



**Produção de celulases por *Streptomyces* sp.
AM4-6 utilizando sub-produtos da
agroindústria**

Pedro Henrique de Paula de Brito

Projeto final de curso

Orientador: Prof. Rodrigo Pires do Nascimento, Doutor em Ciências
(CCS-UFRJ)

Fevereiro de 2021

Produção de celulases por *Streptomyces* sp. AM4-6 utilizando sub- produtos da agroindústria

Pedro Henrique de Paula de Brito

Projeto de final de curso submetido ao Corpo Docente da Escola de Química, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Engenheiro de Bioprocessos

Aprovado por:

Alana Pereira de Almeida, M. Sc.- PBV/UFRJ

Ivaldo Itabaiana Júnior, D. Sc – EQ/UFRJ

Tatiana Felix Ferreira, D. Sc – EQ/UFRJ

Orientador:

Rodrigo Pires do Nascimento, D. Sc. – EQ/UFRJ

Rio de Janeiro
2021

FICHA CATALOGRÁFICA

CIP - Catalogação na Publicação

dB862p de Paula de Brito, Pedro Henrique
Produção de celulases por *Streptomyces* sp. AM4-6
utilizando sub-produtos da agroindústria / Pedro
Henrique de Paula de Brito. -- Rio de Janeiro, 2021.
71 f.

Orientador: Rodrigo Pires do Nascimento.
Trabalho de conclusão de curso (graduação) -
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de
Química, Bacharel em Engenharia de Bioprocessos,
2021.

1. Fermentação em estado sólido. 2. Fermentação
submersa. 3. Actinobactéria. 4. Celulases. 5. Bagaço
de cana. I. Pires do Nascimento, Rodrigo, orient.
II. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos
pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.

“Cantar, para mim, é sacerdócio. O resto é o resto.”

Elis Regina

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a minha família por todo o suporte e educação que deram ao longo dos anos que me possibilitou chegar até aqui.

Agradeço a Calebe Fita por toda a ajuda, impulso, apoio, estabilidade e ensinamentos que me deu durante todo esse processo. Sou eternamente grato de você ter entrado na minha vida e ter tornado tudo mais intenso e claro. Obrigado por todo carinho, risadas, vinhos e mais importante de tudo, por me incentivar a ser cada vez mais eu. Amo você.

A equipe do LEPM, em especial Julia Baruque, Alana Pereira, Henrique Bernardo, João Victor, Rafael Rodrigues, Norman, Lucas Cardoso, João Saback, Rafael Rocha, Rachel, Gaby, Priscila e Matheus que se tornou uma equipe de amigos que carrego para a vida, muito obrigado por ter gerado um ambiente de trabalho tão acolhedor, leve e estarem sempre dispostos a me ajudar. Sem vocês esse processo teria sido muito mais árduo.

Aos meus amigos da LEMA, muito obrigado pelo acolhimento nos momentos difíceis e pelas cervejas e risadas divididas no DAEQ e nas reuniões. Com vocês me forcei a sair do meu comodismo e aprendi muito mais do que uma sala de aula poderia ensinar.

Aos meus amigos que fiz durante a graduação, muito obrigado por estarem sempre dispostos a ajudar e me acompanhar mesmo nas disciplinas mais difíceis.

Ao Coral do CT e Coral da COPPE sou eternamente grato por terem me dado a oportunidade de exercer o que mais amo e me proporcionar tantos momentos inesquecíveis me apresentando. Um agradecimento especial aos regentes Alberto Nery e Danielly Souza pela confiança e por acreditar em mim.

Ao meu orientador Rodrigo Nascimento, agradeço todos os ensinamentos que me passou e pela confiança em mim, no meu trabalho e por ter acreditado no meu potencial nessa área acadêmica, permitindo que eu pudesse me desenvolver muito como ser humano e profissional. Além disso, tenho que agradecer por fazer excelentes confraternizações e ter conseguido gerar um laboratório muito unido.

Agradeço aos órgãos de financiamento de pesquisa, CNPq, capes, FAPERJ e COPPE pelo apoio financeiro ao longo dos anos e por resistirem mesmo com esse desmonte da ciência.

RESUMO

Resumo do projeto final de curso apresentado à Escola de Química como parte dos requisitos necessários para conclusão do curso de Engenharia de Bioprocessos.

Produção de celulases por *Streptomyces* sp. AM4-6 utilizando sub-produtos da agroindústria

Pedro Henrique de Paula de Brito (ph.brito@hotmail.com)

Janeiro, 2021

Orientador Responsável: Prof. Rodrigo Pires do Nascimento, Doutor em Ciências (CCS-UFRJ)

As actinobactérias são bactérias Gram-positivas, com capacidade em formar filamentos durante seu ciclo de vida, sendo encontradas principalmente em solos e sedimentos. As actinobactérias apresentam uma ampla diversidade taxonômica e bioquímica, sendo consideradas importantes fontes biotecnológicas para a produção de diferentes compostos bioativos, como enzimas e antibióticos. Dentre as enzimas, destacam-se as proteases, amilases e celulases. As celulases, enzimas que hidrolisam a fibra de celulose, podem ser aplicadas em diferentes setores industriais. Um desses setores, o da agroindústria, gera anualmente grandes quantidades de resíduos sólidos (bagaços, palhas, etc), que podem ser reaproveitados como substrato em processos fermentativos para obtenção de biomoléculas. Desta forma, o presente trabalho objetivou avaliar o potencial celulolítico de actinobactérias isoladas da Restinga de Marambaia e estudar a produção de celulase por fermentação em estado sólido (FES) e submersa (FS) utilizando bagaço de cana *in natura* e pré-tratado (explosão a vapor) como fontes de carbono. Inicialmente, 114 linhagens de actinobactérias, isoladas da Restinga de Marambaia - Rio de Janeiro, foram avaliadas quantitativamente quanto a produção de carbohidrolases (celulases e amilases), sendo a linhagem *Streptomyces* sp. AM4-06, selecionada como a mais promissora. Na FS, frascos cônicos (250 mL) contendo meio de saís suplementado com 1,0% (p/v) milhocina e 2,0% (p/v) bagaço foram inoculados e incubados sob agitação orbital (200 rpm) a 28°C por 7 dias. Diariamente, alíquotas foram retiradas, centrifugadas e as atividades enzimáticas determinadas. Já para o sistema FES (utilizando razões sólido:líquido de 1:2 e 1:3), o inóculo da suspensão de esporos foi realizado inicialmente em frascos cônicos (100 mL) contendo meio de saís suplementado com 1,0% (p/v) milhocina e incubado sob agitação orbital (200 rpm) a 28°C, em duplicata. Todo conteúdo (pré-inóculo) foi transferido para frascos cônicos (250 mL) contendo 5,0g de substrato, e o sistema foi incubado por 7 dias a 28°C, em triplicata. Após este período, foram realizadas extrações aquosas, através da adição de 50 mL de solução salina 0,8% (p/v) seguida de agitação orbital (180 rpm) por 20 minutos, centrifugação (3.000 rpm / 10 min) e filtração em filtros de vidro sinterizado. O processo foi repetido por mais uma vez, totalizando 2 extrações. Para ambas as fermentações, foi utilizado uma suspensão de esporos padronizada (10^8 UFC/mL). A determinação das atividades enzimáticas (CMCase, FPase e Avicelase) foi realizada através da quantificação de açúcares redutores pelo método de DNS, sendo as maiores atividades enzimáticas de CMCase (2,91 U/g) e FPase (1,77 U/g) observadas no sistema FES, após 7 dias com o bagaço *in natura*. Para o sistema FS, as maiores atividades de CMCase e FPase foram 217,67 U/L com o bagaço *in natura* e 433,44 U/L com o pré-tratado, no terceiro e quinto dias respectivamente. Os resultados observados no presente trabalho demonstram o potencial uso de actinobactérias isoladas da Restinga de Marambaia na produção de celulases utilizando subprodutos da agroindústria.

ÍNDICE

CAPÍTULO 1 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	1
1.1 – Ambientes Costeiros: Restinga	1
1.2 – Domínio Bacteria	2
1.2.1 – Actinobactéria	4
1.2.2 – Gênero <i>Streptomyces</i>	6
1.3 – Biomassa de Lignocelulose	6
1.3.1 – Celulose	7
1.3.2 – Hemicelulose	8
1.3.3 – Lignina	10
1.4 – Enzimas celulolíticas	11
1.4.1 – Classificação	12
1.4.1.1 – Endoglucanase	12
1.4.1.2 – Exoglucanase	12
1.4.1.3 – Beta glucosidases	13
1.5 – Organismos produtores	13
1.6 – Estratégias de produção de bioprodutos	15
1.6.1 – Fermentação em Estado Sólido (FES)	16
1.6.2 – Fermentação Submersa (FS)	17
1.6.3 – Comparação entre os diferentes tipos de biorreatores	18
1.7 – Aplicações biotecnológicas das celulases	19
CAPÍTULO 2 – Objetivos	22
2.1 – Objetivos específicos	22
CAPÍTULO 3 – Materiais e métodos	23
3.1 – Microrganismos: Coleção de cultura e isolamento	23
3.2 – Conservação	25

3.3 – <i>Screening</i> enzimático	25
3.4 – Suspensão e contagem de esporos	25
3.5 – Curva de crescimento	27
3.6 – Processo fermentativo	27
3.6.1 – Fermentação em estado sólido	27
3.6.2 – Fermentação submersa	27
3.7 – Ensaio analítico	28
3.7.1 – Atividade enzimática	28
3.7.2 – Atividade de CMCase (endoglucanase)	28
3.7.3 – Atividade de FPase (celulase total)	28
CAPÍTULO 4 -RESULTADOS E DISCUSSÕES	29
4.1 – Coleta e isolamento	29
4.2 – <i>Screening</i> enzimático	29
4.3 – Microrganismo	38
4.4 – Suspensão de esporos	38
4.5 – Curva de crescimento	39
4.6 – Fermentação em estado sólido	40
4.7 – Fermentação submersa	41
4.8 – Produção de Celulases (FPases e CMCases)	42
CAPÍTULO 5 – CONCLUSÃO	48
CAPÍTULO 5 – PERSPECTIVAS FUTURAS	49
Referências	50
Anexo	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Vista aérea de parte da Restinga de Marambaia (sede do Exército).	2
Figura 2	Versão mais atualizada da árvore da vida, englobando a diversidade de genomas sequenciados.	3
Figura 3	Ciclo de vida de uma actinobactéria.	5
Figura 4	Estrutura dos tecidos de uma biomassa vegetal.	7
Figura 5	Esquematização da estrutura da celulose.	8
Figura 6	Esquematização da estrutura da hemicelulose e as possíveis unidades de construção do polímero hemicelulose	9
Figura 7	Esquematização da Estrutura da Lignina [Principais unidades fenólicas estão marcadas como vermelha (álcool sinapílico), azul (álcool guaiacil), verde (álcool pumarílico)].	10
Figura 8	Mecanismo de ação da Endoglucanase, Exoglucanase e β -glucosidase.	12
Figura 9	Modelo de reator de Fermentação de Estado Sólido de bandeja.	17
Figura 10	Reator de Fermentação Submersa	18
Figura 11	Local de coleta de sedimento de Manguezal	23
Figura 12	Local de coleta de sedimento misto	23
Figura 13	Local de coleta de sedimento arenoso	24
Figura 14	Esquema demonstrando técnica de diluição seriada e plaqueamento por <i>spreadplate</i> .	24
Figura 15	Placas de meio de sais com CMC contendo a zona de hidrólise após a adição do vermelho congo.	36

Figura 16	Placas de meio de sais com amido contendo a zona de hidrólise após a adição de lugol.	37
Figura 17	Características Macroscópicas (A) e Microscópicas (B) da linhagem AM4-6 crescida em placa contendo meio agar ISP-2, após 3 dias a 28°C.	38
Figura 18	Massa seca da biomassa do microrganismo em relação ao tempo.	40
Figura 19	Crescimento macroscópico da actinobactéria AM4-6 após 7 dias de crescimento em bagaço de cana tratado (esquerda) e bagaço de cana in natura (direita)	41
Figura 20	Crescimento macroscópico da actinobactéria AM4-6 após 7 dias de crescimento em bagaço de cana tratado (esquerda) e bagaço de cana in natura (direita).	42
Figura 21	Atividade de CMCase produzidas por FES em diferentes proporções sólido:líquido.	43
Figura 22	Atividade de FPases produzidas por FES em diferentes proporções sólido:líquido.	44
Figura 23	Atividade enzimática de CMCase produzida por Fermentação Submersa.	46
Figura 24	Atividade enzimática de FPase produzida por Fermentação Submersa.	46

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1	Particularidades e dificuldades de implementação de processos para diferentes tipos de reatores.	19
Tabela 2	Perfil enzimático das actinobactérias presentes nas diversas amostras de solo.	29
Tabela 3	Actinobactérias que apresentaram as maiores atividades enzimáticas de celulase.	36
Tabela 4	Actinobactérias que apresentaram as maiores atividades enzimáticas de amilase.	36

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. AMBIENTES COSTEIROS: RESTINGA

De acordo com o Ministério do Meio Ambiente, a mata atlântica é uma região que se estende pela costa nordeste, sudeste e sul do Brasil. Devido a ações antrópicas que vem desde o período colonial, hoje restam apenas 29% de sua área original. Contudo, mesmo em um espaço tão reduzido, ainda se abriga pelo menos 20 mil espécies de vegetais, número expressivamente maior quando comparado com os encontrados em florestas na Europa (12,5 mil) e nos Estados Unidos (17 mil). Sua composição é de formações florestais nativas e ecossistemas associados. Dentre as florestas tem-se: Floresta Ombrófila Densa; Floresta Ombrófila Mista, também denominada de Mata de Araucárias; Floresta Ombrófila Aberta; Floresta Estacional Semidecidual; e Floresta Estacional Decidual. Já entre os ecossistemas pode-se citar encaves, restingas, manguezais, campos de altitude e brejos interioranos (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2020).

Restingas são ecossistemas associados à Mata Atlântica e são constituídas por áreas de sedimentação quaternária e por planícies arenosas costeiras cobertas por formação vegetal. Essa região é extremamente sensível ao impacto antrópico, como pode ser evidenciado pela pequena espessura de seu solo, que varia de 5 a 10 centímetros. A fragilidade deste sistema é comprovada através da remoção de vegetais presentes que causa intensa erosão do solo por ventos (SOUZA, 2007).

A Restinga de Marambaia é uma restinga e ilha de aproximadamente 40 quilômetros quadrados localizada na Baía de Sepetiba, como fica evidenciado na figura 1. Seu nome deriva de um antigo nome Tupi *kamarambaia*, que significa a planta camarambaia (NAVARRO, 2013). Esta região pertence aos municípios de Angra dos Reis, Mangaratiba e Rio de Janeiro, e está localizada na região da Costa Verde (faixa de terra que começa no litoral sul do estado do Rio de Janeiro e vai até o litoral norte de São Paulo). A área é protegida pelas forças armadas brasileiras e é utilizada para treinamentos, recebendo agentes militares de todo o Brasil (SOUZA; FIGUEIREDO; ALMEIDA, 2014). Atualmente, existem disputas judiciais e conflitos fundiários entre os militares e uma comunidade quilombola de pescadores artesanais descendentes de ex-escravos que eram trazidos para serem vendidos e que com o fim da escravidão permaneceram no local (O GLOBO, 2014).

Ao que tange suas características climáticas, a temperatura média anual da região é de 23,7°C, com as médias mensais sendo sempre acima de 20°C. A precipitação média anual é de 1239,7mm, sendo que 40% desse valor ocorre durante o verão, que é distribuído em 40 dias de intensa chuva (FRAGA, 2012).

Figura 1 – Vista aérea de parte da Restinga de Marambaia (sede do Exército).

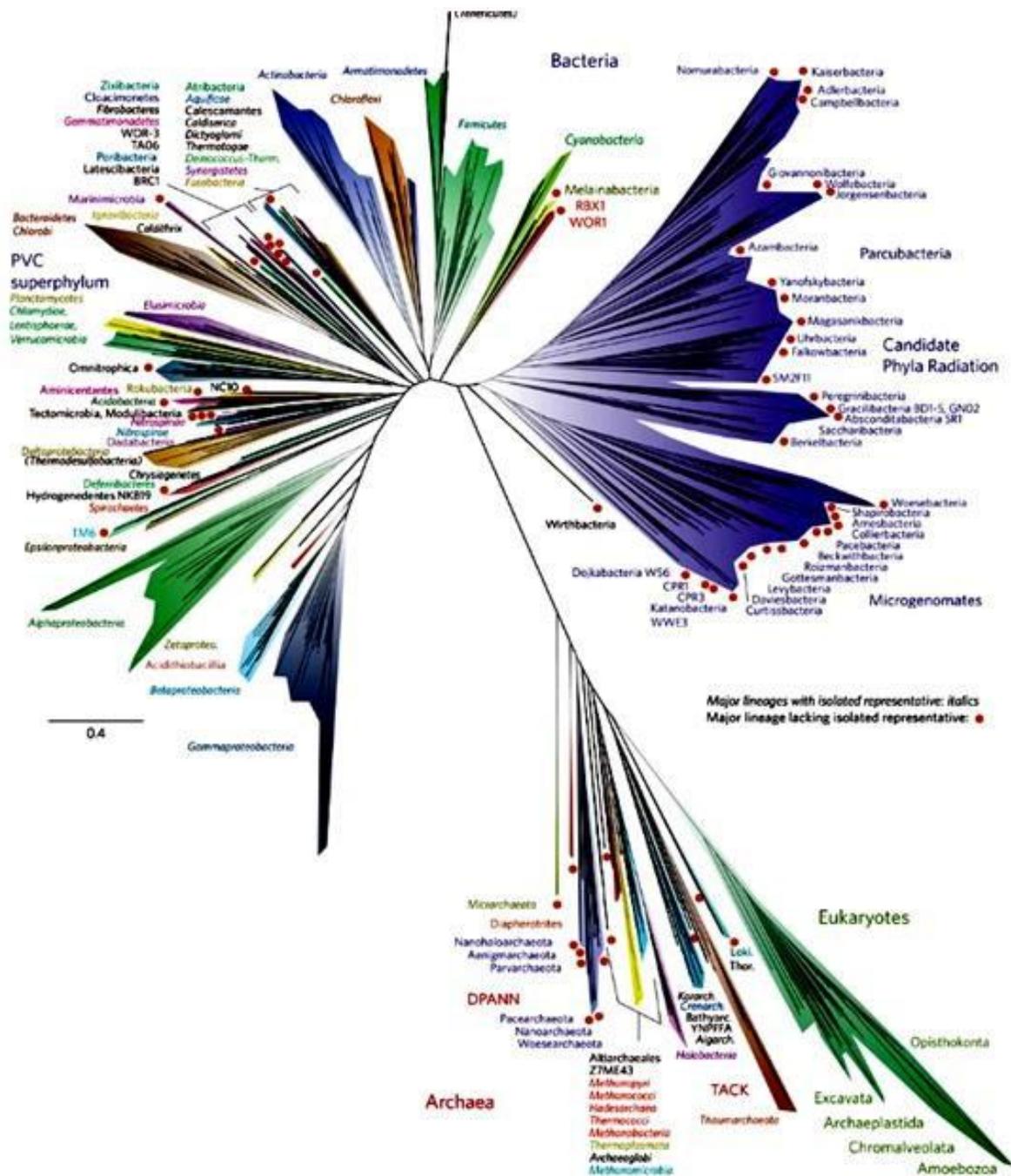


Fonte: O Globo, 2014

1.2. DOMÍNIO BACTERIA

Um domínio biológico consiste na maior ordem taxonômica de organismos. Este modelo foi desenvolvido por Carl Woese (1990), e engloba três diferentes domínios, o domínio Bacteria, domínio Archaea e o domínio Eukarya. Os métodos mais antigos utilizavam apenas as características físicas e metabólicas dos organismos, e com o advento e a evolução da biologia molecular, foi possível determinar as linhagens e os ancestrais comuns dos organismos de forma mais precisa (HUG et al. 2016).

