1,0 g/L de extrato de levedura ao meio de cultivo alcalino (pH 9,7). A partir dos resultados obtidos, pode-se sugerir o uso da espécie *Streptomyces termitum* em processos biotecnológicos, devido à produção de endoxilanase em um meio de cultivo simples e econômico.

Palavras-chave: Actinobactérias. Solos brasileiros. Enzimas. Otimização.

## ABSTRACT

Actinobacteria isolates from the Brazilian Cerrado soil were evaluated for their ability to produce enzymes of cellulolytic and xylanolytic complex. Preliminary semi-quantitative tests, made containing CMC and beech wood xylan, indicated, among 92 species evaluated, 11 potential species producing enzymes, all belonging to the *Streptomyces* genus. The species were subsequently grown in the same substrates in submerged fermentation and analyzed for the enzymes production endoglucanase,  $\beta$ -glucosidase, endoxylanase and  $\beta$ -xylosidase. The best results were obtained in endoxylanase enzyme production by *Streptomyces termitum*. Subsequently, the strain was grown on lignocellulosic residues (bagasse and straw sugar cane and cocoa straw) *in natura* and pre-treated. The results showed that the medium containing sugar cane bagasse *in natura* was the best inducer residue for the enzyme production. An experimental model was then, proposed to optimize the production of the enzyme in said substrate, varying concentrations of sugar cane bagasse, yeast extract and pH from the medium culture. The highest enzyme production (25.8 times higher) compared to the lowest value obtained in one of the trials was observed when combining 2.75% sugar cane bagasse and 1.0 g/L of yeast extract to the medium culture alkaline (pH 9.7). From the results obtained may suggest the use of *Streptomyces termitum* species in biotechnological processes, due to production of endoxylanase in a medium culture simple and economical.

Keywords: Actinobacteria. Brazilian soils. Enzymes. Optimization.

## 1 INTRODUÇÃO

Dentre os biomas brasileiros, o Cerrado, que apresenta cobertura vegetal semelhante ao das savanas africanas, abrange uma área de cerca de 25% do território nacional. Os solos do Cerrado apresentam características ambientais especiais, abrigando populações de actinobactérias que constituem excelente fonte para a pesquisa de novas enzimas. Entretanto, apesar de sua potencialidade biotecnológica, a microbiota de seus solos tem sido pouco explorada (AGUIAR; CAMARGO, 2004; GOMES et al., 2000).

Abundantemente encontradas no solo, as actinobactérias são bactérias filamentosas gram-positivas, destacando-se entre os procariotos por sua importância econômica e biotecnológica. Elas são responsáveis pela produção de cerca da metade dos metabólitos secundários bioativos descobertos, notavelmente enzimas (VENTURA, 2007).

Muitas espécies de actinobactérias têm sido utilizadas em processos industriais e ambientais, como a produção de antibióticos, a biorremediação, a destruição de xenobióticos tóxicos, a produção de vitaminas e, mais recentemente, a conversão da biomassa lignocelulósica em bioetanol (MIAO; DAVIES, 2010).

O gênero *Streptomyces*, em particular, que compreende bactérias miceliais, amplamente presentes no solo, é bem conhecido como produtor de muitas enzimas extracelulares, incluindo aquelas envolvidas na degradação da celulose, hemicelulose e lignina, os três maiores polímeros da parede celular vegetal (GUPTA et al., 1995; NASCIMENTO et al., 2009).

A celulose (30%–45% m/m) é um polímero linear composto de apenas um tipo de carboidrato, glicose, unida por ligações glicosídicas  $\beta$ -1-4. A hidrólise eficiente da celulose requer a ação cooperativa de endoglucanases

(E.C. 3.2.1.6), que hidrolisam internamente o polímero de celulose, expondo as extremidades redutoras e não redutoras, e exoglucanases ou celobio-hidrolases (E.C. 3.2.1.91), que atuam sobre as extremidades redutoras e não redutoras, liberando celobiose e celooligossacarídeos (SOETAERT; VANDAMME, 2009).

A hidrólise da celulose é finalizada pela ação de  $\beta$ -glicosidasas (E.C. 3.2.1.21), que clivam a celobiose, liberando duas moléculas de glicose como produto final (SOETAERT; VANDAMME, 2009).

Hemicelulose (25%–45% m/m) é um nome coletivo para um grupo de heteropolissacarídeos ramificados, sendo a xilana o principal componente. As xilanas são polímeros de xilopiranoses unidos por ligações  $\beta$ -1-4, com um grau de polimerização variando de 70 a 200 (TUNCER et al., 2004). Elas incluem vários grupos laterais, como L-arabinose, D-galactose, acetil, feruloil,  $\rho$ -coumaroil e resíduo ácido glucurônico. Dependendo de sua conformação química, a xilana pode ser utilizada para várias finalidades, tais como xilana polimérica (como adesivos e emulsificantes), arabino-xilo-oligossacarídeos (como prebióticos), enquanto a xilose monomérica pode ser fermentada a etanol por algumas espécies de leveduras (PENG et al., 2009).

Dentre os vários métodos utilizados para a hidrólise da xilana (por exemplo, a hidrólise ácida), o que utiliza a xilanase é um dos mais ambientalmente corretos. As xilanases também têm atraído interesse devido às suas amplas aplicações no branqueamento de celulose, na produção de bioetanol e na produção de oligossacarídeos (KUMAR, 2012).

A produção industrial dessas enzimas, no entanto, é, geralmente, limitada pelo custo do substrato utilizado para o cultivo dos microrganismos (SÁNCHEZ, 2009). A utilização de resíduos agroindustriais, como componentes do meio de crescimento microbiano, pode representar uma redução nos custos da produção de importantes enzimas, além de proporcionar vantagens ambientais pela retirada desses resíduos do meio ambiente (TECHAPUN et al., 2003).

No Brasil, desde 1986, vários projetos de pesquisa vêm sendo desenvolvidos para agregar valor a produtos e a subprodutos agrícolas tropicais devido à geração de grande quantidade de resíduos. A produção de cana-de-açúcar, por exemplo, estimada em 652.015,9 milhões de toneladas em 2013, leva a considerável acúmulo de subprodutos, principalmente de palha, folhas frescas e de bagaço (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2013; SOCCOL; VANDENBERGHE, 2003).

Neste contexto, a presente pesquisa foi realizada com o objetivo de avaliar o potencial xilanolítico e celulolítico de actinobactérias isoladas do solo do cerrado brasileiro, cultivadas em resíduos lignocelulósicos. Um modelo experimental foi proposto para otimizar a produção de endoxilanase por *Streptomyces termitum* em diferentes concentrações de bagaço de cana-de-açúcar e extrato de leveduras e diferentes valores de pH.



## **2 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Microrganismos e condições de cultivo**

Actinobactérias foram isoladas do solo nativo do Cerrado brasileiro nos municípios de Arcos, Passos e Luminárias (estado de Minas Gerais, Brasil), nas estações de baixa e alta pluviosidade (SILVA et al., 2013).