Figura 2 – Versão mais atualizada da árvore da vida, englobando a diversidade de genomas sequenciados.



Fonte: Hug et al. (2016).

1.2.1. Actinobactéria

Dentre os diversos filos que podem ser encontrados dentro o domínio Bacteria, um dos mais relevantes é o filo Actinobacteria. As actinobactérias, previamente denominadas como actinomicetos, foram classificadas apenas de acordo com sua morfologia por mais de cem anos. Eram consideradas apenas bactérias que em um dado momento de seu desenvolvimento eram capazes de gerar hifas (GOODFELLOW, 1983). As actinobactérias são bactérias Gram positivas que apresentam um DNA rico em guanina e citosina ($G+C > 72\%$, no gênero *Streptomyces* e $G+C$ de 64% à 72% no gênero *Nocardia*) possuindo a capacidade de formar filamentos em determinado estágio de seu desenvolvimento (VOBIS, 1997).

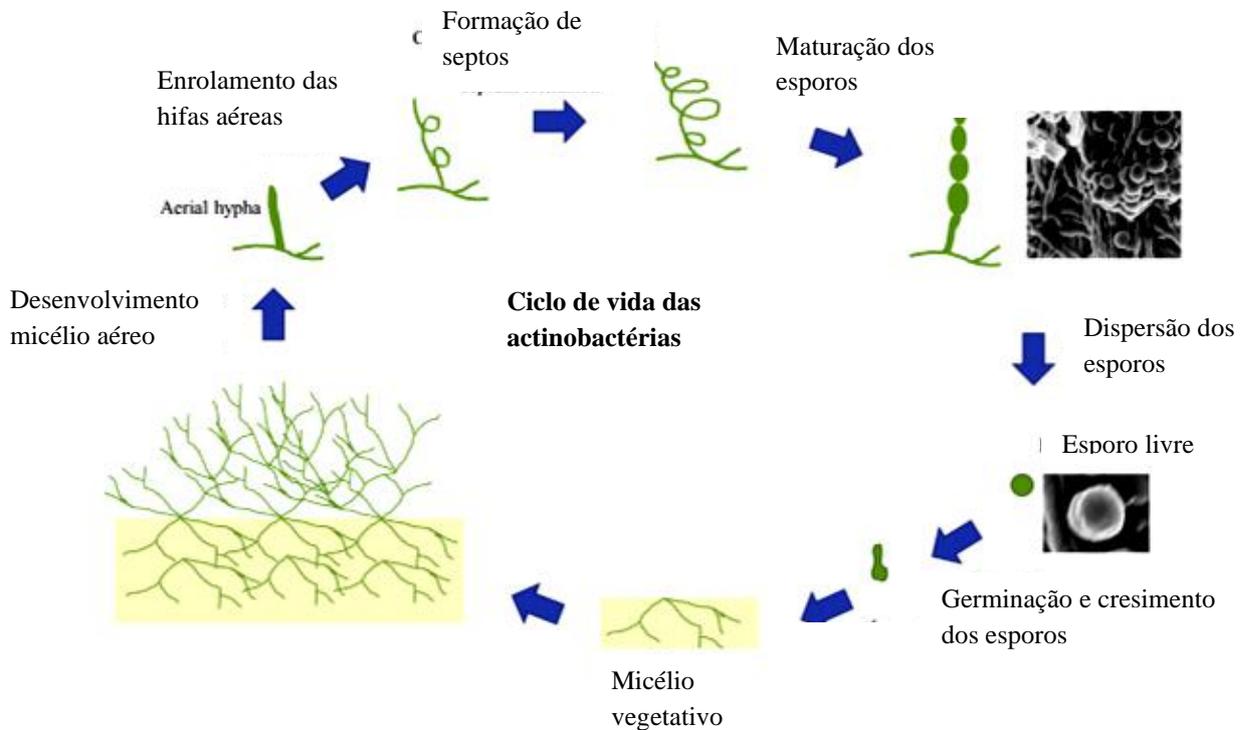
Em termos de números e variedades de espécies catalogadas, o filo Actinobacteria representa uma das maiores unidades taxonômicas do domínio Bacteria. Sabe-se que o solo é o ambiente mais comum desses seres vivos, contudo, diferentes estilos de vida podem ser observados. O filo apresenta patógenos, habitantes do solo e do mar, comensais de planta, simbiontes fixadores de nitrogênio e em parte da microbiota intestinal (BARKA, 2016).

As actinobactérias apresentam uma diferenciação muito significativa quanto a sua morfologia. Elas podem se diferenciar quanto a estrutura ou presença ou ausência de seu micélio aéreo ou vegetativo, a cor dos micélios, a estrutura dos esporos e quanto a produção de pigmentos. Quanto a sua morfologia, as actinobactérias podem apresentar diferentes formatos celulares, incluindo cocos, cajados, micélios e hifas (HAZARIKA, 2020).

Esses organismos procariontes possuem a capacidade de produzir hifas tanto em meio líquido como em meio sólido, entretanto, no meio sólido as células podem se diferenciar em hifas aéreas, de forma a produzir esporos reprodutivos, o que não ocorreria no meio líquido (VENTURA, 2007). As etapas iniciais de esporulação podem ser classificadas como uma forma de brotamento, e cada esporo pode ser formado no substrato ou no micélio aéreo como células unitárias ou em cadeias de diferentes tamanhos (LOCCI, 1984).

Pode-se considerar que o ciclo de vida da maior parte das actinobactérias se dá da seguinte forma: começa com a germinação de um esporo que torna-se uma hifa vegetativa, que após um período de crescimento da hifa e de ramificação, resulta em um micélio vegetativo ramificado (CHATER, 2010). As etapas de desenvolvimento ficam claras na Figura 3. Uma característica dessa formação é que as células crescem a partir da extensão da ponta, diferente de outros organismos procariontes onde as células alongam-se (CHATER, 1972).

Figura 3 – Ciclo de vida de uma actinobactéria.



Fonte: Hazarika; Thakur (2020).

Em bases de dados de genes, encontram-se apenas três gêneros de actinobactérias micelares, *Streptomyces*, *Thermobifida* e *Frankia*, que podem ser considerados do mesmo grupo devido a comparações genéticas (VENTURA, 2007). Outros gêneros como *Actinoplanes*, *Kineospora*, *Microbispora*, *Micromonospora* e *Catenuloplanes* são considerados raros devido a dificuldade em isolar e cultivar em laboratório (HAYAKAWA, 2008).

Devido a sua incrível capacidade de produção de metabólitos secundários com diversas atividades biológicas, incluindo antibióticos e enzimas, há um emergente campo de estudo que aborda as propriedades destes seres (MANIVASAGAN, 2014). As actinobactérias são conhecidas pela produção de enzimas, como celulases, quitinases, amilases, pectinases, xilanases e proteases (PRIYA; STALIN; SELVAN, 2012). Outro composto natural bioativo produzido pelas actinobactérias são os antibióticos. Os metabólitos secundários apresentam uma grande importância econômica na indústria farmacêutica, e grande parte deles podem ser encontrados atualmente no mercado (ANZAI, 2008). Pode-se ressaltar também a imensa importância que esses microrganismos apresentam para o solo, já que devido a capacidade de

hidrolisar polímeros complexos e estabilizar partículas de argila, as actinobactérias conseguem aumentar a capacidade do solo de absorver e reter água e assim encorajando o crescimento de outras formas de microrganismos (ARAUJO, 2020).

1.2.2. Gênero *Streptomyces*

Streptomyces sp. pode ser considerado como um dos mais importantes gêneros desse grupo de microrganismos. Estes são capazes de produzir e excretar diversas classes de enzimas hidrolíticas, incluindo as envolvidas no processo de degradação de celulose, hemicelulose e lignina, gerando assim, moléculas menores que podem ser absorvidas e utilizadas como fonte de energia. Devido a falta de conhecimento referente à microbiota dos solos brasileiros, estes podem apresentar um imenso potencial para a descoberta de novos organismos eucariotos e procariotos, além de novos bioprodutos (MACEDO, 2013).

Outra relevante questão acerca da produção de bioprodutos é a dificuldade envolvida no ciclo de vida do *Streptomyces* e suas variações morfológicas. Ambos os fatores indicam uma complexa regulação metabólica, o que, utilizando ferramentas de bioinformática, revelam que maior parte dos genes envolvidos na produção da maior parte de metabólitos secundários não é expressa em condições normais de fermentação em laboratório. Portanto, é requerido que mais estudos sobre efeitos regulatórios genéticos sejam realizados de forma a ter-se uma compreensão total da capacidade de produzir metabólitos secundários desse microrganismo (ZHOU; NING; LOU, 2020).

1.3. BIOMASSA DE LIGNOCELULOSE

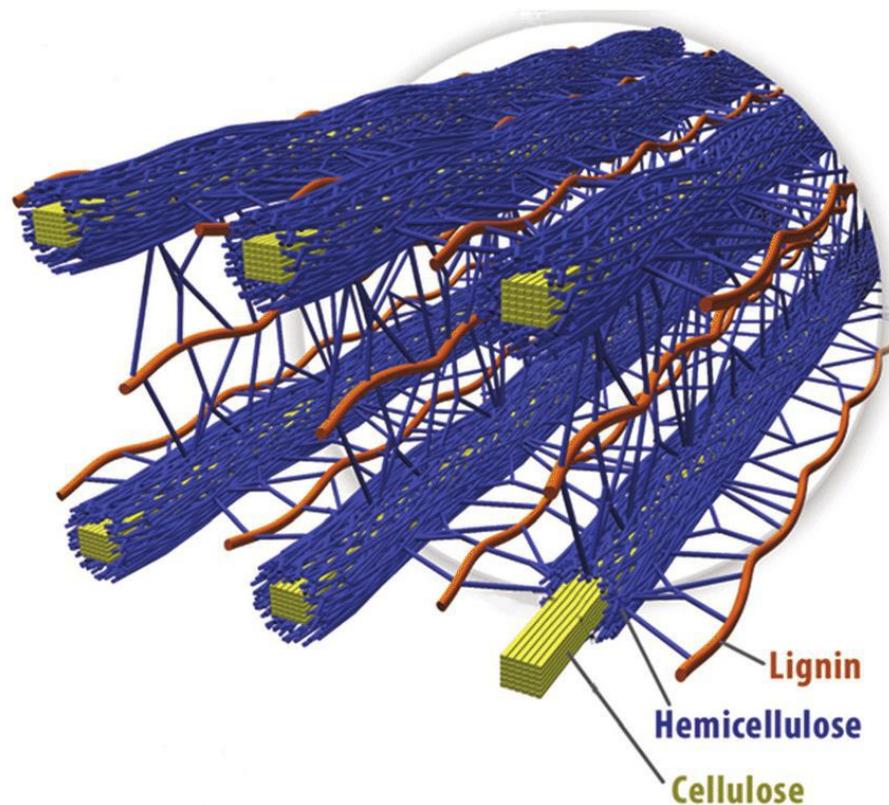
As matérias primas de lignocelulose são as fontes renováveis mais abundantes encontradas na natureza. Consiste de três polímeros diferentes: celulose, hemicelulose e lignina, que estão entrelaçados e quimicamente ligados por forças covalentes e não covalentes, como mostra a figura 4 (PEREZ, 2002). A celulose é a macromolécula mais numerosa dentre elas, em seguida a hemicelulose e a lignina (SANCHEZ, 2009).

Celulose e hemicelulose são polímeros derivados de açúcares, enquanto que a lignina é um polímero aromático. A composição e os percentuais desses componentes nas plantas podem

variar de acordo com o tipo de vegetal, estágio de crescimento, idade e outras condições externas. A proteção das células de vegetais é formada pela união desses 3 polímeros conferindo a defesa da planta (SANCHEZ, 2002).

O constante crescimento da agroindústria, principalmente no Brasil gera um acúmulo excessivo de resíduos lignocelulósicos. Dentre o que resta da produção agrícola e não é utilizado, pode-se citar que por exemplo, no ano de 2009 o bagaço de cana, a palha de milho, a casca do arroz e a palha de trigo, somados geraram mais de 291.138.869 de toneladas de resíduo (IPEA, 2009).

Figura 4 – Estrutura dos tecidos de uma biomassa vegetal.



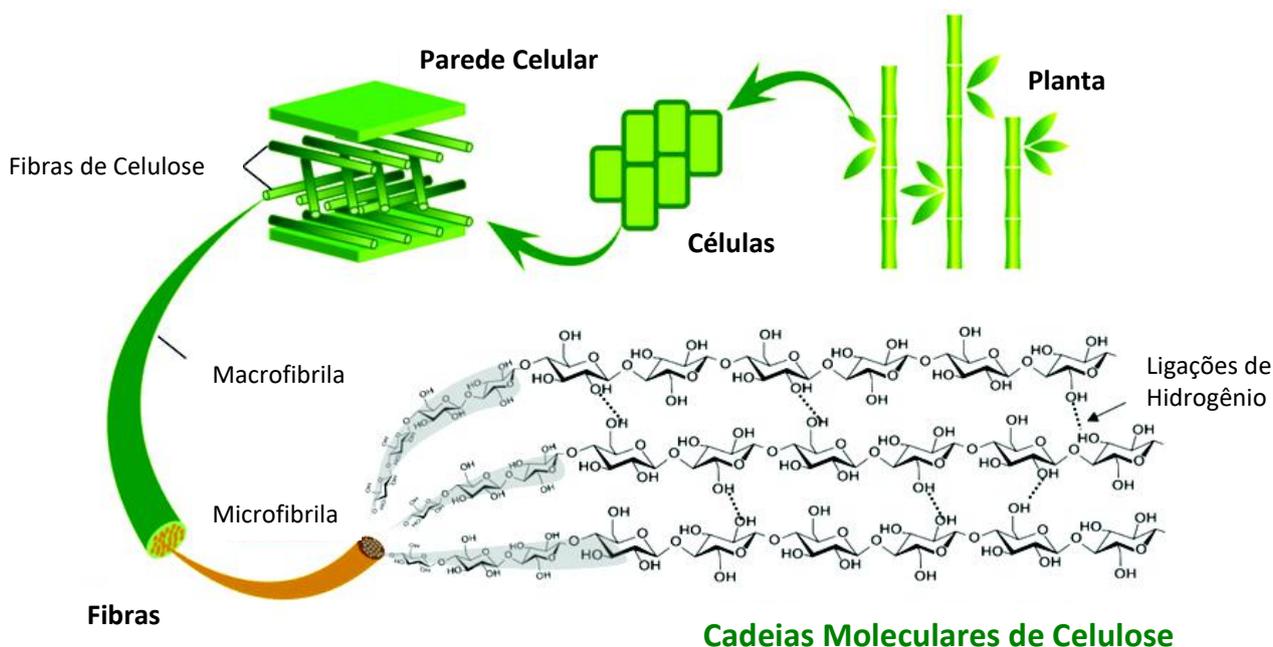
Fonte: Brandt (2002).

1.3.1. Celulose

A celulose é um polímero natural e insolúvel, encontrado em todas as plantas e é o polímero mais abundante encontrado na natureza. Esse material é composto por subunidades de d-glicose que ligado por ligação β -1,4 forma o dímero celobiose (GARDNER, 1975). Esses dímeros formam longas cadeias operadas por forças moleculares constituindo as ligações de hidrogênio e interações de van der waals (Figura 5). Apesar de o uso e o desenvolvimento de polímeros sintéticos ter alavancado nos últimos anos, em diversos setores, o uso da celulose é essencial em empresas voltadas para a produção de papel e celulose, madeira e indústria têxtil (PEREZ, 2002; BROWN 2003).

A celulose na natureza é encontrada geralmente na sua forma cristalina e associada a outros compostos, o que se torna um dificultante no seu acesso por microrganismos. Todavia, há outra conformação na qual, pequenas cadeias de celulose, não são organizadas, conhecida como celulose amorfa, sendo mais suscetível à hidrólise enzimática (SANCHEZ, 2009).

Figura 5 – Esquemática da estrutura da celulose.

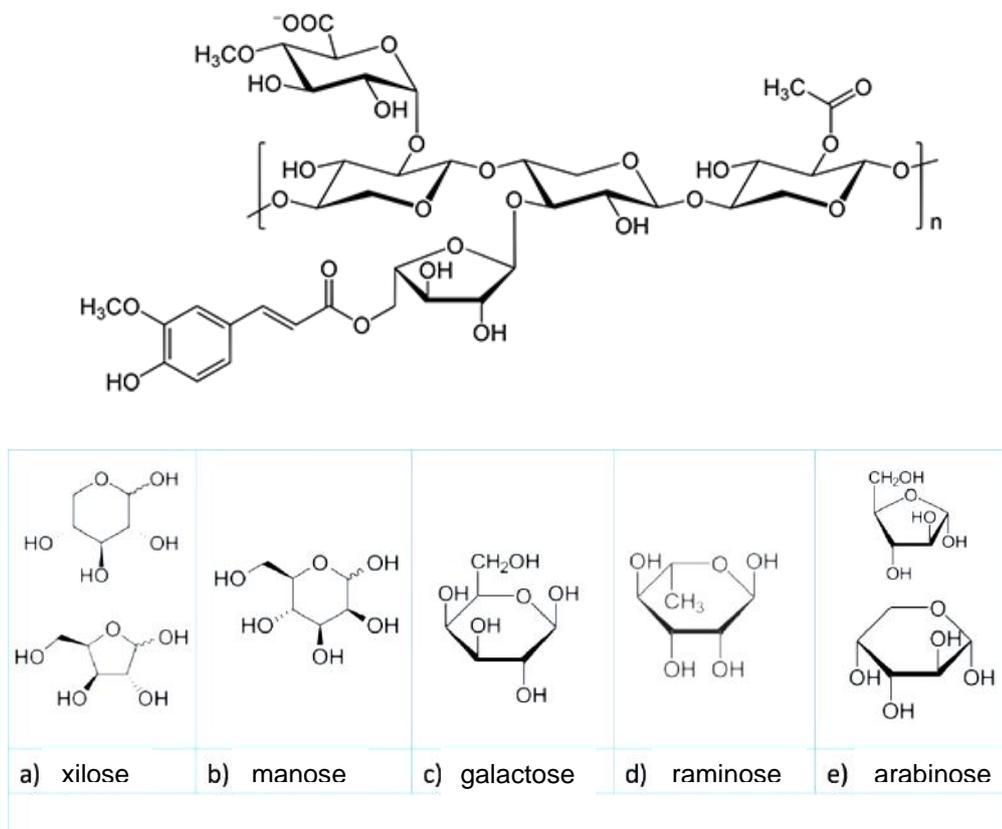


Fonte: Adaptado de https://www.researchgate.net/figure/A-typical-existence-of-cellulose-in-plants_fig7_337902862

1.3.2. Hemicelulose

A hemicelulose consiste de aproximadamente 20 - 35% da biomassa vegetal, sendo assim o segundo polissacarídeo mais abundante do planeta. Este biocomposto é encontrado predominantemente na parede celular primária de biomassa vegetal, embora também possa ser encontrada na lamela média e na parede secundária (WHISTLER, 1993). Elas são polímeros heterogêneos de pentoses (xilose e arabinose), hexoses (manose, glucose e galactose) e açúcares acetilados (SAHA, 2002), como observado na Figura 6. Devido a heterogeneidade de suas cadeias, a hemicelulose apresenta um caráter amorfo e solúvel em água. Existem evidências que as interações da hemicelulose com a lignina e com alguns polissacarídeos peptídicos são covalentes (PAULY, 2013).

Figura 6 – Esquematisação da estrutura da hemicelulose e as possíveis unidades de construção do polímero hemicelulose.



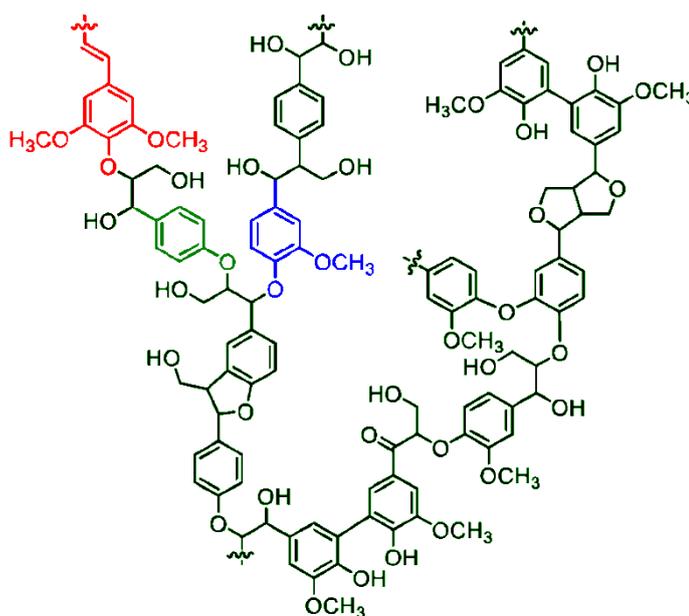
Fonte: <https://www.e-education.psu.edu/egee439/node/664>

A respeito da estrutura de suas cadeias, a hemicelulose se difere da celulose, já que esta tem um caráter quimicamente homogêneo enquanto a outra não. As ligações na estrutura da hemicelulose são, na maioria das vezes, do tipo β -1,4 e raramente do tipo β -1,3. A hemicelulose apresenta pequenas ramificações laterais e de diferentes açúcares. Devido a essas peculiaridades estruturais, a hemicelulose é um polissacarídeo muito facilmente hidrolisável e não forma agregados, mesmo quando co-cristalizados com a celulose (PEREZ, 2002).

1.3.3. Lignina

A lignina é um grupo de moléculas encontradas nas paredes celulares secundárias das células de plantas conferindo a elas impermeabilidade e rigidez. Apesar de sua produção ocorrer de forma natural, existem formas de induzir sua biossíntese. Dentre elas pode-se citar, stress metabólico, danos a sua estrutura e infecções de patógenos. Essa proteção que a lignina confere também se torna um fato limitante em diversos processos industriais, como a bioconversão da biomassa lignocelulósica (VANHOLME, 2010).

Figura 7 – Esquematização da Estrutura da Lignina [Principais unidades fenólicas estão marcadas como vermelha (álcool sinapílico), azul (álcool guaiacil), verde (álcool p-cumarílico)].



Fonte: Karunaratha; Smith (2020).

Aproximadamente se geram 50 milhões de toneladas de lignina por ano nas indústrias de papel e celulose, contudo, menos de 2% é utilizado em aplicações diferentes de geração de energia. Isso ocorre devido aos fatores previamente citados referentes a estrutura da lignina. Portanto, atualmente estuda-se modificar a composição da lignina de forma a torná-la mais atraente para ser utilizada em outras aplicações. Estudos atuais buscam utilizar a lignina como material em fibras, resinas ou para aumentar a resistência de biopolímeros (FARUL, SAIN, 2015).

1.4. ENZIMAS CELULOLÍTICAS

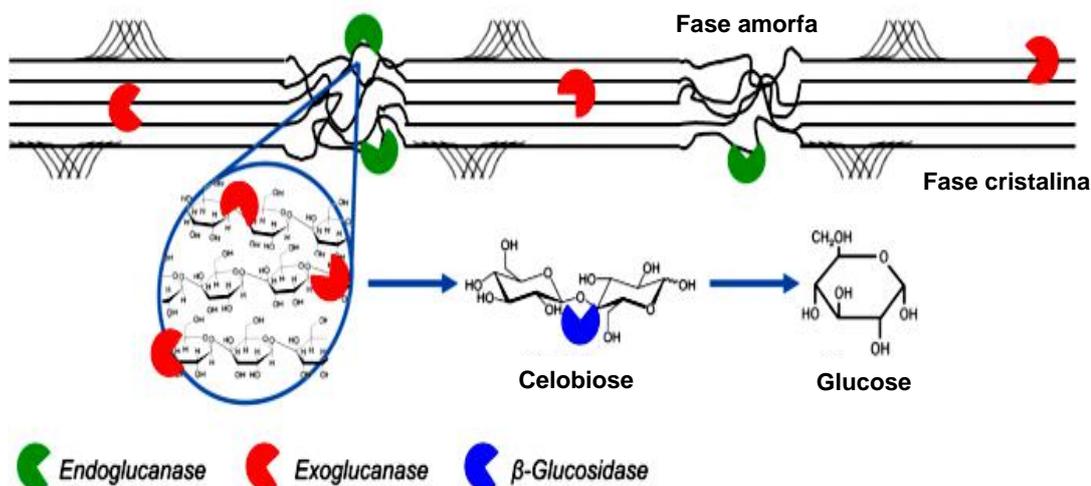
Enzimas são substâncias de natureza protéica produzidas por diversos seres vivos. Estes compostos atuam como catalisadores bioquímicos para diversas reações, apresentando uma alta especificidade a um substrato. De acordo com os parâmetros definidos pela Comissão de Nomenclatura IUBMB (International Union of Biochemistry and Molecular Biology), pode-se classificar as enzimas dentre seis classes: Oxido-redutases, transferases, hidrolases, liases, isomerases e ligases. Cada uma dessas classes é nomeada respectivamente de classe 1, classe 2, classe 3, classe 4, classe 5 e classe 6.

As celulasas são um grupo de enzimas pertencentes a classe 3, de hidrolases. Dentro desse grupo pode-se dividir as celulasas entre endoglucanase, exoglucanase ou celobiohidrolase e as β -glicosidases, cada uma com uma função específica e atuando em sinergia para realizar a hidrólise da biomassa celulósica, como mostra a figura 8. Essas enzimas apresentam um domínio catalítico (CD) e um domínio responsável por realizar a ligação com a celulose (CBD). Apesar de não fazer efetivamente parte da hidrólise, o CBD é responsável por aumentar a atividade enzimática nas reações (JUTURU; WU, 2014). Devido a sua baixa solubilidade, a hidrólise enzimática da celulose é dificultada. Por isso, as enzimas têm que não apenas atuar de forma a hidrolisar a molécula, mas também rompendo a ligação de hidrogênio e forçando a molécula a sair de sua forma cristalizada (SCHÜLEIN, 2000).

A regulação da secreção e produção de celulase ocorre de três formas distintas. O nível basal de expressão para a geração de celulasas ocorre mesmo sem a presença de proteínas indutoras ou repressores catabólicos. Esse estágio ocorre de forma a auxiliar o microrganismo a encontrar fontes celulolíticas, degradando a celulose e gerando celobiose, o que leva a outra forma de produção, que é a secreção em massa induzida. Nesse estágio, algum indutor como a celobiose gera um efeito cascata aumentando a transcrição para a geração de celulase em massa,

permitindo assim que o microrganismo adquira substrato o suficiente para seu crescimento. Contudo, deve-se comentar também que o excesso de glicose pode causar uma repressão catabólica. Esta última regulação auxilia o microrganismo a não produzir celulase em abundância sem necessidade, já que o microrganismo vai ter açúcar necessário para seu metabolismo (SUTO, TOMITA, 2001).

Figura 8 – Mecanismo de ação da Endoglucanase, Exoglucanase e β -glucosidase.



Fonte: Campos (2020)

1.4.1. Classificação

1.4.1.1. Endoglucanase

As endoglucanases, ou celobiohidrolases, ou endocelulases pertencem ao mesmo grupo enzimático das exoglucanases. A forma de atuação dessas enzimas se dá através da hidrólise de ligações β -1,4 internas e aleatórias no polímero de celulose na sua região amorfa, liberando oligossacarídeos de diferentes graus de polimerização e tornando as cadeias de celulose mais suscetíveis à ação da exoglucanase (BARUQUE, 2018).

Como já é de se esperar, todas as celulases contêm um sítio ativo, contudo, ao que tange os domínios ativos das enzimas, pode-se perceber que há diferenças entre o domínio ativo das endoglucanases e das exoglucanases. No primeiro caso o sítio ativo é aberto, permitindo assim

que ela se ligue o interior das moléculas. Em contraste, a exoglucanase possui um sítio ativo em forma de túnel, para que assim possa atuar de forma mais eficiente (WILSON, 2009).

1.4.1.2. Exoglucanase

Após a atuação da endoglucanase, a exoglucanase, ou celobiohidrolase, é necessária para se prosseguir com o processo de hidrólise. Partindo tanto das extremidades não redutoras quanto das redutoras, a exoglucanase atua apenas de forma unidirecional, hidrolisando as ligações das regiões cristalinas da celulose, liberando assim celobiose como produto final da reação. É importante ressaltar que existem dois tipos de celobiohidrolases, a tipo I, que atua nos terminais redutores, e a do tipo II, que atua nos terminais não redutores e pode sofrer inibição por excesso de produto da reação, a celobiose (BON, 2008)

1.4.1.3. Beta glucosidases

As β -glucosidases, ou celobiasas, são o grupo enzimático responsável por catalisar a hidrólise da celobiose e dos oligossacarídeos solúveis em glicose. Pode-se considerar a atuação dessa enzima como a etapa limitante de um processo de hidrólise devido a quebra das ligações β -glicosídicas liberando glicose. Dessa forma, pode-se considerar que essas enzimas regulam a inibição de produto gerado pelas enzimas endoglucanase e exoglucanases. Um sistema enzimático de algum microrganismo pode não apresentar um sistema completo, o que é essencial para poder realizar uma hidrólise completa. Devido a essa ausência dessa enzima em alguns microrganismos, e algumas limitações da mesma, como o fato de não conseguir atuar em altas temperaturas, hoje busca-se microrganismos capazes de produzir essa enzima em grande quantidade ou uma forma termoestável da β -glucosidase (SRIVASTAVA, 2018).

1.5. ORGANISMOS PRODUTORES

A degradação da celulose através de enzimas hidrolíticas pode ser realizada por uma vasta variedade de microrganismos. Dentre eles pode-se citar bactérias aeróbicas e anaeróbicas como *Klebsiella ozaenae* e *Pseudomonas aeruginosa*, actinobactérias, fungos filamentosos, como *Penicillium*, *Trichoderma* e *Aspergillus* e leveduras (BEHERA; SETHI; MISHRA,

2017). As celulases podem se encontrar tanto de forma extracelular como é o caso dos fungos, ou estar presente na membrana das células, como em algumas bactérias (JUTURU; WU, 2014).

O microrganismo mais comumente utilizado para finalidade de produção de biocompostos é a bactéria Gram-Negativa *E. coli*. Existem diversos motivos para a predominância da utilização dessa bactéria em processos industriais, dentre eles pode-se citar a acelerada taxa de crescimento e a disponibilidade de uma imensa biblioteca de técnicas de biologia molecular para a edição de genes, facilidade de acesso de culturas previamente modificadas para finalidades específicas e várias técnicas para a manutenção de cultura já foram discutidas em diversos artigos. Apesar da *E. coli* ser um dos microrganismos mais amplamente utilizados, existem diversos entraves já conhecidos, como a ausência de organelas subcelulares para a atuação de enzimas eucarióticas, um baixo fluxo metabólico para a obtenção de produtos de interesse e sempre manter precaução para evitar contaminação por bacteriófagos (YANG et al., 2020). As aplicações de *E. coli* são tão investigadas que em 2020 um grupo de pesquisadores liderados por Gleizer (2019) conseguiram modificar o metabolismo da bactéria de forma a torná-la autotrófica, gerando toda sua biomassa a partir de CO₂. As bactérias mais utilizadas para a produção de celulase em escala industrial são as *Cellulomonas*, *Pseudomonas*, *Bacillus* spp. e *Thermoactinomyces* (GODANA, 2007).

Os fungos são considerados os organismos com maior potencial de produzir grandes quantidades de enzimas celulolíticas. Os gêneros *Trichoderma* e *Aspergillus* são os modelos de produtores de celulase dentre todos os fungos (SRIVASTAVA, 2018), entretanto, atualmente estuda-se sobre a potencialidade de fungos do gênero *Penicilium* para a hidrólise de biomassa vegetal (VAISHNAV, 2018). A espécie de fungo mais antiga e utilizada para a produção de celulases é a *Trichoderma reesei*, que foi descoberta durante a Segunda Guerra Mundial e até hoje é utilizada para a formulação de extratos enzimáticos nas empresas Dupont e Novozymes (PHITSUWAN et al., 2013). Essa grande capacidade de produzir enzimas se deve as propriedades bioquímicas, fisiológicas e enzimáticas desses microrganismos, o que permite que estes possam crescer e se desenvolver em substrato sólidos e utilizem esse para bioconversão, o que permite uma maior capacidade de hidrólise (SOCCOL, 1994). Outro grupo de extrema relevância são os fungos termófilos, já que são capazes de produzir celulases termoestáveis. Desse grupo, podemos citar os fungos *Sporotrichum thermofile*, *Scytalidium thermophilum*, *Humicola insolens* e os gêneros *Acremonium* e *Chrysosporium* como relevantes para a produção de celulases utilizadas nos mais diversos setores industriais, como o setor têxtil, de detergentes,

de sacarificação da celulose e produção de biocombustíveis (PHISTUWAN et al., 2013; KUMAR; SING; SINGH 2008). Além dos fungos anaeróbicos, pode-se encontrar na literatura diversas espécies de fungos anaeróbicos capazes de realizar a degradação de celulose, dentre elas podemos citar *Neocallimastix frontalis*, *N. patriciarum*, *Piromyces (Piromonas) communis*, e *Caecomyces (Sphaeromonas) communis* (KUHAD, 2016).

Apesar de não serem as maiores produtoras em quantidade de celulase, as actinobactérias apresentam uma grande possibilidade no uso de suas enzimas em processos industriais. Esses microrganismos se desenvolveram para hidrolisar biomassa de plantas em ambientes com variados teores de oxigênio, e em condições adversas de temperatura e pH, condições que podem ser comparadas às utilizadas em alguns procedimentos industriais. Alguns exemplos de microrganismos dessa classe que são pouco explorados mas apresentam um grande potencial são as bactérias termófilas *Thermobifida fusca* e *Thermomonospora curvata* que produzem enzimas termoestáveis ou *Acidothermus cellulolyticus* que é encontrada em ambientes muito ácidos. Outro importante fator que deve ser ressaltado é que devido ao fato de actinobactérias e fungos estarem associados um ao outro em algumas situações, existe potencial para unir as enzimas de ambos os microrganismos para realizar degradação de biomassa vegetal (LEWIN, 2016).

Kuhad (2016) ressalta que existem diversos processos tecnológicos atuais para otimizar a produção de enzimas (mutações aleatórias ou direcionadas, por exemplo). Apesar disso, não se deve deixar de realizar bioprospecção e técnicas de *screening* em microrganismos encontrados na natureza, já que a mesma fornece uma ferramenta crucial e única de seleção: a evolução.