As actinobactérias identificadas nesse trabalho (92 espécies) foram preservadas em criotubos contendo caldo nutriente, acrescido de glicerol 20% (v/v) a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  e, posteriormente, transferidas para placas de Petri contendo meio de Tuncer et al. (1999), suplementado com 1% de glicose para a realização de testes de atividade enzimática. O meio foi composto por 0,6% (m/v) de extrato de levedura, 0,01% (m/v) de sulfato de amônio, 0,03% (m/v) de cloreto de sódio, 0,01% (m/v) de sulfato de magnésio, 0,002% (m/v) de carbonato de cálcio e 1 mL de solução de elementos-traço (0,1% (m/v) de sulfato ferroso, 0,09% (m/v) de sulfato de zinco e 0,02% (m/v) de sulfato de manganês, pH 8,0).

### **2.2. Seleção de actinobactérias produtoras de celulase e xilanase**

Dentre as actinobactérias identificadas, foram selecionadas potenciais cepas produtoras de celulases e xilanases, por meio de testes semiquantitativos em placas de Petri contendo meio de Tuncer et al. (1999), suplementado com 1% de carboximetilcelulose (CMC) e 1% de xilana de madeira de faia (Merck, SP, Brasil), respectivamente. Os isolados foram inoculados em triplicata, com agulha em “picada” e as placas foram incubadas, a  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ , por 7 dias.

Após o período de incubação, as placas foram coradas com solução de iodo (2,0 g de KI e 1,0 g de iodo, em 300 mL água destilada), por 3 a 5 minutos, para identificar os isolados produtores de enzimas (KASANA et al., 2008). A

evidência da hidrólise da carboximetilcelulose e da xilana foi a formação de um halo de coloração clara ao redor da colônia.

A atividade enzimática semiquantitativa foi estratificada por meio da relação entre o diâmetro médio do halo de degradação e o diâmetro médio da colônia, expresso como índice enzimático de atividade (IE).

### **2.3 Avaliação da atividade enzimática em substratos puros**

A partir dos resultados dos testes semiquantitativos, foram selecionadas, dentre os 92 isolados, onze espécies de actinobactérias, todas pertencentes ao gênero *Streptomyces*, para testes de atividade enzimática em fermentação submersa (SmF), utilizando CMC e xilana de madeira de faia como fontes de carbono.

Os inóculos foram preparados de acordo com Hopwood et al. (1985), a partir do crescimento dos isolados em meio de Tuncer et al. (1999), suplementado com 1% de glicose, a 28 °C, durante dez dias. Após esse período, adicionou-se, a cada placa, água destilada estéril e procedeu-se à raspagem das mesmas, para a retirada das células e dos esporos.

Inoculou-se uma concentração final de  $10^7$  UFC/mL, num volume de 10 mL de inóculo, em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 90 mL do meio de Tuncer et al. (1999), suplementado com carboximetilcelulose ou xilana de madeira de faia. O cultivo foi realizado em duplicata, em shaker orbital, a 150 rpm e 30 °C, por 13 dias, sendo as amostras coletadas nos dias 0, 2, 4, 7 e 13. As amostras coletadas foram congeladas para posterior determinação das atividades das enzimas endoglucanase,  $\alpha$ -glicosidase, endoxilanase e  $\alpha$ -xilosidase.

## 2.4 Avaliação da atividade enzimática em resíduos lignocelulósicos

A partir dos resultados obtidos por meio da triagem do melhor produtor de enzimas em substratos puros, procedeu-se ao cultivo do mesmo em substratos lignocelulósicos (casca de cacau, bagaço e palha de cana-de-açúcar), *in natura* e pré-tratados, a fim de verificar a influência desses resíduos na indução da produção enzimática, quando comparados com substratos puros (CMC e xilana).

### 2.4.1 Procedência e pré-tratamento dos resíduos lignocelulósicos

O bagaço e a palha de cana-de-açúcar foram obtidos em uma fazenda localizada em Itirapuan, município de Lavras, MG e a casca de cacau era proveniente das Fazendas Reunidas Vale do Juliana, Igrapiúna, BA. Os resíduos foram lavados com água, para a remoção de açúcares residuais, secos em estufa com circulação de ar, a 60 °C e cortados em partículas classificadas em peneiras de 20 mesh. Os resíduos processados foram embalados para posterior utilização.

A etapa de pré-tratamento dos materiais lignocelulósicos foi realizada no Instituto Nacional de Tecnologia (INT/RJ).

O pré-tratamento ácido foi conduzido em autoclave com frascos Erlenmeyer de 1.000 mL contendo 80 g de cada um dos materiais. Os ensaios foram conduzidos nas seguintes condições: 130 °C, solução de ácido sulfúrico 2,9% m/v e relação sólido:líquido 1:8 (m/v), por 30 minutos de reação.

Após o tempo reacional, foi realizada filtração a vácuo em filtro de porcelana, obtendo-se uma fração líquida e uma massa residual de sólidos (resíduo fibroso). As frações líquidas obtidas foram armazenadas a 4 °C. O resíduo fibroso, após várias lavagens com água, foi seco em estufa, a 65 °C, até massa constante.

As amostras lignocelulósicas *in natura* e pré-tratadas foram caracterizadas, quanto à sua composição química e ao teor de celulose,

hemicelulose, lignina e cinzas, de acordo com a metodologia do Laboratório Nacional de Energias Renováveis (NREL) (SLUITER et al., 2008).

#### **2.4.2 Avaliação da atividade enzimática de *Streptomyces termitum* em resíduos lignocelulósicos *in natura* e pré-tratados**

A espécie *Streptomyces termitum* foi selecionada para avaliação de sua atividade celulolítica e xilanolítica em resíduos lignocelulósicos. Para tanto, realizou-se um experimento em fermentação submersa (SmF) em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 90 mL do meio de Tuncer et al. (1999), utilizando casca de cacau, bagaço e palha de cana-de-açúcar, *in natura* e pré-tratados como fontes de carbono, na concentração de 1%. O controle foi feito a partir do cultivo do isolado em CMC e xilana, sendo todos os ensaios realizados em duplicata.

O inóculo foi preparado conforme descrito no item 2.3 e o meio foi inoculado com um volume de 10 mL, na concentração final de  $10^7$  UFC/mL. A produção de enzimas foi conduzida a 30 °C/10 dias, sob 150 rpm de agitação orbital.

Amostras foram coletadas em intervalos de 48 horas e congeladas para a posterior determinação da atividade enzimática de endoglucanase e endoxilanase.

#### **2.5 Otimização da produção de endoxilanase por *Streptomyces termitum***

A otimização da produção da enzima endoxilanase por *Streptomyces termitum* foi feita por meio da Metodologia de Superfície de Resposta (RSM), utilizando o bagaço de cana-de-açúcar *in natura* como substrato indutor.