1.6. ESTRATÉGIAS DE PRODUÇÃO DE BIOPRODUTOS

As enzimas responsáveis por realizar a hidrólise de materiais lignocelulósicos são amplamente estudadas desde o século XX, período o qual se desenvolve o conceito de biotecnologia. Sabe-se que o custo atrelado a produção dessas enzimas é muito alto, ainda assim pode-se reduzir drasticamente esses custos através do uso de substratos mais viáveis como resíduos agrícolas ou uso de estratégias de fermentação de baixo custo. Existem duas estratégias viáveis de fermentação: A fermentação submersa e a Fermentação em estado sólido (FES). A produção de celulase é conduzida em meio aeróbio e asséptico, este último pode ser garantido

através do uso de antibióticos, da manutenção da cultura e de técnicas de esterilização. Ademais, é necessário que os meios sejam suplementados com nutrientes e sais para que o microrganismo possa se desenvolver. Os íons necessários para a produção dessa enzima são: ferro, cobalto, cobre, magnésio, manganês, amônio, potássio e cálcio (SRIVASTAVA; MANISH, 2019).

1.6.1. Fermentação em Estado Sólido (FES)

De acordo com Marin (2019) a fermentação em Estado sólido é um processo aeróbico em ausência de água livre no qual há a degradação de um substrato orgânico de forma a obter um produto de interesse. Apesar do processo ocorrer na ausência (ou de forma limitante) de água livre, a umidade presente no meio é absorvida no substrato ou no suporte contendo o substrato (SRIVASTAVA; MANISH, 2019).

A importância histórica da FES data-se de milhares de anos atrás, quando era utilizada principalmente no processamento de alimentos como, por exemplo, na produção de queijos, pães e koji. Na conjuntura atual da tecnologia, utiliza-se esse bioprocesso para a produção de biomoléculas e de produtos de extrema importância para indústrias como a têxtil, farmacêutica, alimentícia, bioquímica e de bioenergia (SOCCOL, 2017). A maior parte dos artigos que visam produção de compostos bioativos utilizando FES são de produção de enzimas, principalmente de celulases, xilanases e proteases (KUHAD, 2016). Outros produtos de interesse são ácidos orgânicos como ácido cítrico e fumárico ou produção de pigmentos (SOCCOL, 2017).

Apesar de existirem diversas facilidades no controle de processo utilizando a fermentação submersa, há notáveis vantagens quando utiliza-se um sistema em estado sólido. Algumas que podem ser ressaltadas são: a mimetização do ambiente natural dos microrganismos, o gasto de energia em esterilização é menor devido a baixa quantidade de água, além de ser menos suscetível a contaminações e de gerar menor quantidade de água residual. No que tange a concentração final de produtos, a FES se destaca, pois permite uma maior produção enzimática e é menos suscetível à inibição pelo substrato (SINGHANIA et al., 2009).

É válido ressaltar que um dos fatores mais importantes para a condução de um processo em estado sólido é a escolha de microrganismo. Os microrganismos mais utilizados são fungos filamentosos e leveduras. Não obstante, há estudos que utilizam bactérias como *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis* e *Lactobacillus* sp, assim como actinobactérias da família Streptomycetaceae, que demonstram uma grande habilidade de produzir diversas enzimas, colonizar ambientes e aguentar condições extremas (FARINAS, 2015).

Seguindo ainda os estudos de Farinas (2015) sobre FES, outro fator decisivo para uma boa condução deste bioprocessos é a escolha de um substrato adequado. Geralmente resíduos agroindustriais são a escolha ideal devido ao seu baixo custo, entretanto, outros fatores como área superficial, de contato, cristalinidade e porosidade tem que ser levados em consideração. Esses substratos além de atuarem como fonte de carbono e nitrogênio, funcionam como um suporte para os nutrientes e crescimento dos microrganismos. Além disso, por vezes é necessário a adição de micro e macronutrientes para suplementar o desenvolvimento do microrganismo.

Existem diversos tipos de biorreatores de FES. Estes podem ser classificados de acordo com diversos parâmetros do processo, como o tipo de agitação (leito fixo, bandeja, tambor horizontal ou vertical). Um exemplo de reator de bandeja está na Figura 9. Outra forma de definir-los é com base na aeração (com ou sem aeração forçada) (SOCCOL, 2017).

O *Scale-up* de um processo em estado sólido ainda é um campo de estudo pouco explorado. Devido a dificuldades como a heterogeneidade do sistema e a dissipação de calor, aspectos da engenharia ainda tem que ser estudados de forma a conseguir gerar uma metodologia confiável de forma a escalonar um processo (SINGHANIA, 2009).

Figura 9 – Modelo de reator de Fermentação de Estado Sólido de bandeja.



Fonte: Indiamart (2020).

1.6.2. Fermentação submersa (FS)

A fermentação submersa consiste em um processo fermentativo na presença de água em excesso. Os primeiros registros que se tem do uso de fermentação submersa em produção comercial são do início da década de 1970, onde celulase produzida em escala piloto era vendida, já um grande aumento da produção começou na metade dos anos 80, quando a celulase começou a ser utilizada na indústria têxtil (TOLAN; FOODY, 1999). Devido há anos de estudos científicos sobre essa forma de condução, atualmente esse é o método de produção enzimático mais utilizado devido a facilidade que se tem em controlar e monitorar diversos parâmetros cruciais, como temperatura, aeração e pH (SINGHANIA, 2010). Atualmente, os tipos de biorreatores empregados para a produção de celulase por via de fermentação submersa são o Airlift, Coluna de bolhas e Reator de agitação perfeita, sendo que dentre esses o último é o que apresenta melhor eficiência. Um exemplo de reator de Fermentação submersa encontra-se na Figura 10 (RAMESH et al., 2019).

Figura 10 – Reator de Fermentação Submersa.



Fonte: Indiamart, 2020.

1.6.3. Comparação entre os diferentes tipos de biorreatores

Deve-se levar em consideração diversos aspectos de forma a selecionar a forma de condução do bioprocessamento e o tipo de reator ideal. Abaixo, a Tabela 1 formulada por Rameash et al. (2019) indica a dificuldade atrelada a alguns tópicos relevantes a escolha do reator.

Tabela 1 – Particularidades e dificuldades de implementação de processos para diferentes tipos de reatores.

Particularidade	Fermentação em Estado Sólido (FES)			Fermentação Submersa (FS)			
	Bandeja	Leito empacotado	Rotativo	Leito fluidizado	Tanque com agitação	Airlift	Coluna de bolhas
Design e fabricação do reator	Simple	Simple	Médio	Difícil	Difícil	Difícil	Difícil
Esterilização	Difícil	Difícil	Difícil	Médio	Médio	Médio	Médio
Scale-up	Difícil	Difícil	Difícil	Difícil	Médio	Difícil	Difícil
Controle de temperatura	Difícil	Difícil	Médio	Médio	Simple	Simple	Simple
Energia	Pouco intensa	Intensa	Intensa	Intensa	Intensa	Intensa	Intensa
Espaço necessário	Grande	Pequeno	Grande	Pequeno	Pequeno	Pequeno	Pequeno
Aeração	Natural	Forçada	Forçada	Forçada	Forçada	Forçada	Forçada
Dano ao microrganismo	Nulo	Nulo	Baixo	Baixo	Baixo	Médio	Médio
Modo de operação	Batelada	Batelada	Continua Ou batelada	Continua Ou batelada	Continua Ou batelada	Continua Ou batelada	Continua Ou batelada

Fonte: Rameash et al. (2019).

1.7. APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS DAS CELULASES

Atualmente, o impacto da biotecnologia pode ser sentido principalmente na área de aplicações de enzimas em escala industrial. Através de metodologias para o desenvolvimento dessas, o papel que estes bioprodutos apresentam como catalisadores em diversos processos, é cada vez maior. Enzimas apresentam diversas vantagens quando comparadas aos catalisadores químicos tradicionais, já que elas são derivadas de fontes renováveis, são biodegradáveis, podem atuar em condições leves de temperatura e pH, além de apresentar maior seletividade (CHERRY; FIDANSET, 2003).

Devido a sua grande importância em diversos setores industriais, esses compostos são objetos de estudo de diversas pesquisas acadêmicas e na parte de pesquisa e desenvolvimento de empresas (KUHAD, 2011). As enzimas celulolíticas estão no mercado há mais de 30 anos sendo as empresas Novozymes e DuPont as maiores produtoras. Os maiores campos de atuação onde há a catálise de materiais lignocelulolíticos são os setores têxteis, alimentícios, de ração, de papel e celulose e de combustíveis (JAYASEKARA, 2019).

A indústria de papel e polpa, um dos maiores setores industriais do planeta, tem um interesse muito grande na utilização de celulases em seus processos. A aplicação dessas enzimas no processo de polpação resultou em uma redução de gasto de energia e em uma melhor qualidade do material, quando comparado ao procedimento de polpação tradicional. Outros importantes procedimentos que podem ser melhorados através do auxílio de enzimas são: o branqueamento da polpa, diminuição da viscosidade de materiais, reduz-se a chance de ocorrer problemas na drenagem e geração um impacto ambiental menor (IMRAN, 2019).

Outro setor de destaque de estudo na aplicação de celulases é o de produção de bioetanol. Atualmente, a bioconversão de material lignocelulósico em produtos de interesse é um processo com múltiplas etapas, que incluem pré-tratamento da biomassa, hidrólise de polímeros e separação e purificação dos produtos. Atualmente, existem ainda alguns entraves nesse processo, como a recalcitrância do substrato, inibição por substrato e alto custo (KUHAD, 2011). Essa é uma das áreas mais interessantes pra o desenvolvimento de celulases já que o mercado de biocombustíveis tem um crescimento previsto de novecentos e cinquenta milhões

de dólares até o ano 2024, com o crescimento promovido principalmente pelo Brasil, Estados Unidos e França (SIQUEIRA et al., 2020).

Ainda de acordo com Kuhad (2011), outro setor onde o uso de celulases traz diversos benefícios é o de ração animal. A utilização de enzimas tem demonstrado uma maior qualidade nutricional e na performance de diversos seres vivos. Pode-se atingir melhores parâmetros alimentares removendo fatores anti-nutricionais presentes nos grãos, utilizando a própria celulase como um suplemento digestivo. Outra questão que realça a importância desses compostos na pecuária é o uso deles de forma a controlar as doenças intestinais no setor pecuário, o que é extremamente necessário, já que é proibido o uso de antibióticos nutricionais em diversos países.

Conversando ainda com a parte de alimentação, as celulases podem ser utilizadas na indústria alimentícia para diversos processos. De forma a aumentar o rendimento de sucos ou néctares, pode-se utilizar uma combinação de enzimática chamada de enzimas de maceração (celulases, pectinases e xilanases) após o processo de esmagamento, aumentando assim a liquefação. Outra aplicação é na extração de azeite de oliva, no qual a combinação de celulases, pectinases e hemicelulases permite que substâncias nobres atravessem com maior facilidade a parede celular das plantas. Outras aplicações onde se observa um impacto positivo no emprego de celulases são: clareamento de sucos, melhora na textura de produtos de panificação, aumento do aroma em vinhos e no auxílio do processo de maltagem (SOARES, 2016).

Por fim, não se deve deixar de comentar sobre o uso de celulases na indústria têxtil. Essas são utilizadas como ferramentas para trabalhar o acabamento de diversos materiais e para poder criar novos tipos de tecido. Sua primeira aplicação foi em 1980 para a finalização de Jeans, dando um aspecto de mais velho e usado nas calças, processo conhecido como biopolimento (*biostoning*). Aplicações modernas constituem no uso de descoloração de alguns materiais e na remoção de pequenas fibras na superfície, conferindo assim maior brilho, maciez e absorção de umidade. É importante ressaltar que a hidrólise nesses processos tem que sempre ocorrer de forma controlada, prevenindo assim que o tecido fique fraco ou muito leve (MIETTINEN-OINONEN, 2007).

2. OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivo utilizar uma actinobactéria isolada de um ambiente costeiro com baixo impacto antrópico para a produção de celulases através de diferentes formas de condução.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Isolar linhagens de actinobacterias a partir de amostras ambientais de solo e sedimento da Restinga de Marambaia;
- II. Avaliar o potencial celulolítico e amilolítico das linhagens isoladas, selecionando a mais promissora para estudos posteriores;
- III. Avaliar a capacidade da linhagem promissora em produzir celulases por processo fermentativo, em Estado Sólido (FES) e Submersa (FS) utilizando como substrato bagaço de cana *in natura* e bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor;
- IV. Quantificar e avaliar as atividades enzimáticas (FPase e CMCase) dos extratos obtidos das fermentações anteriores.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MICRORGANISMOS: COLEÇÃO DE CULTURA E ISOLAMENTO

Nove amostras de solo foram coletadas na região da Restinga de Marambaia. Foram selecionados locais promissores para a existência de microrganismos, dentre eles sedimentos de manguezal, areia com lodo de manguezal e areia de praia. Abaixo estão expostas fotos de alguns locais de coleta.

Figura 11 – Local de coleta de sedimento de Manguezal.



Figura 12 – Local de coleta de amostra de sedimento misto.

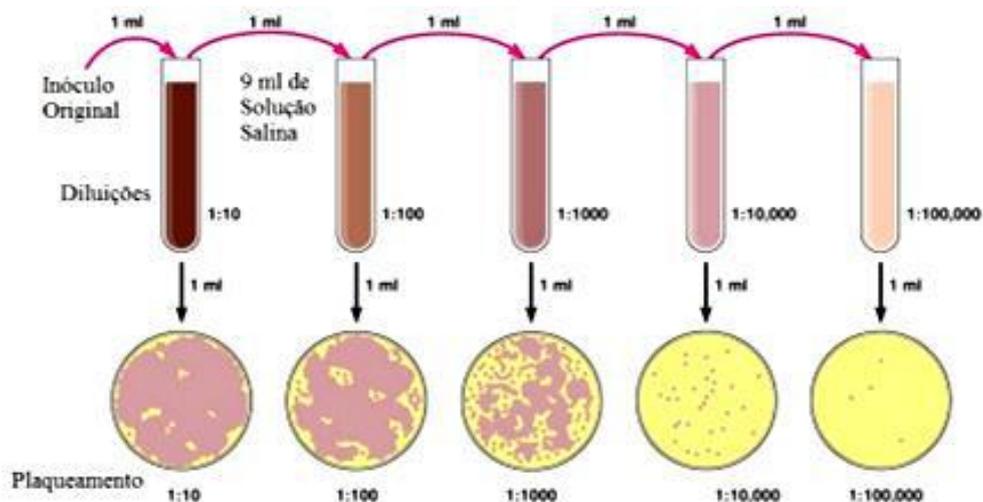


Figura 13 – Local de coleta de amostra de sedimento arenoso.



Estas amostras foram diluídas em solução salina através do procedimento de diluição seriada, com diluições de 10^{-1} até 10^{-4} utilizando 5g de solo, como mostra a figura 14. Em seguida, selecionou-se a amostra mais diluída e adicionou-se 100 μ L dessa diluição em uma placa contendo Meio de Isolamento de Actinobacteria (AIA) e em seguida incubadas a 28°C. Após um período de sete dias, quando já é possível ver o crescimento do microrganismo, isolou-se o mesmo até obter uma cultura pura.

Figura 14 – Esquema demonstrando técnica de diluição seriada e plaqueamento por *spreadplate*.



Fonte: Tortora (2013).

3.2. CONSERVAÇÃO

Todas as actinobactérias purificadas e isoladas foram armazenadas em solução de glicerol 20% dentro de criotubos e mantidas em um congelador a -20°C.

3.3. SCREENING ENZIMÁTICO

Actinobactérias isoladas da Restinga de Marambaia foram crescidas em meio ISP-2, incubadas a 28°C por 10 dias e após esse período uma alçada foi transferida para meio Agar sais minerais (BRECCIA et al., 1995) suplementado com 1% (p/v) carboximetilcelulose ou 1% (p/v) amido solúvel. Após dez dias de incubação à 28°C, as zonas de hidrólise de celulase e amilase foram reveladas com soluções específicas, através da adição de solução Vermelho Congo (0,5% p/v) para celulase, seguida de lavagens com solução de NaCl 1M para melhor visualização das zonas de hidrólise, e adição de solução lugol para amilase, com visualização imediata das zonas de hidrólise. O cálculo do índice enzimático utilizado foi o da equação 1. A amostra com maior potencial celulolítico foi selecionada para as etapas posteriores.