O modelo experimental composto central rotacional (DCCR) com três repetições para o ponto central ( $n_0=3$ ) e  $\alpha=1,68$  foi utilizado. Realizaram-se 17 ensaios, sendo as variáveis independentes pH, concentração de bagaço de cana e concentração de extrato de levedura, cujos níveis investigados para cada parâmetro são apresentados na Tabela 1 e o delineamento experimental pode ser observado na Tabela 2. A variável resposta foi a atividade da enzima endoxilanase (Y1), a qual foi bastante expressiva em relação às demais enzimas avaliadas nos experimentos anteriores.

A análise de variância (ANOVA) foi utilizada para estimar os parâmetros estatísticos e o software Statistica (versão 7.0) da Stat Soft Inc., para a determinação dos coeficientes de regressão e análise gráfica.

A validação foi realizada com a repetição do experimento, em triplicata, nas condições preditas.

A preparação do inóculo foi realizada como nos experimentos anteriores. Inocularam-se  $10^7$  UFC/mL, num volume de 5 mL, em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 45 mL do meio base de Tuncer. Os frascos foram incubados em *shaker* orbital, a 150 rpm e a 30 °C, por oito dias e as amostras foram retiradas a cada 48 horas, para análise da atividade da enzima endoxilanase.

Tabela 1 Valores utilizados no DCCR para três fatores

Variáveis	Código	Níveis				
		-1,68	-1	0	+1	+1,68
pH	X <sub>1</sub>	5,5	6,35	7,6	8,85	9,7
Conc. substrato (%)	X <sub>2</sub>	0,5	1,41	2,75	4,09	5,0
Conc. extrato levedura (g/L)	X <sub>3</sub>	1,0	2,82	5,5	8,18	10,0

Tabela 2 Matriz do planejamento experimental composto central rotacional (DCCR)

Ensaio	pH $X_1$	Conc. substrato (%) $X_2$	Conc. extrato de levedura (g/L) $X_3$
1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1
3	-1	+1	-1
4	+1	+1	-1
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

## 2.6 Ensaio enzimáticos

A atividade de endoglucanase (CMCase),  $\beta$ -glicosidase, endoxilase e  $\beta$ -xilase foi determinada no sobrenadante livre de células, após centrifugação, a  $3.600 \times g$  a  $4^\circ C$ , por 10 minutos.

Uma unidade de atividade enzimática (U/mL) dos ensaios de endoglucanase e xilase foi definida como a quantidade de enzima necessária para a obtenção de 1  $\mu$ mol de glicose e/ou xilose liberado por minuto.

A liberação de açúcares redutores foi quantificada espectrofotometricamente, a 540 nm, pelo método do ácido dinitrossalicílico (MILLER, 1959).

Nos ensaios para a determinação da atividade de endoglucanase (CMCase), as reações contendo 250  $\mu$ L de solução de CMC 2% em tampão

citrato de sódio 50 mM, pH 4,8, com 250  $\mu$ L do sobrenadante enzimático, foram incubadas, a 50 °C, por 10 minutos. A reação foi finalizada com adição de 500  $\mu$ L DNS, segundo metodologia proposta por Ghose (1987), com modificações.

A quantificação de endoxilânase foi realizada incubando-se 50  $\mu$ L do sobrenadante enzimático e 100  $\mu$ L de xilana de madeira de faia 1% (em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5), a 50 °C, durante 10 minutos. A reação foi interrompida adicionando-se 300  $\mu$ L de DNS modificado por Bailey, Biely e Poutanem (1992).

As atividades de  $\beta$ -glicosidase e  $\beta$ -xilosidase foram determinadas utilizando-se p-nitrophenyl- $\beta$ -D-glucopyranoside (PNPG) e p-nitrophenyl- $\beta$ -dxilopyranoside (PNPX) como substrato, respectivamente. A reação contendo 200  $\mu$ L de tampão acetato de sódio 50 mM-pH 5, 650  $\mu$ L de água destilada, 50  $\mu$ L do sobrenadante enzimático e 100  $\mu$ L da de PNPG ou PNPX 10 mM foi incubada, a 45 °C, por 10 minutos. A reação foi finalizada adicionando-se 500  $\mu$ L de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1 M e a quantidade de p-nitrofenol foi medida espectrofotometricamente, a 405 nm. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para a obtenção de 1  $\mu$ mol de p-nitrofenol por minuto, sob as condições de ensaio.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Seleção de actinobactérias produtoras de celulase e xilanase

Dos 92 isolados de actinobactérias avaliados, 43 (46,7%) foram positivos para celulase e 49 (53,3%) foram positivos para xilanase (Figura 1).

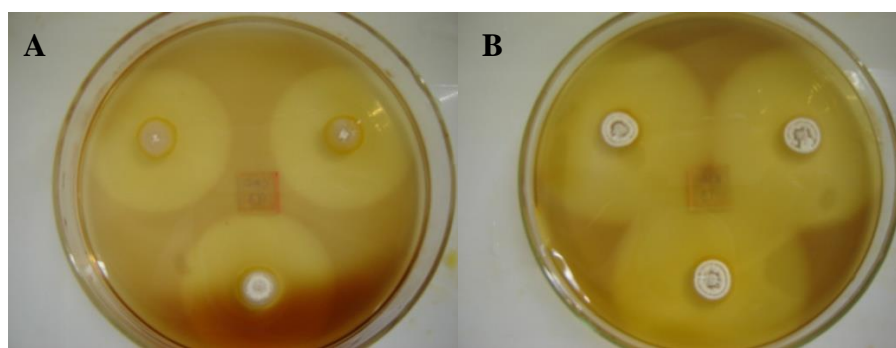


Figura 1 Placas com iodo para identificar atividade enzimática de actinobactérias produtoras de enzimas por meio do halo de degradação ao redor da colônia. A) meio ágar CMC; B) meio ágar xilana

Entre os isolados que apresentaram halo ao redor da colônia, 11 espécies do gênero *Streptomyces*, discriminadas na Tabela 3, se destacaram por apresentarem os maiores valores de índices enzimáticos de atividade, variando entre 3,4 a 6,0, para celulase e entre 4,8 a 8,4, para xilanase.



Tabela 3 Espécies de *Streptomyces* com maiores índices enzimáticos de atividade no teste semiquantitativo para a produção das enzimas celulase e xilanase, cultivadas em meio base de Tuncer et al. (1999)

CÓDIGO	ESPÉCIE
UFLA B ces 6	<i>Streptomyces castaneoglobisporus</i>
UFLA B ces 93	<i>Streptomyces termitum</i>
UFLA B ces 147	<i>Streptomyces globosus</i>
UFLA B ces 173	<i>Streptomyces pulveraceus</i>
UFLA B ces 253	<i>Streptomyces recifensis</i>
UFLA B ces 260	<i>Streptomyces gelaticus</i>
UFLA B ces 584	<i>Streptomyces showdoensis</i>
UFLA B ces 588	<i>Streptomyces carpinensis</i>
UFLA B ces 741	<i>Streptomyces aureus</i>
UFLA B ces 904	<i>Streptomyces crystallinus</i>
UFLA B ces 1179	<i>Streptomyces lucensis</i>

A habilidade em hidrolisar celulose e xilana, verificada na presente pesquisa, tem sido descrita em várias espécies do gênero *Streptomyces* (DING et al., 2004; NINAWA; KUHAD, 2005; QIU et al., 2010; TUNCER et al., 2004).

Na triagem realizada por El-Sersy et al. (2010), para actinobactérias produtoras de celulase, foram avaliadas seis espécies, sendo cinco pertencentes ao gênero *Streptomyces* e uma ao gênero *Nocardiopsis*, todas isoladas do ecossistema marinho. Após sete dias de incubação, todas as espécies de actinobactérias apresentaram sinais de crescimento em ágar CMC e demonstraram resultados positivos no teste com vermelho-congo, destacando-se a espécie *Streptomyces ruber* como a melhor produtora da enzima.

Resultados semelhantes foram encontrados por Kumar et al. (2012): das 57 actinobactérias isoladas do solo, 13 exibiram a capacidade de produzir a enzima xilanase, destacando-se a espécie *Streptomyces* sp. RCK-2010, com a maior zona de hidrólise em placas de ágar xilana, coradas com vermelho-congo.

### **3.2 Perfil enzimático do complexo celulolítico em substrato puro**

As onze espécies de actinobactérias do gênero *Streptomyces* (Tabela 3) previamente selecionadas por meio do índice enzimático de atividade foram submetidas a testes de atividade enzimática em fermentação submersa (SmF), por 13 dias, utilizando-se carboximetilcelulose (CMC) como fonte de carbono.

#### **3.2.1 Perfil de produção de 1,4- $\alpha$ -D-endoglucanase**

A atividade da enzima endoglucanase foi detectada em 9 das 11 espécies avaliadas, exceto *S. pulveraceus* e *S. crystallinus*. Em todos os casos em que foi detectada, a produção enzimática se iniciou a partir do quarto dia de cultivo, com um pico no sétimo dia, destacando-se a espécie *Streptomyces lucensis*, com produção de 0,196 U/mL, seguida por *S. globosus*, com 0,067 U/mL; nas espécies *S. termitum* e *S. castaneoglobisporus*, a produção foi de 0,056 e 0,055 U/mL, respectivamente (Figura 2).

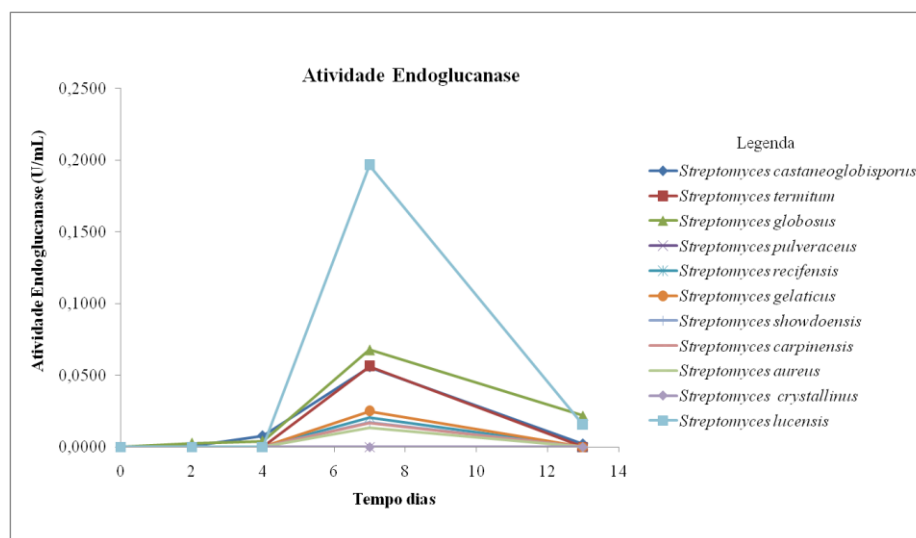


Figura 2 Atividade da enzima endoglucanase em espécies do gênero *Streptomyces* em testes de fermentação submersa, utilizando CMC como fonte de carbono, sob agitação de 150 rpm e temperatura de 30 °C, durante 13 dias

Valores encontrados na literatura para a atividade da enzima endoglucanase produzida por *Streptomyces* variam entre as espécies estudadas e as condições de cultivo. Tuncer et al. (2004) encontraram atividade de 1,73 U/mL em pesquisas com *Streptomyces* sp. F2621, enquanto Vinha et al. (2011) obtiveram 2,0 U/mL em condições otimizadas para a espécie *Streptomyces viridobrunneus* SCPE-09. Já Chellapandi e Himanshu (2008) relataram 11,9 U/mL de atividade máxima atingida em outra espécie do mesmo gênero.

Em algumas espécies de *Streptomyces* não tem sido detectada atividade de endoglucanase (*S. albus* ATCC3005, *S. chattanoogensis* CECT3336, *S. lividans*, *S. roseisclereoticum*, *Streptomyces* sp. QG-11-3, *S. viridosporus* T7A e *Streptomyces* sp.). Na espécie *S. cuspidosporus*, Mahesawari e Chandra (2000) constataram baixa produção da enzima (0,02 U/mL). Assim também, entre as espécies avaliadas neste trabalho, observou-se variação na produção da enzima

(0,000-0,196 U/mL), o que evidencia diferenças genéticas e fisiológicas entre elas.

### **3.2.2 Perfil de produção de $\alpha$ -glicosidase**

Nas condições experimentais utilizadas, a atividade da enzima  $\alpha$ -glicosidase não foi detectada em nenhuma das onze espécies avaliadas.

### **3.3 Enzimas do complexo xilanolítico**

As onze espécies de actinobactérias do gênero *Streptomyces*, previamente selecionadas por meio do índice enzimático de atividade, foram submetidas a testes de atividade enzimática em fermentação submersa (SmF), durante treze dias, utilizando xilana de madeira de faia como fonte de carbono.

#### **3.3.1 Perfil de produção de endoxilanase**

Na Figura 3 apresentam-se os resultados da produção da enzima endoxilanase. Nas espécies *S. pulveraceus*, *S. recifensis*, *S. gelaticus*, *S. lucensis* e *S. aureus*, a produção não foi detectada. Maior produção foi constatada na espécie *S. termitum* (6,57 U/mL), seguida de *S. showdoensis* (3,26 U/mL). O pico de produção enzimática de *S. termitum* ocorreu no sétimo dia de cultivo, enquanto em *S. showdoensis*, a mais alta produção ocorreu no quarto dia, verificando-se um declínio a partir de então.