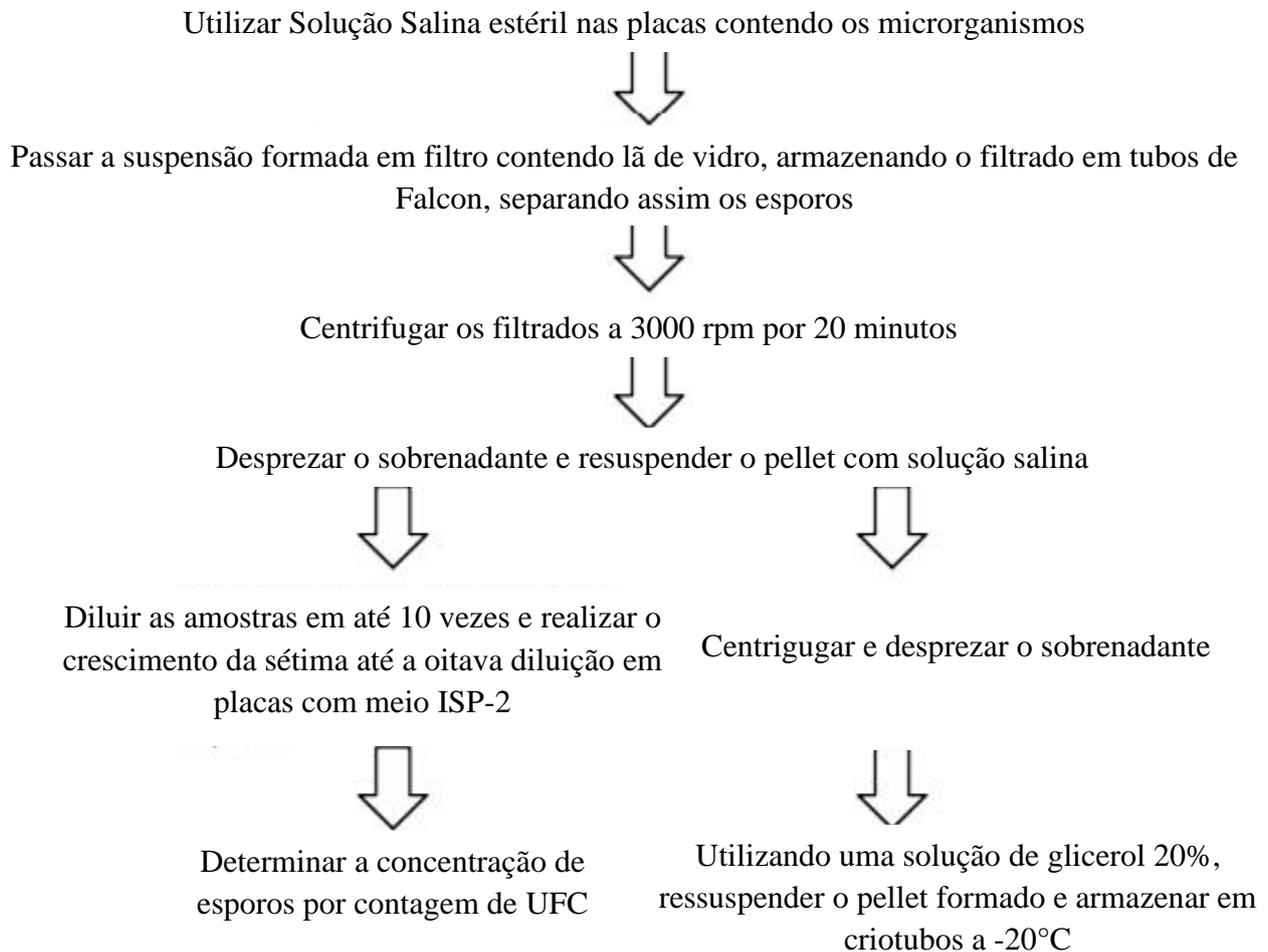
Equação 1 – Equação para o cálculo de índice enzimático.

$$\text{Índice enzimático} = \frac{\text{Diâmetro do Halo} + \text{Colônia}}{\text{Diâmetro da colônia}}$$

3.4. SUSPENSÃO E CONTAGEM DE ESPOROS

O microrganismo foi crescido em meio ISP-2 pH 7,0 por uma semana a 28°C, quando já era possível ver a presença de micélio aéreo. O método utilizado nessa etapa é o protocolo desenvolvido por Hopwood (1970) e descrito no Esquema 1.

Esquema 1 – Preparação de uma suspensão de esporos.



Fonte: Hopwood (1970), adaptado de Nascimento (2002).

Algumas técnicas de microbiologia são utilizadas de forma a evitar contaminação da suspensão como: utilização de antifúngicos e antibióticos, e espalhamento. A concentração das suspensões de esporo foi calculada a partir do método de contagem de unidades formadoras de colônias (UFC/mL). Caso fosse encontrada alguma contaminação, a suspensão era descartada e uma nova deveria ser feita, para garantir o grau de pureza da suspensão de esporos.

3.5. CURVA DE CRESCIMENTO

Dez Erlenmeyers de 100mL contendo 20mL de meio com sais mineirais e milhocina e uma alíquota da suspensão de 84µL de esporos do microrganismo foram incubados em agitação orbital (180 rpm) por 5 dias a 28°C. A cada dia, dois Erlenmeyers foram retirados e filtrados por um cadinho, retendo o microrganismo, em seguida foram pesados, a fim de determinar a massa de microrganismo em cada dia. Por fim, com os dados obtidos, plota-se um gráfico de massa por dia a fim de identificar até que momento o microrganismo está em estágio exponencial de crescimento.

3.6. PROCESSO FERMENTATIVO

3.6.1. Fermentação em estado sólido (FES)

Uma suspensão de esporos padronizada (2×10^8 UFC/mL) da linhagem AM4-6 foi inoculada inicialmente em frascos cônicos (100 mL) contendo meio de sais suplementado com milhocina e incubados em agitador orbital, 200 rpm a 28°C por 36 horas. Após esse período, todo o conteúdo dos Erlenmeyers foi transferido para frascos cônicos (250 mL) contendo 5 g de substrato (bagaço de cana *in natura* e pré-tratado explosão a vapor), sendo os frascos incubados por 7 dias a 28°C. Foram avaliadas 2 razões sólido:líquido (1:2 e 1:3) e o sistema fermentativo foi realizado em triplicata.

A extração da enzima foi realizada através da adição de 50 mL de uma solução salina 0,8% (p/v) nos frascos cônicos, seguida de agitação (180 rpm) por 20 minutos, centrifugação (2.560 g / 10 min) e filtração em filtros de vidro sinterizado. Ao todo, foram realizadas 2 extrações da biomassa lignocelulósica fermentada.

3.6.2. Fermentação submersa (FS)

Uma suspensão de esporos padronizada (2×10^8 UFC/mL) da linhagem selecionada foi inoculada em um frasco cônico de 125 mL contendo 25 mL de meio de meio de sais suplementado com 2,0% (p/v) de bagaço de cana (in natura ou pré-tratado) e 1,0% (p/v)

milhocina. O sistema foi incubado a 28°C por 5 dias em um shaker orbital a 180 rpm. Alíquotas foram retiradas diariamente para análises posteriores.

3.7. ENSAIOS ANALÍTICOS

3.7.1. Atividade enzimática

Os procedimentos para a determinação das atividades enzimáticas de FPase (Celulases totais) e CMCase (Endoglucanase) foram conduzidos de acordo com a metodologia padrão descrita pela IUPAC. A unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de glicose gerada em μmol por minuto de reação. Todos os ensaios foram conduzidos em duplicata e contendo uma amostra onde não houve reação enzimática.

3.7.2. Atividade de CMCase (endoglucanase)

A determinação da atividade de Endoglucanase (CMCase) foi conduzida de acordo com metodologia descrita por Ghose (1987). Nesse protocolo, quantifica-se a quantidade de açúcares redutores gerados a partir de 0,05 mL de extrato enzimático na presença de 0,05 mL de Carboximetil celulose de baixa viscosidade (CMC) 2% em tampão citrato de sódio 50 mM pH 4,8. O sistema foi incubado a 50°C por 15 minutos e a reação enzimática foi interrompida adicionando 0,3 mL de DNS. Foram utilizados dois controles, um contendo apenas DNS e o tampão para zerar o espectrofotômetro e outro onde não ocorre a reação enzimática.

3.7.3. Atividade de FPase (celulase total)

A determinação da atividade de celulases totais (FPase) foi conduzida de acordo com metodologia descrita por Ghose (1987). Nesse protocolo, quantifica-se a quantidade de açúcares redutores gerados a partir da reação entre de 0,5 mL de extrato enzimático na presença de 0,5 mL tampão citrato de sódio 50 mM pH 4,8 e utilizando como substrato um papel de filtro de dimensão 1 cm x 6 cm enrolado, de forma a aumentar sua superfície de contato. O sistema foi incubado a 50°C por 60 minutos e a reação enzimática foi interrompida adicionando 1 mL de DNS. Foram utilizados dois controles, um contendo apenas DNS e o tampão para zerar o espectrofotômetro e outro onde não ocorre a reação enzimática.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. COLETA E ISOLAMENTO

A partir de diferentes amostras de solo e sedimento coletados na região da Restinga de Marambaia foi possível isolar 114 linhagens diferentes de microrganismos, de acordo com as características fenotípicas.

4.2. SCREENING ENZIMÁTICO

A avaliação do potencial enzimático para a produção de celulases foi realizada nas 114 linhagens de actinobactérias isoladas da Restinga de Marambaia. Na tabela a seguir é possível encontrar todas as linhagens que apresentaram atividade enzimática para amilase e celulase, ou que no momento do isolamento foram classificadas erroneamente (como bactérias ou fungos), divididas por local de coleta na Restinga de Marambaia. Os microrganismos marcados com N.D. (Não determinado) consistem de contaminações no criotubo que impediram do microrganismo poder se desenvolver nos meios de cultura.

Tabela 2 – Perfil enzimático das actinobactérias presentes nas diversas amostras de solo.

Local de Coleta	Amostra	Linhagem	Perfil Enzimático (+ ou -)	
			Amilase	Celulase
	1	AM1 - 6	N.D.	N.D.
	1	AM1 - 7	+	-
	1	AM1 - 8	N.D.	N.D.
Sedimento de Manguezal	1	AIM1 - 1	N.D.	N.D.
	1	AIM1 - 4	+	-
	1	AIM1 - 6	N.D.	N.D.
	1	AM1 - 9	+	-

Local de Coleta	Amostra	Linhagem	Perfil Enzimático (+ ou -)	
			Amilase	Celulase
Sedimento de Manguezal	2	AIM2 - 2	-	-
	2	AIM2 - 3	+	+
	2	AIM2 - 4	N.D.	N.D.
	2	AIM2 - 7	N.D.	N.D.
	3	AM3 - 7	+	-
	3	AM3 - 8	N.D.	N.D.
	3	AM3 - 10	+	-
	3	AM3 - 11	+	+
Sedimento misto	3	AM3 - 15	N.D.	N.D.
	3	AM3 - 17	+	-
	3	AM3 - 31	+	-
	3	AM3 - 35	+	-
	3	AIM3 - 1	+	-
	3	AIM3 - 2	+	-
	3	AIM3 - 7	-	-
	3	AIM3 - 8	+	-
	3	AIM3 - 11	N.D.	N.D.
	3	AIM3 - 16	+	+
Areia de praia	4	AM4 - 1	+	+
	4	AM4 - 2	+	+
	4	AM4 - 5	+	-
	4	AM4 - 6	+	+
	4	AM4 - 7	+	-
	4	AM4 - 8	+	-

Local de Coleta	Amostra	Linhagem	Perfil Enzimático (+ ou -)	
			Amilase	Celulase
	4	AM4 - 9	+	+
	4	AM4 - 10	+	+
	4	AM4 - 11	+	+
	4	AM4 - 12	+	+
	4	AM4 - 13	+	+
	4	AM4 - 14	+	+
	4	AM4 - 15	N.D.	N.D.
	4	AM4 - 16	+	-
	4	AM4 - 17	+	-
	4	AM4 - 18	+	-
	4	AM4 - 19	+	-
	4	AM4 - 20	N.D.	N.D.
	4	AM4 - 21	+	+
	4	AM4 - 22	+	+
	4	AM4 - 23	+	+
	4	AM4 - 24	+	-
	4	AM4 - 25	+	-
	4	AM4 - 26	+	+
	4	AM4 - 30	+	-
	4	AIM4 - 4	-	-
	4	AIM4 - 13	N.D.	N.D.
	4	AIM4 - 15	N.D.	N.D.
	4	AIM4 - 20	+	+
	4	AIM4 - 21	+	+

Local de Coleta	Amostra	Linhagem	Perfil Enzimático (+ ou -)	
			Amilase	Celulase
	4	AIM4 - 22	+	+
	4	AIM4 - 25	+	+
	4	AIM4 - 29	N.D.	N.D.
	4	AIM4 - 32	+	+
	4	AIM4 - 35	+	+
	4	AIM4 - 36	N.D.	N.D.
	4	AIM4 - 37	N.D.	N.D.
	4	AIM4 - 38	+	+
	5	AM5 - 1	N.D.	N.D.
	5	AM5 - 3	N.D.	N.D.
	5	AM5 - 4	N.D.	N.D.
	5	AM5 - 5	N.D.	N.D.
	5	AM5 - 6	+	+
	5	AM5 - 7	+	-
Areia de praia	5	AM5 - 8	+	-
	5	AM5 - 11	N.D.	N.D.
	5	AIM5 - 2A	+	+
	5	AIM5 - 2D	+	+
	5	AIM5 - 6	+	-
	5	AIM5 - 8	+	-
	5	AIM5 - 26	N.D.	N.D.
	6	AM6 - 2	+	-
Areia de praia	6	AM6 - 3	N.D.	N.D.
	6	AM6 - 4	+	-

Local de Coleta	Amostra	Linhagem	Perfil Enzimático (+ ou -)	
			Amilase	Celulase
	6	AM6 - 5	N.D.	N.D.
	6	AM6 - 6	+	+
	6	AM6 - 7	N.D.	N.D.
	6	AM6 - 9	N.D.	N.D.
	6	AM6 - 10	+	+
	6	AM6 - 12	N.D.	N.D.
	6	AM6 - 13	+	+
	6	AM6 - 15	N.D.	N.D.
	6	AM6 - 16	+	-
	6	AM6 - 19	N.D.	N.D.
	6	AM6 - 22	+	-
	6	AM6 - 27	+	+
	6	AM6 - 28	N.D.	N.D.
	6	AM6 - 29	N.D.	N.D.
	6	AM6 - 30	+	-
	6	AIM6 - 5	+	+
	6	AIM6 - 6	N.D.	N.D.
	6	AIM6 - 9	+	+
	6	AIM6 - 10	+	+
	6	AIM6 - 12	+	+
	6	AIM6 - 17	+	+
	6	AIM6 - 18	N.D.	N.D.
	6	AIM6 - 20	+	+
	6	AIM6 - 23	+	+

Local de Coleta	Amostra	Linhagem	Perfil Enzimático (+ ou -)	
			Amilase	Celulase
	6	AIM6 - 24	+	+
	6	AIM6 - 27	N.D.	N.D.
	6	AIM6 - 31	+	+
	6	AIM6 - 32	+	-
	6	AIM6 - 33	N.D.	N.D.
	7	AM7 - 1	N.D.	N.D.
	7	AM7 - 2	N.D.	N.D.
Areia de praia	7	AM7 - 4	N.D.	N.D.
	7	AM7 - 8	N.D.	N.D.
	7	AIM7 - 11	N.D.	N.D.
	8	AM8 - 1	+	+
	8	AM8 - 2	+	+
	8	AM8 - 3	+	+
	8	AM8 - 4	+	+
	8	AM8 - 5	-	-
	8	AM8 - 6	+	+
	8	AM8 - 7	+	-
Areia de praia	8	AM8 - 8	-	-
	8	AM8 - 9	+	+
	8	AM8 - 10	+	+
	8	AM8 - 11	+	+
	8	AM8 - 12	+	+
	8	AM8 - 13	+	+
	8	AM8 - 14	+	+

Local de Coleta	Amostra	Linhagem	Perfil Enzimático (+ ou -)	
			Amilase	Celulase
	8	AM8 - 15	+	+
	8	AM8 - 16	+	+
	8	AM8 - 17	N.D.	N.D.
	8	AM8 - 18	+	+
	8	AM8 - 19	+	-
	8	AM8 - 20	N.D.	N.D.
	8	AM8 - 21	+	+
	8	AM8 - 22	+	+
	8	AM8 - 23	-	+
	8	AM8 - 24	+	+
	8	AM8 - 25	+	+
	8	AM8 - 26	+	+
	8	AM8 - 27	+	+
	8	AM8 - 28	+	+
	8	AM8 - 29	+	+
	8	AM8 - 31	+	+
	8	AM8 - 32	N.D.	N.D.
	9	AM9 - 1	+	+
	9	AM9 - 2	N.D.	N.D.
	9	AM9 - 3	+	+
	9	AM9 - 4	+	+
	9	AM9 - 5	N.D.	N.D.
	9	AM9 - 6	+	-

A amostra de solo 4 foi a que apresentou melhor resultado quanto ao potencial de degradação de celulases e amilases pelas linhagens isoladas. Considerando que a área de coleta estava bem próxima de fontes de celulose e amido, como plantas baixas, folhas no chão e raízes, não surpreende que esta foi a região com maiores produtores das enzimas. Além disso, a alta taxa de actinobactérias pode indicar que como existe muita competitividade entre os microrganismos, indicando que eles tiveram de se adaptar a gerar grandes quantidades de enzimas para conseguirem alimento.

Dentre essas amostras foram identificadas 6 actinobactérias promissoras para a produção de enzimas celulolíticas e amilolíticas. As tabelas a seguir oferecem uma relação dessas linhagens e seus respectivos desempenhos nivelados pela metodologia apresentada na seção anterior.

Tabela 3 – Actinobactérias que apresentaram as maiores atividades enzimáticas de celulase.

Isolado	Atividade enzimática de celulase		
	Diâmetro da colônia (cm)	Diâmetro do halo + colônia (cm)	Índice enzimático
AM4-2	0,9 / 1,2	3,6 / 3,7	3,5
AM4-6	0,8 / 0,7	4,0 / 3,8	5,2
AM4-10	1,1 / 0,9	3,9 / 3,8	3,75

Tabela 4 – Actinobactérias que apresentaram as maiores atividades enzimáticas de amilase.

Código	Atividade enzimática de Amilase		
	Diâmetro da colônia (cm)	Diâmetro do halo + colônia (cm)	Índice enzimático
AM4-1	0,9 / 1,2	3,6 / 3,7	3,5
AM4-12	0,8 / 0,7	4,0 / 3,8	3,7
AIM4-32	1,1 / 0,9	3,9 / 3,8	3,6

As imagens das placas contendo as linhagens mais promissoras submetidas aos *screenings* enzimáticos de celulase e amilase estão abaixo:

Figura 15 – Placas de meio de sais com CMC contendo a zona de hidrólise após a adição do vermelho congo.

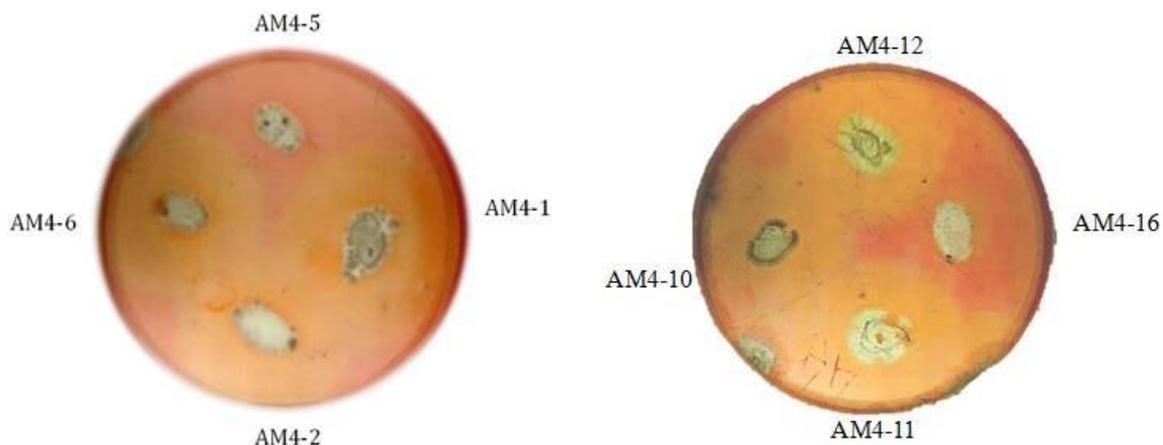
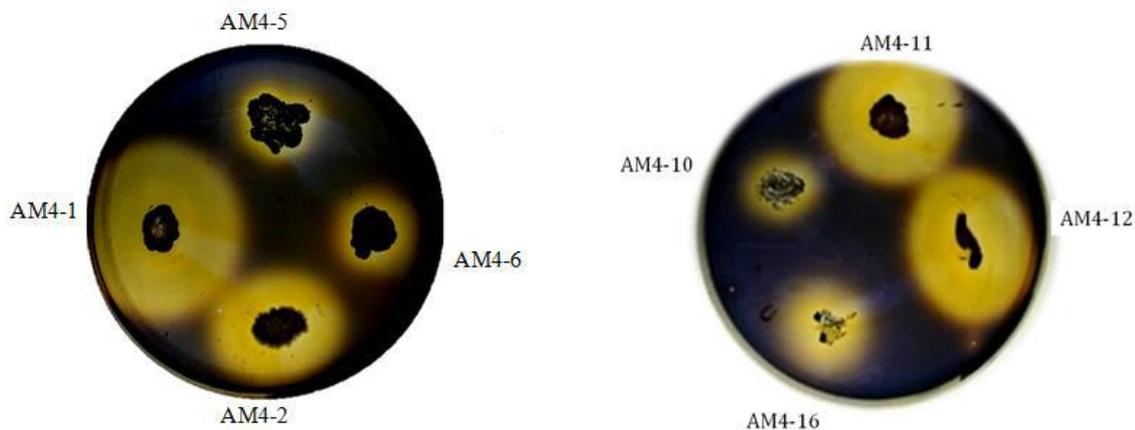


Figura 16 – Placas de meio de sais com amido contendo a zona de hidrólise após a adição de lugol.



Quando comparados aos resultados obtidos por Rajagopal e Kannan (2017) para a avaliação de potenciais produtores de celulose, foi possível observar que a dimensão da zona de hidrólise foi de aproximadamente 2,3 cm para a actinobactéria mais promissora. Em contrapartida, para a linhagem *Streptomyces* sp. AM4-6, a zona de hidrólise obtida teve um diâmetro médio de 3,9, aproximadamente o dobro do que o observado por Rajagopal e Kannan (2017). Além disso, vale ressaltar que o artigo em questão não aborda a questão do tamanho da colônia no cálculo do valor de índice enzimático, sendo que esse índice é de extrema relevância, tendo em vista que reduz o erro atrelado ao experimento. Por exemplo, 2 actinobactérias que

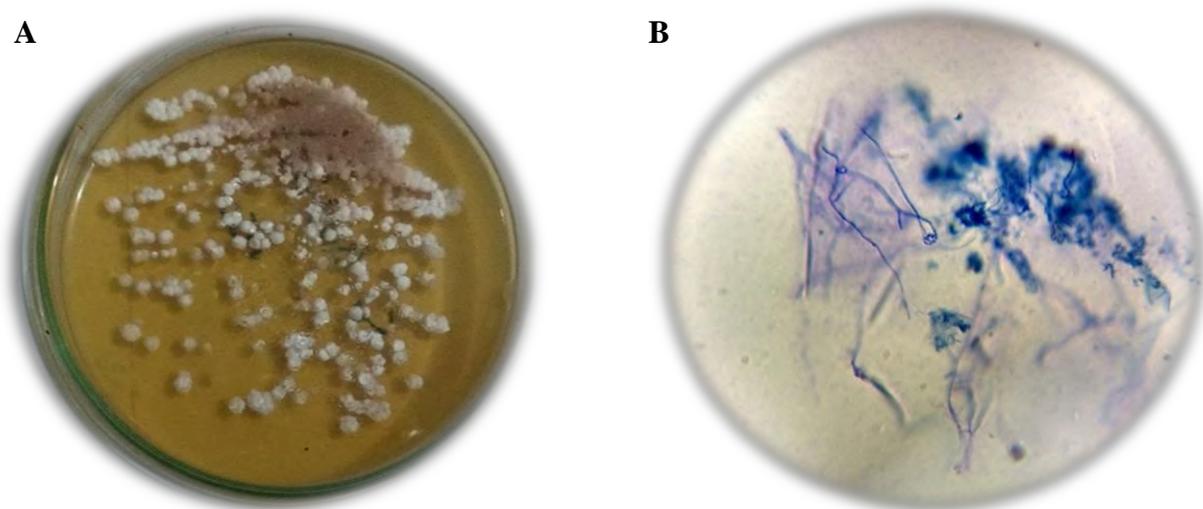
geram zonas de hidrólise de mesmo tamanho, mas possuem diâmetros de colônia diferente, apresentaram diferentes valores de índice enzimático. Kausar, Sariah e Mohd (2010) afirmam ter encontrado zonas de degradação de aproximadamente 9 mm, contudo, não apresentam valores de índice enzimático ou do diâmetro de colônia. A pesquisa conduzida por Li e colaboradores utilizando bactérias isoladas do intestino de mini porcos indicou também um índice enzimático bem menor dos que o encontrado neste trabalho, sendo os mais elevados variando de 1,92 até 2,33.

Outros artigos utilizam a mesma metodologia de *screening* tanto para a identificação de microrganismos produtores de celulase quanto de amilase, contudo, nenhum apresenta valores encontrados de diâmetro da zona de hidrólise ou de índice enzimático, focando apenas se o microrganismo possui ou não atividade para a enzima, como é possível observar na literatura (SELVAM, 2011) ou o previamente citado.

4.3. MICRORGANISMO

As características macroscópicas da linhagem AM4-6 estão demonstradas na Figura 17A. O crescimento médio em meio sólido (Agar ISP-2) ocorreu após 3 dias de incubação a 28°C, com micélio vegetativo na cor branca e o micélio aéreo com tons cinza-amarronzado. As características microscópicas da linhagem estão demonstradas na Figura 17B, onde é possível observar cadeia de esporos em espiral e células filamentosas, comuns ao gênero *Streptomyces*.

Figura 17 – Características Macroscópicas (A) e Microscópicas (B) da linhagem AM4-6 crescida em placa contendo meio agar ISP-2, após 3 dias a 28°C.



4.4. SUSPENSÃO DE ESPOROS

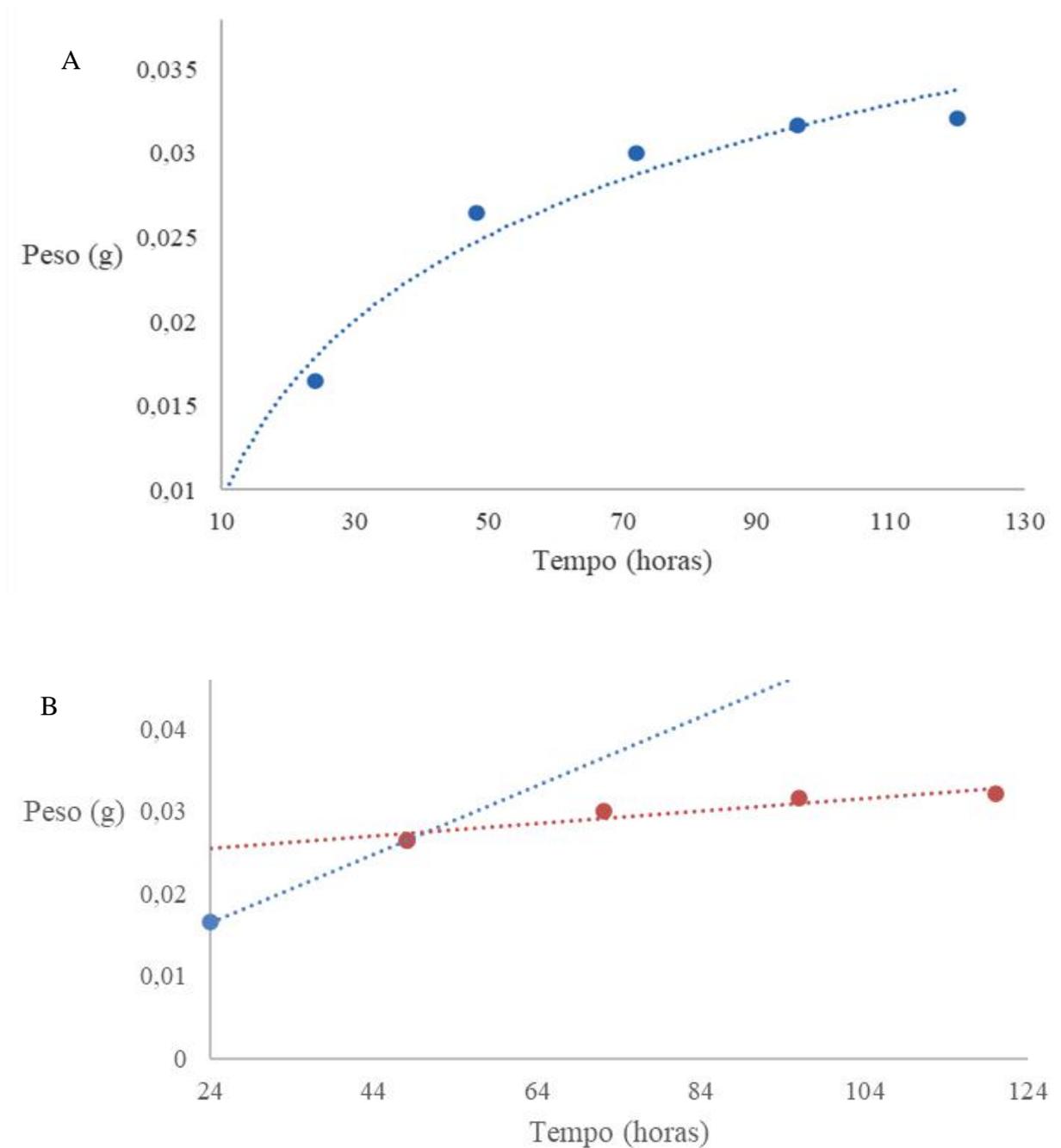
Após uma análise dos dados de índice enzimático, a linhagem *Streptomyces* sp. AM4-6 foi selecionada como a mais promissora. Para a condução dos experimentos é necessário a realização de uma solução padronizada de esporos. Durante muito tempo a suspensão estava inválida pela presença de microrganismos contaminantes no meio, o que tornaria os experimentos posteriores inconclusivos, já que o microrganismo contaminante poderia apresentar ação celulolítica ou até impedir o crescimento da actinobactéria. Portanto, foi necessária uma longa etapa de purificação, começando pela identificação do organismo contaminante. Através de técnicas de microscopia, evidenciou-se que o contaminante era uma bactéria Gram-negativa. Foram testadas diversas técnicas de microbiologia para a purificação de microrganismos, como diluição seriada e a técnica de espalhamento. Contudo, nenhuma se mostrou tão eficaz quanto o uso de antibióticos. Após inocular a actinobactéria em um meio ISP-2, utilizou-se discos contendo os seguintes antibióticos: Penicilina (10 MCG), Oxacilina (1 MCG), Tetraciclina (30 MCG), Clindamicina (2 MCG), Rifamicina (30 MCG), Eritromicina (10 MCG), Vancomicina (30 MCG), Bacitracina (4 MCG), Neomicina (30 MCG) e Gentamicina (10 MCG), de forma a obter uma cultura pura. O mais eficaz foi a tetraciclina, pois permitiu o crescimento da actinobactéria e impediu o desenvolvimento da bactéria contaminante. Por fim, foi possível a obtenção de uma cultura sem contaminantes, daí pode-se realizar as etapas de suspensão e contagem de esporos. A suspensão apresentou uma carga de esporos de $2,07 \cdot 10^8$ e o cálculo da mesma foi realizado utilizando o método de U.F.C.

4.5. CURVA DE CRESCIMENTO

A partir da avaliação da biomassa por peso seco, foi gerado um gráfico de crescimento do microrganismo. Sabendo-se que o crescimento microbiano deve ser plotado em função logarítmica, é possível avaliar os estágios de crescimento de um microorganismo por modelos matemáticos. Além disso, sabe-se que o momento mais interessante para o inóculo, podendo assim conduzir um bioprocessamento otimizado é quando o microorganismo está em seu estágio exponencial (PELEG, CORRADINI, 2011). Tendo posse dessas informações, realizando uma breve análise do gráfico, fica evidente que o tempo necessário de pré inóculo para que o microrganismo possa se desenvolver bem durante as posteriores etapas fermentativas é de

aproximadamente 36 horas, já que antes o microrganismo está ainda em fase exponencial e depois desse tempo, em torno de 48 horas, o microrganismo está em sua fase estacionária de crescimento.

Figura 18 – Massa seca da biomassa do microrganismo em relação ao tempo em escala logarítmica (A) e Massa seca da biomassa do microrganismo em relação ao tempo indicando o estado estacionário atingido após 48 horas de fermentação (B).



4.6. FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

Algumas observações podem ser feitas, no que se diz respeito ao crescimento da actinobactéria em meio sólido. A partir do segundo dia começavam a aparecer os primeiros sinais das colônias para ambos os substratos. Contudo, a partir do terceiro dia fica evidente como o microrganismo pôde se desenvolver melhor no bagaço de cana tratado, já que devido ao pré tratamento da biomassa, o acesso ao substrato é mais facilitado, tendo basicamente dominado o substrato, enquanto no bagaço de cana, ficam evidentes apenas algumas colônias pontuais. Comparando o desenvolvimento macroscópico em diferentes razões sólido:líquido, não houve diferenças significativas observadas. Por fim, não fiou evidenciado nenhuma mudança de cor, toda actinobactéria estava na cor branca.

Figura 19 – Crescimento macroscópico da actinobactéria AM4-6 após 7 dias de crescimento em bagaço de cana tratado (esquerda) e bagaço de cana in natura (direita).



4.7. FERMENTAÇÃO SUBMERSA

Para a fermentação submersa, também pode-se realizar algumas análises. Como era de se esperar, para ambos os substratos, o microrganismo desenvolveu-se mais na região onde o substrato insolúvel aderiu-se ao vidro, já que actinobactérias tendem a preferir se desenvolver em regiões estáticas. No bagaço tratado, ficou evidente o crescimento no meio líquido, contudo, no outro substrato não foi possível evidenciar se houve desenvolvimento macroscópico. O substrato aparentou ter se reduzido mais no caso do bagaço tratado, contudo, isso pode ter ocorrido por agitação do shaker orbital.

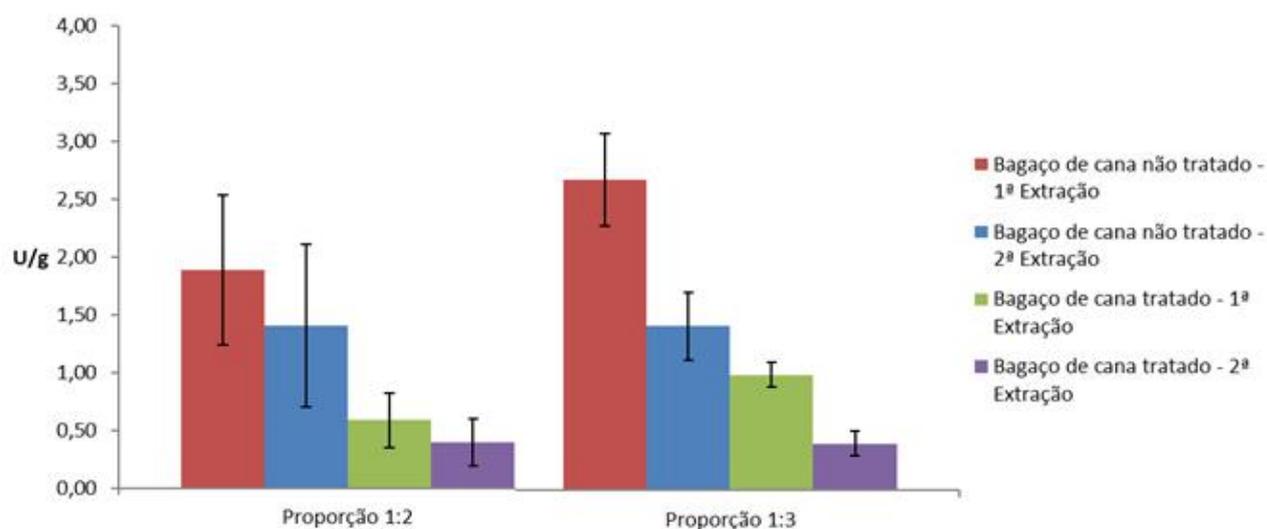
Figura 20 – Crescimento macroscópico da actinobactéria AM4-6 após 7 dias de crescimento em bagaço de cana tratado (esquerda) e bagaço de cana in natura (direita).