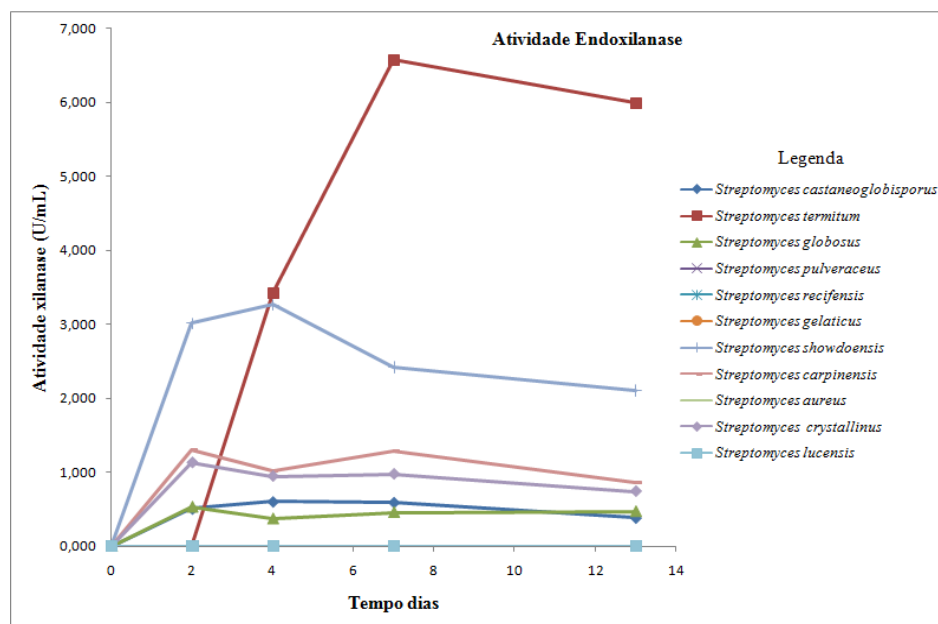


Figura 3 Atividade da enzima endoxilanase em espécies do gênero *Streptomyces*, em testes de fermentação submersa utilizando xilana de madeira de faia como fonte de carbono sob agitação de 150 rpm e temperatura de 30 °C, durante 13 dias

Comparada à produção de endoglucanase, a atividade de endoxilanase em substrato puro foi bastante expressiva. Porém, semelhantemente à primeira enzima, os valores observados na literatura para *Streptomyces* variam amplamente entre as espécies pesquisadas e as condições de cultivo, como, por exemplo, *S. albus* ATCC3005 (12 U/mL), *S. lividans* (1,05 U/mL), *S. roseisclereoticum* (16 U/mL), *S. viridosporus* T7A (8 U/mL) e *Streptomyces* sp. (0,0 U/mL). Tais valores são, portanto, compatíveis com aqueles obtidos no presente estudo, no qual *Streptomyces* cresceram em meio contendo xilana como fonte de carbono, como as espécies supracitadas.

Algumas espécies de *Streptomyces* têm sido classificadas como microrganismos produtores de xilanase livre de celulase (*S. albus* ATCC3005, *Streptomyces* sp. AB 106, *S. chattanoogensis* CECT3336, *S. lividans*, *S.*

*roseisclereoticum*, *Streptomyces* sp. QG-11-3, *S. viridosporus* T7A e *Streptomyces* sp). Outras espécies, como *S. cuspidosporus*, com atividade de celulase de 0,02 U/mL, são classificadas como microrganismos produtores de xilanase pobre em celulase (MAHESAWARI; CHANDRA, 2000; TECHAPUN et al., 2003); na segunda categoria mencionada, enquadram-se as espécies *S. termitum* e *S. showdoensis*, avaliadas neste estudo.

### **3.3.2 Perfil de produção de $\alpha$ -xilosidase**

Todas as espécies avaliadas produziram  $\alpha$ -xilosidase, sendo que em 7 espécies verificou-se um pico de produção da enzima no segundo dia de cultivo, com média de 0,24 U/mL. A espécie *S. globosus* produziu 0,57 U/mL no quarto dia de cultivo, enquanto *S. castaneoglobisporus* atingiu o valor de 0,50 U/mL no sétimo dia de cultivo, conforme se observa na Figura 4.

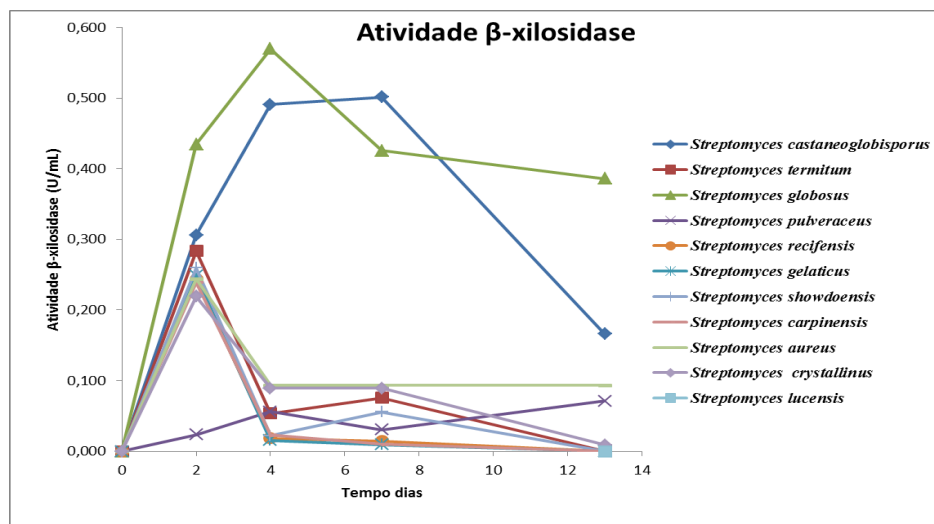


Figura 4 Atividade da enzima β-xilosidase em espécies do gênero *Streptomyces* em testes de fermentação submersa utilizando xilana de madeira de faia como fonte de carbono sob agitação de 150 rpm e temperatura de 30 °C, durante 13 dias de cultivo

A maior atividade de β-xilosidase (0,57 U/mL) foi muito baixa quando comparada ao maior valor obtido para endoxilânase (6,57 U/mL).

Flores et al. (1997) avaliaram a produção de β-xilosidase e endoxilânase em *Streptomyces* sp. CHM-1035 em meio mínimo contendo xilana de madeira de faia como fonte de carbono. A atividade foi avaliada em três tipos de locais: no filtrado, no micélio e em extratos celulares obtidos após sonicação. Os autores concluíram que a atividade da enzima β-xilosidase foi associada, principalmente, com o micélio, cuja produção aumentou durante as 12 primeiras horas de cultivo e, então, declinou; uma atividade quatro vezes menor foi obtida nos extratos após sonicação e atividade desprezível foi detectada no filtrado. O oposto foi verificado para a enzima endoxilânase que, segundo os autores, é mais comumente encontrada extracelularmente, havendo relatos de espécies de *Streptomyces* que produzem β-xilosidase intracelularmente.

Inferese, portanto, que as espécies avaliadas na presente pesquisa tenham mecanismos de produção enzimática semelhantes, o que justifica a diferença entre os valores obtidos, considerando-se que as análises foram realizadas no sobrenadante obtido durante o cultivo.

### 3.4 Avaliação da produção enzimática de endoglucanase e endoxilanase por *Streptomyces termitum* em resíduos lignocelulósicos

A espécie *S. termitum*, melhor produtora de endoxilanase em substrato puro, foi cultivada em resíduos lignocelulósicos (casca de cacau, bagaço e palha de cana-de-açúcar), *in natura* e pré-tratados, a fim de verificar a influência desses resíduos na indução da produção de enzimas celulolíticas e xilanolíticas.

#### 3.4.1 Composição química dos resíduos lignocelulósicos

A tabela 4 apresenta os resultados da composição química dos resíduos *in natura* e pré-tratados.

Tabela 4 Composição química da biomassa lignocelulósica *in natura* e pré-tratada % (w/v)

	<i>In natura</i>			Pré-tratado		
	Bagaço	Palha	C. cacau	Bagaço	Palha	C. cacau
<b>Celulose</b>	25,73	28,81	29,18	41,09	44,18	37,60
<b>Hemicel.</b>	21,83	30,11	22,43	6,36	3,66	3,43
<b>Lignina</b>	41,54	29,63	28,17	42,27	40,63	33,14
<b>Extrativos</b>	9,83	8,30	13,24	8,02	9,35	10,76
<b>Cinzas</b>	1,27	2,89	6,42	1,34	1,34	6,02
<b>Total</b>	100,20	99,74	99,44	99,09	99,15	91,05



Em todos os resíduos avaliados, observaram-se maiores teores de celulose após o pré-tratamento. Nos resíduos *in natura*, a casca de cacau apresentou maior teor de celulose (29,18%) em relação ao bagaço e à palha, diferentemente da casca de cacau pré-tratada, com menor percentual, 37,6. Destacam-se ainda os maiores teores de lignina em bagaço de cana, e de cinzas em casca de cacau, tanto *in natura* quanto pré-tratado.

O pré-tratamento reduziu os níveis de hemicelulose na biomassa do bagaço, da palha e da casca de cacau. Os resultados encontrados são semelhantes aos obtidos por Moutta et al., (2013), que evidenciaram, inclusive, a maior susceptibilidade da palha para o pré-tratamento, como ocorreu no presente trabalho.

#### **3.4.2 Perfil da produção de endoglucanase por *Streptomyces termitum* em resíduos lignocelulósicos**

A produção da enzima endoglucanase pela espécie *Streptomyces termitum*, nas condições experimentais utilizadas, não foi detectada em nenhum dos resíduos lignocelulósicos avaliados.

#### **3.4.3 Perfil da produção de endoxilanase por *Streptomyces termitum* em resíduos lignocelulósicos**

A espécie *S. termitum* demonstrou bom potencial enzimático para a produção da enzima endoxilanase nos resíduos lignocelulósicos avaliados, exceto em casca de cacau *in natura*. De maneira geral, a mais alta produção enzimática ocorreu no quarto dia de cultivo, tendo os melhores resultados sido obtidos nos resíduos bagaço e palha de cana *in natura*, com os respectivos valores de atividade enzimática de 0,046 e 0,044 U/mL (Figura 5).

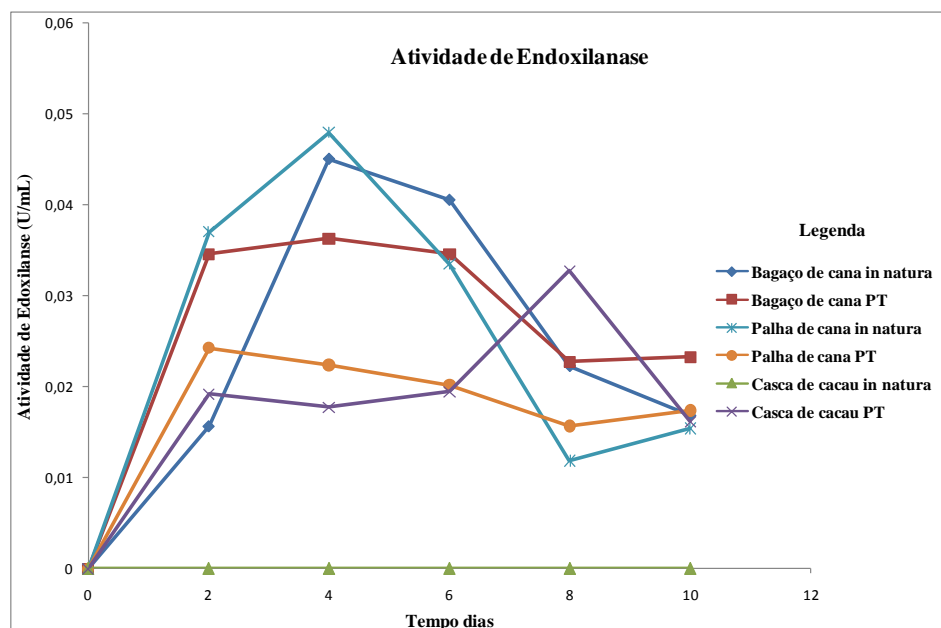


Figura 5 Atividade da enzima endoxilânase em *Streptomyces termitum* em testes de fermentação submersa, utilizando resíduos lignocelulósicos *in natura* e pré-tratados como fonte de carbono, sob agitação de 150 rpm e temperatura de 30 °C, durante 10 dias

O pré-tratamento tem como finalidade quebrar a estrutura da lignina e romper a estrutura cristalina da celulose, facilitando a acessibilidade de enzimas à celulose durante o processo de hidrólise (MOSIER et al., 2005).

Grigorevski-Lima et al. (2013) estudaram *Trichoderma atroviride* 676 para avaliar sua eficiência na produção de enzimas lignocelulíticas utilizando bagaço de cana *in natura* e pré-tratado com explosão a vapor. Os resultados obtidos mostraram que bagaço de cana *in natura* foi a melhor fonte de carbono para a produção de enzimas lignocelulolíticas, com destaque para um aumento de sete vezes na atividade de xilanase, quando comparado ao bagaço de cana pré-tratado. A atividade celulolítica foi praticamente a mesma em ambas as condições. Os autores supõem que a alta atividade de xilanase poderia ter sido responsável pela degradação da hemicelulose no bagaço *in natura*, tornando a

acessibilidade à celulose igual em ambos os substratos ou, ainda, no bagaço pré-tratado, a hemicelulose teria sido destruída e não poderia induzir a produção de xilanase em grandes quantidades.

No presente trabalho, observaram-se também, de maneira geral, melhores resultados quando se utilizaram os resíduos *in natura*, exceto em casca de cacau, ressaltando-se as diferenças na forma de pré-tratamento em ambos os trabalhos, bem como no tipo de microrganismo estudado. De qualquer forma, a opção pela modalidade de resíduo *in natura* para a produção de enzimas é a alternativa mais econômica e estrategicamente viável.

### **3.5 Otimização da produção de endoxilanase por *Streptomyces termitum* utilizando bagaço-de-cana-de-açúcar *in natura* como substrato indutor**

A fim de aumentar a produção da enzima endoxilanase em bagaço de cana *in natura*, um delineamento experimental foi, então, proposto. Na Tabela 5 apresentam-se os valores das variáveis independentes (pH, concentração de bagaço de cana-de-açúcar e concentração de extrato de levedura,  $X_1$ ,  $X_2$  e  $X_3$ , respectivamente) utilizados no DCCR e os valores observados e preditos pelo modelo matemático para a produção de endoxilanase por *S. termitum*.