4.8. PRODUÇÃO DE CELULASES (FPASE E CMCASE)

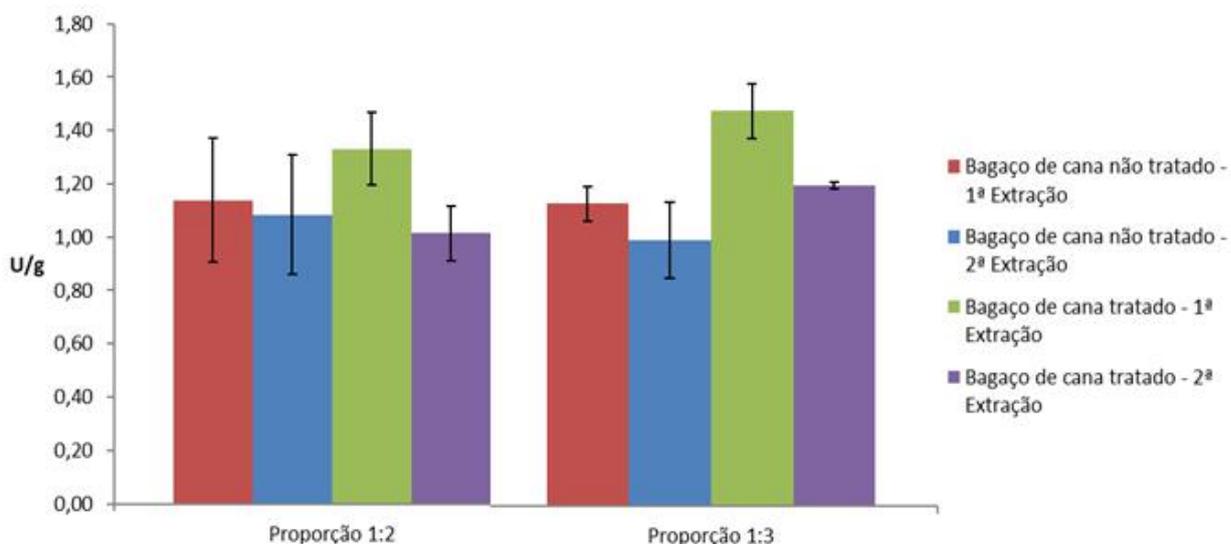
A produção de CMCases (endoglucanases) e FPases (celulase total) por Fermentação em Estado sólido foi quantificada através da incubação do extrato enzimático obtido após uma semana de incubação na estufa para os dois substratos. A maior atividade enzimática de CMCCase, para ambas as proporções, foi atingida utilizando bagaço de cana *in natura*, e foi de 2,91 U/g de substrato na proporção 1:3 na primeira extração, já para a proporção 1:2 o pico foi de 1,88 U/g de substrato. Na proporção 1:2 houve uma redução média de 25% da atividade entre uma extração e outra, enquanto na proporção 1:3 a redução foi de 55%.

Figura 21 – Atividade de CMCases produzidas por FES em diferentes proporções sólido:líquido.



Em relação à produção de celulases totais (FPases), é possível observar uma familiaridade entre os resultados obtidos nas diferentes proporções de água e substrato. Não há uma diferença significativa (menor que 1%) entre as correspondentes atividades de bagaço de cana *in natura* para cada uma das proporções. Já no bagaço de cana pré tratado a diferença foi de aproximadamente 10%, o que ainda torna uma diferença insignificante considerando a magnitude dos valores. Os maiores valores atingidos foram de 1,47 U/g de substrato e 1,2 U/g de substrato utilizando bagaço de cana pré tratado na proporção 1:3 na primeira e segunda extração, respectivamente. Para o bagaço de cana *in natura*, a redução de atividade entre uma extração e outra foi de aproximadamente 4% e para o bagaço tratado 8%.

Figura 22 – Atividade de FPases produzidas por FES em diferentes proporções sólido:líquido.



Primeiramente, de forma a avaliar qualquer tipo de atividade enzimática, alguns pontos devem ser levados em consideração. Cabe-se dizer que uma comparação entre fungos e actinobactérias para produção de celulases é muito equivocada de ser realizada, como já foi previamente dito na introdução, tendo em vista que fungos são os maiores produtores em quantidade de celuloses, por consequência, deve-se apenas realizar comparações utilizando bactérias. Além disso é de extrema importância pontuar que diversos autores de diversas publicações não utilizam uma unidade de medida clara, (por exemplo, utilizam atividade enzimática apenas como U) ou, no caso de uma FES, medem a atividade do extrato, tornando a medida U/mL, ao contrário de U/g de substrato, que seria mais apropriado. De forma a comparar resultados, basta dividir o resultado em U/mL pela quantidade de substrato utilizado no processo. Outro ponto a levar-se em consideração é que a maioria de estudos e artigos divulgam os resultados otimizados, enquanto os presentes nesse estudo não estão otimizados nem para temperatura, pH, umidade e quantidade de substrato ou com um microrganismo mutante, que muitas vezes consegue atingir potenciais enzimáticos muito superiores, como fica evidenciado pelos trabalho de Silva (2017) e Oliveira et al. (2016).

Esperava-se que tanto para CMCases quanto FPases, os resultados utilizando o bagaço de cana tratado fossem maiores devido ao pré tratamento da biomassa, que facilita o acesso do microrganismo ao substrato (NEUMANN, 2018). Contudo, não é o que fica evidenciado nesses resultados. De forma a fazer uma afirmação correta sobre o porquê dessas atividades, seria necessário realizar uma análise da composição exata de cada um dos substratos avaliando se

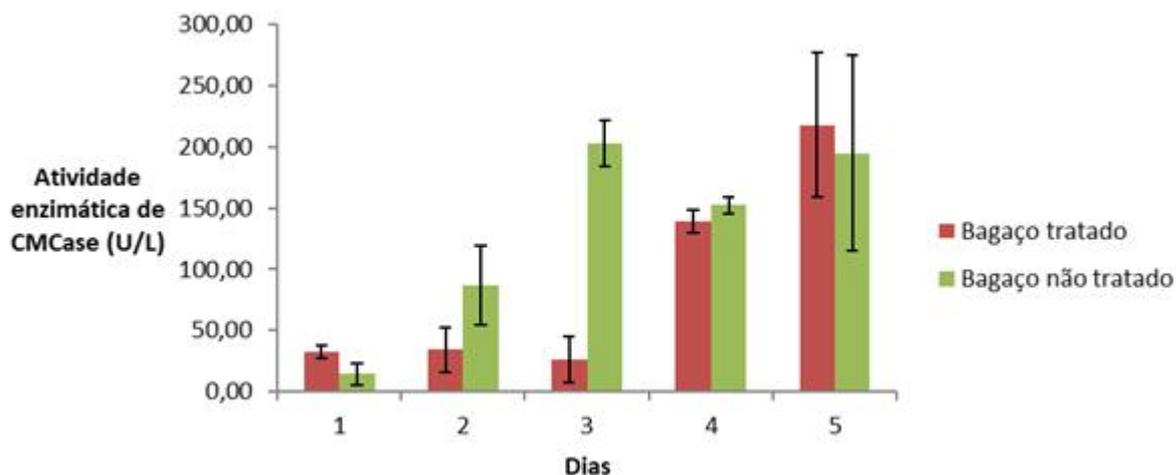
algum nutriente necessário para a geração de enzimas é perdido no processo de explosão a vapor. De qualquer forma, o uso do bagaço *in natura* se torna ainda mais vantajoso já que não haveria gastos com o tratamento da biomassa.

Avaliando o que é possível encontrar na literatura sobre Fermentação em Estado Sólido utilizando bactérias ou actinobactérias, os resultados encontrados nesse estudo revelam-se comparáveis com a maior parte do encontrado na literatura. Os valores de FPase em FES variam de 0,6 U/g até 13,5 U/g, sendo a maior parte dos resultados até 3,0 U/g (ARORA, 2005; OBEROI, 2008; BUDIHAL, 2015; SANTOS 2016). Para CMCases, os resultados também não estão excepcionais, sendo o valor máximo encontrado como 25 U/g de substrato e o mais baixo de 3 U/g de substrato. Uma possível razão para o baixo rendimento do processo nesse trabalho em comparação com os deve ser pela proporção de água e substrato utilizado, tendo em vista que a maior parte dos experimentos trabalhava com uma proporção de água maior. Contudo, um maior uso de água já não poderia mais classificar o processo como FES. Outra razão para esses valores mais baixos pode estar na escolha do substrato. Muitos estudos utilizam substratos e ainda os suplementam com grão de aveia, como fez Oberoi (2008), já que esse composto é um excelente indutor de celulase em condições de fermentação em estado sólido devido a sua composição (YU et al., 1998). Mesmo com atividades enzimáticas muito mais elevadas, o presente trabalho ainda apresenta muito potencial, considerando principalmente que os valores não estão otimizados e que o substrato com o maior potencial é o mais barato já que não precisaria passar por uma etapa de pré-tratamento.

O processo de avaliação da atividade enzimática das enzimas celulolíticas produzidas através de Fermentação Submersa se deu através da incubação de extratos enzimáticos obtidos do primeiro ao quinto dia de fermentação. Quanto a produção de endoglucanases, o pico de atividade foi no terceiro dia para o bagaço não tratado (202,7 U/L) e no quinto dia para o bagaço tratado (217,9 U/L). A partir do terceiro dia, a atividade do extrato obtido na fermentação com o bagaço não tratado começa a diminuir e aumentar, indicando uma possibilidade do valor ter se tornado constante, já para o extrato obtido com o bagaço pré tratado, a atividade começa a crescer a partir do quarto dia e aumenta no quinto, indicando que talvez com mais dias de fermentação a atividade possa aumentar. Essas informações a cerca do tempo necessário para atingir o pico são de extrema relevância, tendo em vista que se um máximo de atividade é alcançado em menos tempo, pode-se realizar mais fermentações, aumentando assim a rentabilidade do processo. Isto torna-se ainda mais interessante quando observa-se que a

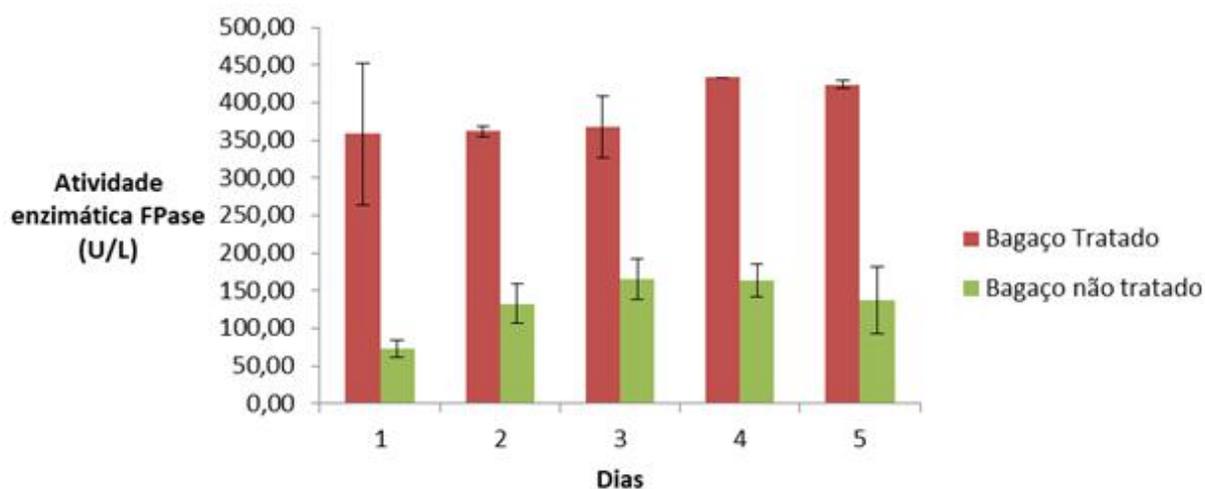
fermentação que atingiu o pico mais alto foi a que teve como substrato o bagaço de cana *in natura*, cujo o preço é bem menor do que o de outros substratos que requerem um pré-tratamento da biomassa

Figura 23 – Atividade enzimática de CMCCase produzida por Fermentação Submersa.



Ao que tange a atividade enzimática das celulases totais salta aos olhos que o bagaço tratado é um substrato superior quando comparado ao seu equivalente *in natura*. O pico de atividade utilizando bagaço tratado foi no quarto dia (433,4 U/L) e como bagaço *in natura* no terceiro dia (165,3 U/L). Apesar de apresentar um pico, por uma análise gráfica fica claro que o bagaço tratado apresenta uma constância quanto a atividade enzimática desde o primeiro dia, já a atividade obtida com o extrato da outra fermentação aparenta ter um decaimento após o seu pico no terceiro dia.

Figura 24 – Atividade enzimática de FPase produzida por Fermentação Submersa.



Na literatura, utilizam-se diversos substratos diferentes, como resíduo de Maracujá, Resíduo Urbano, Resíduo de Pau-Rosa, Resíduo de Milho e CMC (CHELLAPANDI, 2008; PRASSAD, 2013; PIRZADAH, 2014; RODRIGUES et al., 2019). A respeito da produção de CMCases, o maior valor encontrado na literatura foi o de Chellapandi (2008), que foi 11900 U/L utilizando uma linhagem selecionada de actinobactéria em celulose *walsath* e em condições já otimizadas. O trabalho de Silva (2017), também utilizando bagaço de cana in natura, mas se utilizando de uma actinobactéria mutada, alcançou valores de 1300 U/L. Contudo, podemos dizer que esses valores são excepcionalmente altos e fora do comum encontrados. Macedo e colaboradores conseguiram alcançar valores de 600 U/L e Rodrigues e colaboradores (2019) alcançaram um potencial máximo de 110 U/L utilizando um microrganismo isolado. O presente estudo apresentou resultados razoavelmente equivalentes aos anteriores, indicando que o uso de resíduo de cana de açúcar como substrato é extremamente interessante. Além disso, para o bagaço não tratado, este estudo está de acordo com diversos outros em que o pico de produção de CMCases ocorre em 72 horas. (ISHAKE; KLUEPFEL 1980; RAMIREZ; COHA, 2003; RODRIGUES et al., 2019).

No geral, bactérias apresentam uma atividade celulolítica em papel de filtro (FPase) inferior a 370 U/L, sendo, de acordo com Ghooose (1987) uma produção enzimática irrelevante. Entretanto, algumas linhagens de *Streptomyces* podem apresentar valores consideráveis mesmo em condições não otimizadas, a linhagem AM4-6 nesse estudo pode alcançar um pico de atividade de 433,4 U/L, mesmo em condições não otimizadas. Prasad, Singh e Bedi (2013) alcançaram um máximo de 25 U/L, Saini et al. (2016) conseguiram 75 U/L, Silva (2017), antes de realizar uma mutação, conseguiu um pico de 246 U/L, todos menores que o valor encontrado no estudo. Isso indica que para a produção de FPases a actinobactéria AM4-6 tem um grande potencial de produção de enzimas utilizando um bagaço de cana pré-tratado.

5. CONCLUSÃO

A partir das diferentes amostras ambientais coletadas na APA da Restinga de Marambaia, foi possível isolar 114 linhagens diferentes de actinobactérias, sendo a amostra 6, sedimento arenoso, a amostra com maior número de isolados.

A amostra ambiental 4 (sedimento arenoso) apresentou as linhagens com melhor capacidade enzimática quanto a degradação de amido e celulose.

A linhagem de actinobactéria com maior potencial enzimático para a hidrólise de celulose foi a linhagem AM4-6, identificada presumidamente como pertencente ao gênero *Streptomyces* sp., com índice enzimático de 5,2, enquanto que para hidrólise de amido foi a linhagem AM4-12, com índice enzimático de 3,7.

O processo de Fermentação em Estado Sólido utilizando ambos os bagaços se demonstrou bem inferior quando comparado com os outros valores presentes na literatura. Ao contrário da FES, a fermentação submersa apresentou valores de atividade enzimática em papel de filtro equivalentes ou superiores a valores encontrados na literatura e em condições análogas (sem otimização), o que indica o imenso potencial que esse microrganismo tem de produzir um produto de alto valor agregado utilizando qualquer um dos dois resíduos lignocelulósicos.

De forma a contornar a questão de baixas atividades e tornar essa actinobactéria viável para a produção de enzimas em escala industrial, muitos procedimentos devem ser realizados, como a otimização do meio de cultura, das condições de fermentação e das condições de reação enzimática.

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

O presente trabalho apresenta uma actinobactéria muito promissora para a produção de celulases em escala industrial utilizando substratos de baixo custo. Contudo, de forma a tornar essa produção mais acentuada, deve-se realizar algumas etapas. Primeiramente realizar uma análise fatorial variando temperatura, pH e concentrações das fontes de carbono, nitrogênio, sais minerais para definir as melhores condições de fermentação. Em seguida, avaliar as condições da enzima para verificar o ponto mais otimizado de temperatura e pH, realizando testes de atividade enzimática em diferentes temperaturas e com outros tampões. Por fim, pode-se também testar diferentes técnicas de forma a aumentar a vida útil da enzima, como o uso de técnicas de imobilização ou do uso de estabilizantes. Por fim, como o objetivo final é a produção e a aplicação dessa enzima em algum processo, pode-se realizar diferentes testes como hidrólise de biomassa ou testes em fibras para avaliar o potencial de aplicabilidade desse bioprodutos.

7. REFERÊNCIAS

ARAÚJO, Paulo Roberto. Acordo vai manter comunidade quilomba na Marambaia. **O GLOBO**, 2014. Disponível em <https://oglobo.globo.com/rio/acordo-vai-manter-comunidade-quilombola-na-marambaia-14661359>. Acesso em 30 out. 2020.

ARAUJO, R., GUPTA, V. V., REITH, F., BISSETT, A., MELE, P., FRANCO, C. M. Biogeography and emerging significance of Actinobacteria in Australia and Northern Antarctica soils. **Soil Biology and Biochemistry**, 146, 107805, 2020.

ARORA, A., NAIN, L., GUPTA, J. K. Solid-state fermentation of wood residues by *Streptomyces griseus* B1, a soil isolate, and solubilization of lignins. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 21, 3, 303-308, 2005.

BARKA, E. A., VATSA, P., SANCHEZ, L., GAVEAU-VAILLANT, N., JACQUARD, C., KLENK, H. P., VAN WEZEL, G. P. Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 80, 1, 1-43, 2016.

BARUQUE, J. R. B. **Avaliação da diversidade de grupos funcionais holocelulolíticos de fungos filamentosos isolados do Parque Nacional de Itatiaia e seu potencial biotecnológico**. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia) – Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 55f, 2018.

BEHERA, B. C., SETHI, B. K., MISHRA, R. R., DUTTA, S. K., THATOI, H. N. Microbial cellulases – Diversity & biotechnology with reference to mangrove environment: A review. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, 15, 1, 197-210, 2017.