Tabela 5 Valores das variáveis independentes (pH, conc. de substrato e conc. de extrato de levedura) utilizadas no DCCR, mostrando os valores observados e preditos pelo modelo matemático para a produção de endoxilanase por *S. termitum*

Ensaio	pH	Conc. substrato (%)	Conc. extrato de levedura (g/L)	Atividade de endoxilanase (U/mL)	Atividade de endoxilanase (U/mL)
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	O	P
1	-1(6,35)	-1(1,41)	-1(2,82)	0,201	0,184
2	+1(8,85)	-1(1,41)	-1(2,82)	0,182	0,184
3	-1(6,35)	+1(4,09)	-1(2,82)	0,076	0,184
4	+1(8,85)	+1(4,09)	-1(2,82)	0,173	0,184
5	-1(6,35)	-1(1,41)	+1(8,18)	0,040	0,000
6	+1(8,85)	-1(1,41)	+1(8,18)	0,041	0,000
7	-1(6,35)	+1(4,09)	+1(8,18)	0,088	0,000
8	+1(8,85)	+1(4,09)	+1(8,18)	0,104	0,000
9	-1,68(5,5)	0 (2,75)	0 (5,5)	0,107	0,147
10	+1,68(9,7)	0 (2,75)	0 (5,5)	0,159	0,147
11	0 (7,6)	-1,68(0,5)	0 (5,5)	0,018	0,000
12	0 (7,6)	+1,68(5,0)	0 (5,5)	0,015	0,000
13	0 (7,6)	0 (2,75)	-1,68(1,0)	0,387	0,371
14	0 (7,6)	0 (2,75)	+1,68(10,0)	0,060	0,000
15	0 (7,6)	0 (2,75)	0 (5,5)	0,121	0,147
16	0 (7,6)	0 (2,75)	0 (5,5)	0,146	0,147
17	0 (7,6)	0 (2,75)	0 (5,5)	0,173	0,147

O modelo foi testado pela ANOVA (Tabela 6). Para as variáveis concentrações de bagaço de cana e de extrato de levedura, os valores de F calculado indicam que o modelo foi significativo, a 95% de confiança. A variável concentração de bagaço de cana exibiu efeito significativo quadrático, o que implica a obtenção de valores de produção enzimáticos em níveis exponenciais. O coeficiente de variação ( $R^2 = 0,74$ ) também indica uma boa correlação entre os valores preditos e os experimentalmente observados,

indicando que 74% da variabilidade na resposta podem ser explicados pelo modelo.

A variável pH não interferiu significativamente na produção da enzima endoxilanase pela referida espécie.

Tabela 6 ANOVA para a produção da enzima endoxilanase em diferentes níveis de concentrações de bagaço de cana-de-açúcar e extrato de levedura

<b>Fator</b>	<b>SQ</b>	<b>GL</b>	<b>MQ</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
<b>%BC (Q)</b>	0,035667	1	0,035667	14,55188	0,001895
<b>Ext.lev.g/L (L)</b>	0,060598	1	0,060598	24,72365	0,000205
<b>Erro</b>	0,034314	14	0,002451		
<b>Total SS</b>	0,130580	16			

Estatisticamente significativa, a 95% de confiança  $R^2 = 0,74$

Com os parâmetros significativos, foi possível elaborar o seguinte modelo com as variáveis codificadas:

$$Y = 0,147261 - 0,096608(x_2)^2 - 0,133284(x_3)$$

O gráfico de superfície de resposta exhibe os efeitos das concentrações de bagaço de cana, de extrato de levedura sobre a produção da enzima endoxilanase por *S. termitum* (Figura 7).

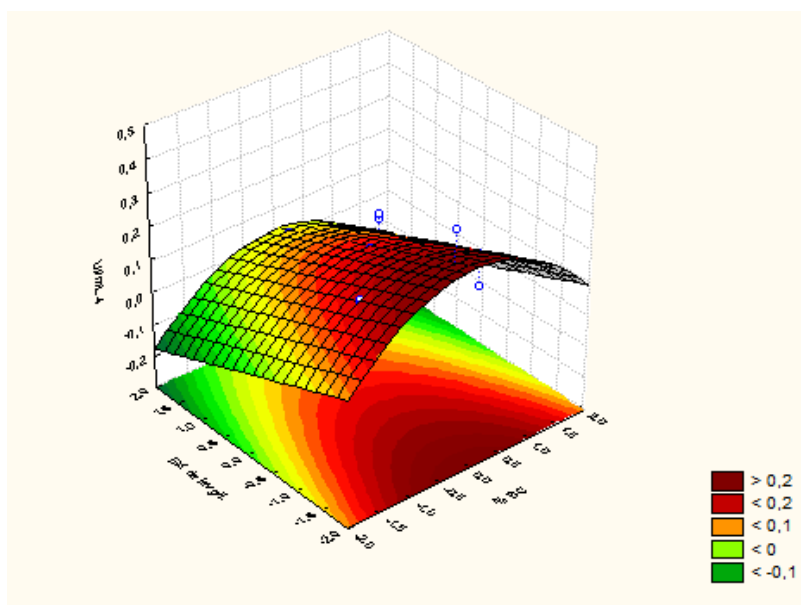


Figura 7 Gráfico de superfície de resposta da produção da enzima endoxilanase por *S. termitum*, em função das concentrações de bagaço de cana e de extrato de levedura

Os resultados obtidos por meio do DCCR indicam que a produção da enzima endoxilanase por *S. termitum* foi influenciada pelas concentrações da fonte de carbono e de nitrogênio presentes no meio de cultivo. Pode-se observar, por meio da figura, que baixas concentrações de extrato de levedura e concentrações de bagaço de cana no valor do ponto central aumentaram a produção de endoxilanase, que variou de 0,015 a 0,387 U/mL, uma diferença de 25,8 vezes. A melhor condição para a produção enzimática foi a que associou 2,75% de bagaço de cana e 1,0 g/L de extrato de levedura, conforme Tabela 7.

Na validação dos resultados, o modelo foi avaliado através da repetição do experimento nas condições ótimas. A máxima atividade enzimática resultante (0,35 U/mL), em seis dias de cultivo, confirma os experimentos realizados baseados no DCCR.

Aproximadamente 30%-40% do valor de produção de muitas enzimas industriais são atribuídos ao custo do substrato para o crescimento do microrganismo. O uso de substrato simples, de baixo custo, é, portanto, desejável por reduzir os custos de produção significativamente (TECHAPUN et al., 2003).

A produção de xilanases é fortemente influenciada pelas condições de cultivo e pelos constituintes do meio. Para manter um equilíbrio entre as condições do processo e minimizar a quantidade de componentes, a otimização da composição do meio é essencial (KUMAR et al., 2012).

Neste contexto, *Streptomyces termitum* é uma espécie interessante por produzir enzima endoxilanase, crescendo em bagaço de cana *in natura* com pouca quantidade de fonte de nitrogênio. O custo de produção para a enzima foi significativamente reduzido, considerando-se que, no meio inicial de crescimento do referido microrganismo (TUNCER et al., 1999), utilizaram-se glicose como fonte de carbono e 0,6% de extrato de levedura como fonte de nitrogênio. O meio otimizado continha bagaço de cana-de-açúcar e 0,1% de extrato de levedura.

#### 4 CONCLUSÃO

Dentre as 92 actinobactérias isoladas do solo nativo do cerrado mineiro, onze espécies, todas pertencentes ao gênero *Streptomyces*, demonstraram bom potencial enzimático para a produção de enzimas do complexo celulolítico e xilanolítico.

Em testes de fermentação submersa, a espécie *Streptomyces termitum* destacou-se na produção da enzima endoxilanase em meio de cultivo contendo substrato puro como fonte de carbono. Subsequentemente, a espécie cresceu e produziu endoxilanase, utilizando bagaço de cana-de-açúcar *in natura* como fonte de carbono.

Os resultados da otimização revelaram que a mais alta produção da enzima ocorreu quando se associaram 2,75% de bagaço de cana e 1,0 g/L de extrato de levedura.



## REFERÊNCIAS

AGUIAR, L. M. S.; CAMARGO, J. A. **Cerrado: ecologia e caracterização**. Brasília: EMBRAPA Informação Tecnológica, 2004. 249 p.

BAILEY, M. J.; BIELY, P.; POUTANEN, K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 23, p. 257-270, May 1992.

CHELLAPAND, P.; HIMANSH, M. J. Production of endoglucanase by the native strains of *Streptomyces* isolates in submerged fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 39, n. 1, p. 122-127, Jan./Mar. 2008.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar, safra 2013, segundo levantamento, agosto/2013**. Disponível em: <[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13\\_08\\_08\\_09\\_39\\_29\\_boletim\\_cana\\_portugues\\_-\\_abril\\_2013\\_1o\\_lev.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_08_08_09_39_29_boletim_cana_portugues_-_abril_2013_1o_lev.pdf)>. Acesso em: 10 mar. 2013.

DING, C. H. et al. High activity xylanase production by *Streptomyces olivaceoviridis* E-86. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 20, n. 1, p. 7-10, Feb. 2004.

EL-SERSY, N. A. et al. Optimization, economization and characterization of cellulase produced by marine *Streptomyces ruber*. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 9, n. 38, p. 6355-6364, Sept. 2010.

FLORES, M. E. et al.  $\alpha$ -xilosidase and xylanase characterization and production by *Streptomyces* sp. CH-M-1035. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 24, n. 5, p. 410-416, May 1997.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure & Applied Chemistry**, New Delhi, v. 59, n. 2, p. 257-268, 1987.

GOMES, R. C. et al. Chitinolytic activity of actinomycetes from a cerrado soil and their potential in biocontrol. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 30, n. 2, p. 146-150, Feb. 2000.

GRIGOREVSKI-LIMA, A. L. et al. Production and partial characterization of cellulases and xylanases from *trichoderma atroviride* 676 using lignocellulosic residual biomass. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 169, n. 4, p. 1373-1385, Feb. 2013.

GUPTA, R. et al. Chitinase production by *Streptomyces viridificans*: its potential in fungal cell wall lysis. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 78, n. 4, p. 378-383, Apr. 1995.

HOPWOOD, D. A. et al. **Genetic manipulation of Streptomyces**: a laboratory manual. Norwich: The John Innes Institute, 1985.

KASANA, R. et al. A rapid and easy method for the detection of microbial cellulose on agar plates using gram's iodine. **Current Microbiology**, New York, v. 57, n. 5, p. 503-507, Nov. 2008.

KUMAR, A. et al. Xylanase production from an alkalophilic actinomycete isolate *Streptomyces* sp. RCK-2010, its characterization and application in saccharification of second generation biomass. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Amsterdam, v. 74, n. 3/4, p. 170-177, Feb. 2012.

MAHESAWARI, M. U.; CHANDRA, T. S. Production and potential applications of xylanase from a new strain of *Streptomyces cuspidosporus*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 63, n. 6, p. 257-260, 2000.

MIAO, V.; DAVIES, J. Actinobacteria: the good, the bad, and the ugly. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 98, p. 143-150, Apr. 2010.

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

MOSIER, N. et al. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, Essex, v. 96, n. 5, p. 673-686, Apr. 2005.

NASCIMENTO, R. P. et al. Brewer's spent grain and corn steep liquor as substrates for cellulolytic enzymes production by *Streptomyces malaysiensis*. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 48, n. 5, p. 529-535, May 2009.

NINAWA, E. S.; KUHAD, R. C. Use of xylan-rich cost effective agro-residues in the production of xylanase by *Streptomyces cyaneus* SN32. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 99, n. 5, p. 1141-1148, Nov. 2005.

PENG, F. et al. Comparative study of hemicelluloses obtained by graded ethanol precipitation from sugarcane bagasse. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 57, n. 18, p. 6305-6317, June 2009.

QIU, Z. et al. A xylanase with broad pH and temperature adaptability from *Streptomyces megasporus* DSM 41476, and its potential application in brewing industry. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 46, n. 6, p. 506-512, May 2010.

SÁNCHEZ, C. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology Advances**, New York, v. 27, n. 2, p. 185-190, Mar./Apr. 2009.

SILVA, M. S. et al. Brazilian Cerrado soil actinobacteria ecology. **BioMed Research International**, New York, v. 2013, p. 1-10, 2013.

SLUITER, A. et al. **Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass**. Golden: National Renewable Energy Laboratory, 2008. 15 p.

SOCCOL, R. S.; VANDENBERGHE, L. P. S. Overview of applied solidstatefermentation in Brazil. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 13, n. 2/3, p. 205-218, Mar. 2003.

SOETAERT, W.; VANDAMME, E. **Industrial biotechnology: sustainable growth and economic success**. Weinheim: Wiley-VCH, 2009. 499 p.

TECHAPUN, C. et al. Thermostable and alkaline-tolerant microbial cellulase-free xylanases produced from agricultural wastes and the properties required for use in pulp bleaching bioprocesses: a review. **Process Biochemistry**, London, v. 38, n. 9, p. 1327-1340, Apr. 2003.

TUNCER, M. et al. Optimization of extracellular endoxylanase, endoglucanase and peroxidase production by *Streptomyces sp.* F2621 isolated in Turkey. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 97, n. 4, p. 783-791, Oct. 2004.

TUNCER, M. et al. Optimization of extracellular lignocellulolytic enzyme production by a thermophilic actinomycete *Thermomonospora fusca* BD25. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 25, n. 1/2, p. 38-47, July 1999.

VENTURA, M. et al. Genomics of actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 71, n. 3, p. 495-548, Sept. 2007.

VINHA, F. N. M. da et al. Cellulase production by streptomyces viridobrunneus SCPE-09 using lignocellulosic biomass as inducer substrate. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 164, n. 3, p. 256-267, June 2011.