BRANDT, Agnieszka et al. Deconstruction of lignocellulosic biomass with ionic liquids. **Green chemistry**, v. 15, n. 3, p. 550-583, 2013.

BUDIHAL, S. R., AGSAR, D. (2015). Exploration of agrowastes for the production of cellulase by *Streptomyces* DSK29 under submerged and solid state systems. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, 4, 11, 2015.

CAMPOS, L., MOURA, H. O., CRUZ, A. J., ASSUMPCAO, S., DE CARVALHO, L. S., PONTES, L. A. Response surface methodology (RSM) for assessing the effects of

pretreatment, feedstock, and enzyme complex association on cellulose hydrolysis. **Biomass Conversion and Biorefinery**. 2020.

CHATER, K. F. A morphological and genetic mapping study of white colony mutants of *Streptomyces coelicolor*. **Microbiology**, 72, 1, 9-28, 1972.

CHATER, Keith F. et al. The complex extracellular biology of Streptomyces. **FEMS microbiology reviews**, 34, 2, 171-198, 2010.

CHELLAPANDI, P.; JANI, H. M. Production of endoglucanase by the native strains of *Streptomyces* isolates in submerged fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, 39, 1, 122-127, 2008.

CHERRY, J. R.; FIDANTSEF, A. L. Directed evolution of industrial enzymes: an update. **Current opinion in biotechnology**, 14, 4, 438-443, 2003.

EBRINGEROVÁ, A., HROMÁDKOVÁ, Z., HEINZE, T. Hemicellulose. **Advances in Polymer Science**, 186, 1, 1–67, 2005.

FARINAS, C. S. Developments in solid-state fermentation for the production of biomass degrading enzymes for the bioenergy sector. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 52, 179-188, 2015.

FARUK, O., SAIN, M. (2015). *Lignin in polymer composites*. William Andrew.

GARDNER, K. H., BLACKWELL, J. The structure of native cellulose. **Biopolymers: Original Research on Biomolecules**, 13, 10, 1975-2001, 1974.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure and applied Chemistry**, 59, 2, 257-268, 1987.

GLEIZER, S., BEN-NISSAN, R., BAR-ON, Y. M., ANTONOVSKY, N., Noor, E., ZOHAR, Y., MILO, R. Conversion of *Escherichia coli* to generate all biomass carbon from CO₂. **Cell**, 179, 6, 1255-1263, 2019.

GODANA, B. **Production of Enzymes for application on animal feeds**. 2007. Tese de Doutorado. – Departamento de Biotecnologia na Faculdade de Tecnologia de Durban, Durban, África do Sul.

GOODFELLOW, M., WILLIAMS, S. T. Ecology of actinomycetes. **Annual review of microbiology**, 37, 1, 189-216, 1983.

HAYAKAWA, M. Studies on the isolation and distribution of rare actinomycetes in soil. **Actinomycetologica**, 22, 1, 12-19, 2008.

Hazarika, S. N.; Thakur, D. Actinobacteria. *In*: AMARESAN, N. et al. (Ed.). **Beneficial Microbes in Agro-Ecology: Bacteria and Fungi**. Academic Press, 2020.

HOPWOOD, D. A.; WILDERMUTH, H., PALMER, H. M. Mutants of *Streptomyces coelicolor* defective in sporulation. **Microbiology**, 61, 3, 397-408, 1970.

HUG, L. A., BAKER, B. J., ANANTHARAMAN, K., BROWN, C. T., PROBST, A. J., CASTELLE, C. J., BANFIELD, J. F. A new view of the tree of life. **Nature microbiology**, 1, 5, 1-6, 2016.

IMRAN, M., BANO, S., NAZIR, S., JAVID, A., ASAD, M. J., YASEEN, A. (2019). Cellulases Production and Application of Cellulases and Accessory Enzymes in Pulp and Paper Industry: A Review. **PSM Biological Research**, 4, 1, 29-39, 2019.

Indiamart. <https://www.indiamart.com/>. Acesso em 20 nov 2020.

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

JAYASEKARA, S., RATNAYAR., R. Microbial Cellulases: An Overview and Applications. *Cellulose*. Intechopen, 2019.

JUTURU, V., WU, J. C. Microbial cellulases: Engineering, production and applications. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 33, 188–203, 2014.

KARUNARATHA, M.S. SMITH, R.C. 2020. Valorization of Lignin as a Sustainable Component of Structural Materials and Composites: Advances from 2011 to 2019 **Sustainability** 2020, 12, 2, 734, 2020.

KAUSAR, H., SARIAH, M., SAUD, H. M., ALAM, M. Z., SMAIL, M. R. (2011). Isolation and screening of potential actinobacteria for rapid composting of rice straw. **Biodegradation**, 22, 2, 367-375, 2011.

KUHAD, R. C., DESWAL, D., SHARMA, S., BHATTACHARYA, A., JAIN, K. K., KAUR, A., KARP, M. Revisiting cellulase production and redefining current strategies based on major challenges. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 55, 249-272, 2016.

KUHAD, R. C., GUPTA, R., SINGH, A. Microbial cellulases and their industrial applications. **Enzyme research**, 2011.

LEWIN, G. R., CARLOS, C., CHEVRETTE, M. G., HORN, H. A. MCDONALD, B.R. STANKEY, R.J., CURRIE, C.R. Evolution and ecology of Actinobacteria and their bioenergy applications. **Annual review of microbiology**, 70, 235-254, 2016.

LI, F., XIE, Y., GAO, X., SHAN, M., SUN, C., NIU, Y. D., SHAN, A. Screening of cellulose degradation bacteria from Min pigs and optimization of its cellulase production. **Electronic Journal of Biotechnology**, 48, 29-35, 2020.

Locci R, Sharples G. 1984. Morphology, p 165–199. In Goodfellow M, Mordarski M, Williams ST (ed), *The biology of Actinomycetes*. Academic Press, London, United Kingdom.

MACEDO, E. P., CERQUEIRA, C. L. O., SOUZA, D. A. J., BISPO, A. S. R., COELHO, R. R. R., NASCIMENTO, R. P. (2013). Production of cellulose-degrading enzyme on sisal and other agro-industrial residues using a new Brazilian actinobacteria strain *Streptomyces* sp. SLBA-08. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, 30, 4, 729-735, 2013.

MANIVASAGAN, P., VENKATESAN, J., SIVAKUMAR, K., KIM, S. K. (2016). Actinobacteria mediated synthesis of nanoparticles and their biological properties: a review. **Critical reviews in microbiology**, 42, 2, 209-221, 2016.

MARÍN, M., ANTONI S., ADRIANA A. Production and recovery of cellulases through solid-state fermentation of selected lignocellulosic wastes. *Journal of cleaner production*, 209, 937-946, 2019.

Mata Atlântica. Ministério do Meio Ambiente https://mma.gov.br/biomas/mata-atl%C3%A2ntica_emdesenvolvimento.html. Acesso em 05 dez 2020.

MIETTINEN-OINONEN, A. R. J. A. Cellulases in the textile industry. **Industrial enzymes: structure, function and applications**, 51-64, 2007.

POLANOIA J., MCCABE, A. Industrial enzymes: structure, function and applications. **Springer, Dordrecht, The Netherlands** 51-63. 2017

NAVARRO, E. A. *Dicionário de tupi antigo: a língua indígena clássica do Brasil*. São Paulo.

NEUMANN, Bárbara Calheiros. Caracterização de xilanase de *Aspergillus niger* quando cultivado em bagaço de cana de açúcar pré-tratado. 2018.

OBEROI, H. S., CHAVAN, Y., BANSAL, S., DHILLON, G. S. Production of cellulases through solid state fermentation using kinnow pulp as a major substrate. *Food and Bioprocess Technology*, 3, 4, 528-536, 2010.

OLIVEIRA, M. M. Q; LIMA, A. L. G; BON, E. P. S; COELHO, R. R. R; NASCIMENTO, R. P. Production of thermophilic and acidophilic endoglucanases by mutant *Trichoderma atroviride* 102C1 using agro-industrial by-products. **African Journal of Biotechnology**, 15, 11, 423-430, 2016.

PAULY, M., GILLE, S., LIU, L., MANSOORI, N., DE SOUZA, A., SCHULTINK, A., XIONG, G. Hemicellulose biosynthesis. **Planta**, 238, 4, 627–642, 2013.

PELEG, M.; CORRADINI, M. G. Microbial growth curves: what the models tell us and what they cannot. **Critical reviews in food science and nutrition**, 51, 10, 917-945, 2011.

PÉREZ, J., MUNOZ-DORADO, J., DE LA RUBIA, T. D. L. R., MARTINEZ, J. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. **International microbiology**, 5, 2, 53-63, 2002.

PHITSUWAN, P., SAKKA, K., RATANAKHANOKCHAI, K. Improvement of lignocellulosic biomass in planta: a review of feedstocks, biomass recalcitrance, and strategic manipulation of ideal plants designed for ethanol production and processability. **Biomass and Bioenergy**, 58, 90-405, 2013.

PIRZADAH, T., GARG, S., SINGH, J., VYAS, A., KUMAR, M., GAUR, N., KUMAR, M. Characterization of Actinomycetes and *Trichoderma* spp. for cellulase production utilizing crude substrates by response surface methodology. SpringerPlus, 3, 1, 622, 2014.

Portal Agrario. Cultivos de Importancia Nacional;
2005 www.portalagrario.gob.pe/agricola/arroz_produccion.shtm. acesso 02 set 2020

PRASAD, P., SINGH, T., BEDI, S. Characterization of the cellulolytic enzyme produced by *Streptomyces griseorubens* (Accession No. AB184139) isolated from Indian soil. **Journal of King Saud University-Science**, 25, 3, 245-250, 2013.

PRIYA, B. S., STALIN, T., SELVAM, K. Efficient utilization of xylanase and lipase producing thermophilic marine actinomycetes (*Streptomyces albus* and *Streptomyces hygroscopicus*) in the production of ecofriendly alternative energy from waste. **African Journal of Biotechnology**, 11, 78, 14320-14325, 2012.

RAJAGOPAL, G., KANNAN, S. Systematic characterization of potential cellulolytic marine actinobacteria *Actinoalloteichus* sp. MHA15. **Biotechnology reports**, 13, 30-36, 2017.

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

RAMESH, D., MUNIRAJ, I. K., THANGAVELU, K., KARTHIKEYAN, S. (2019). Knowledge Update on Bioreactor Technology for Cellulase Production. **New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering**, 181–193, 2019.

RODRIGUES, J. G. C., GURGEL, R. S., LOPES, R., ALBUQUERQUE, P. M., JUNIOR, S. D. (2019). Produção de celulases por actinobactérias cultivadas em diferentes substratos/Production of cellulases by actinobacteria cultivated on different substrates. **Brazilian Journal of Development**, 5, 7, 10636-10646, 2019.

SAHA, B. C. Hemicellulose bioconversion. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 30, 5, 279–291, 2003.

SAINI, A., AGGARWAL, N. K., YADAV, A. Cellulolytic potential of actinomycetes isolated from different habitats. **Biosciences and Bioengineering**, 4, 88-94, 2016.

SÁNCHEZ, C. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology advances**, 27, 2, 185-194, 2009.

SANTOS, T. C. D., ABREU FILHO, G., BRITO, A. R. D., PIRES, A. J. V., BONOMO, R. C. F., FRANCO, M. Production and characterization of cellulolytic enzymes by *Aspergillus niger* and *Rhizopus* sp. by solid state fermentation of prickly pear. **Revista Caatinga**, 29, 1, 222-233, 2016.

SCHÜLEIN, M. Protein engineering of cellulases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1543, 2, 239-252, 2000.

SELVAM, K., VISHNUPRIYA, B., BOSE, V. S. C. Screening and quantification of marine actinomycetes producing industrial enzymes amylase, cellulase and lipase from south coast of India. **Int J Pharma Biol**, 2, 1481-1487, 2011.

SILVA, L. N., PRODUÇÃO DE CELULASES PELAS LINHAGENS MUTANTES *Trichoderma atroviride* 102C1 e *Streptomyces misionensis* B4 POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA. Tese de Mestrado – Instituto de Microbiologia, UFRJ. Rio de Janeiro. 2015

SIQUEIRA, J. G. W., RODRIGUES, C., DE SOUZA VANDENBERGHE, L. P., WOICIECHOWSKI, A. L., SOCCOL, C. R. Current advances in on-site cellulase production and application on lignocellulosic biomass conversion to biofuels: A review. **Biomass and Bioenergy**, 132, 105419, 2020.

SINGHANIA, R. R., PATEL, A. K., SOCCOL, C. R., PANDEY, A. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, 44, 13-18, 2009.

SINGHANIA, R. R., SUKUMARAN, R. K., PATEL, A. K., LARROCHE, C., PANDEY, A. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. **Enzyme and Microbial Technology**, 46, 7, 541–549, 2010.

Soares, J. F., Prá, V. D., Kempka, A. P., Prestes, R. C., Tres, M. V., Kuhn, R. C., & Mazutti, M. A. (2016). *Cellulases for Food Applications. New and Future*

SOCCOL, C. R., MARIN, B., RAIMBAULT, M., LEBEAULT, J. M. (1994). Breeding and growth of *Rhizopus* in raw cassava by solid state fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 41, 3, 330-336, 1994.

SOCCOL, C. R., COSTA, E. S. F. da, LETTI, L. A. J., KARP, S. G., WOICIECHOWSKI, A. L., VANDENBERGHE, L. P. de S. Recent developments and innovations in solid state fermentation. *Biotechnology Research and Innovation*, 1, 1, 52-71, 2017.

Souza, R. C. Soil Biota Characterization of Restinga da Marabaia, Rio de Janeiro, and establishment of mycorrhizal symbiosis in *Schinus Terebinthifolius* Raddi. Seropédica: UFRRJ, 2007

SOUZA, T. L., FIGUEIREDO, F. B., ALMEIDA, A. B., BENIGNO, C. V., PONTES, C. S., SOUZA, M. B. Natural breeding sites of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) on Marambaia Island, Rio de Janeiro State, Brazil. **Acta Tropica**, 136, 104–107, 2014.

Srivastava, Manish, et al., eds. *Approaches to Enhance Industrial Production of Fungal Cellulases*. Springer, 2019.

SUTO, M., TOMITA, F. Induction and catabolite repression mechanisms of cellulase in fungi. **Journal of bioscience and bioengineering**, 92, 4, 305-311, 2001.

TOLAN, J. S., FOODY, B. (1999). Cellulase from Submerged Fermentation. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, 41–67, 1999.

VAISHNAV, N., SINGH, A., ADSUL, M., DIXIT, P., SANDHU, S. K., MATHUR, A., SINGHANIA, R. R. *Penicillium*: The next emerging champion for cellulose production. *Bioresource Technology Reports*, 2, 131-140, 2018.

VANHOLME, R., DEMEDTS, B., MORREEL, K., RALPH, J., BOERJAN, W. Lignin biosynthesis and structure. **Plant physiology**, 153, 3, 895-905, 2010.

Vobis, G. "Morphology of actinomycetes." *Atlas of actinomycetes* (1997): 180-191.

WHISTLER, ROY L. "Hemicelluloses." *Industrial gums*. Academic Press, 1993. 295-308.

Wilson, D. B. (2009). *Cellulases*. *Encyclopedia of Microbiology*, 252–258. doi:10.1016/b978-012373944-5.00138-3

WOESE, C. R., KANDLER, O., WHEELIS, M. L. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 87, 12, 4576-4579, 1990.

YANG, D., PARK, S. Y., PARK, Y. S., EUN, H., LEE, S. Y. (2020). Metabolic engineering of *Escherichia coli* for natural product biosynthesis. **Trends in Biotechnology**, 2020.

YU, X. B., YUN, H. S., KOO, Y. M. Production of cellulase by *Trichoderma reesei* Rut C30 in wheat bran-containing media. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 8, 3, 208-213, 1998.

ZHOU, Q., NING, S., LUO, Y. (2020). Coordinated regulation for nature products discovery and overproduction in *Streptomyces*. **Synthetic and Systems Biotechnology**, 5, 2, 49-58, 2020.

ANEXO

COMPOSIÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA

Meio de isolamento de actinobactérias

Glicerol.....5mL/L

Agar de isolamento de actinobactérias.....22g/L

Ferver previamente o meio antes de esterilizar.

Meio ISP-2

Extrato de malte20g/L

Extrato de levedura 4g/L

Glucose.....4g/L

Agar.....17g/L

Antes de adicionar o ágar, ajustar o pH até 7,0 com NaOH.

Meio ágar com CMC

CMC de baixa viscosidade.....10g/ L

NaNO₃.....1,2g/L

KH₂PO₄.....3,0g/L

K₂HPO₄.....6,0 g/L

MgSO₄.7H₂O.....0,2g/L

CaCl₂.....0,05g/L

MnSO₄.7H₂O.....0,01 g/L

ZnSO₄.7H₂O.....0,001 g/L

Agar.....18g/L

Meio ágar com amido

Amido solúvel.....10g/ L

NaNO₃.....1,2g/L

KH ₂ PO ₄	3,0g/L
K ₂ HPO ₄	6,0 g/L
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0,2g/L
CaCl ₂	0,05g/L
MnSO ₄ .7H ₂ O.....	0,01 g/L
ZnSO ₄ .7H ₂ O.....	0,001 g/L
Agar.....	18g/L

Meio para curva de crescimento e pré inóculo

Milhocina.....	0.5% p/v
KH ₂ PO ₄	1,5g/L
K ₂ HPO ₄	3,0g/L
CaCl ₂	0,05g/L
CoCl ₂	0,005g/L
MnSO ₄ .7H ₂ O.....	0,002g/L
ZnSO ₄ .7H ₂ O.....	0,001g/L
NaCl.....	0,2g/L

Meio para Fermentação submersa

Milhocina.....	0.5% p/v
Biomassa.....	2% p/v
KH ₂ PO ₄	1,5g/L
K ₂ HPO ₄	3,0g/L
CaCl ₂	0,05g/L
CoCl ₂	0,005g/L
MnSO ₄ .7H ₂ O.....	0,002g/L
ZnSO ₄ .7H ₂ O.....	0,001g/L
NaCl.....	0,2g/L