

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE**

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CELULASES
SECRETADAS POR *STREPTOMYCES* sp. ISOLADO DE
PROCESSO DE COMPOSTAGEM**

SABRINA PINTO SALAMONI

BIÓLOGA - UFRGS

Porto Alegre, 2005.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CELULASES
SECRETADAS POR *STREPTOMYCES* sp. ISOLADO DE
PROCESSO DE COMPOSTAGEM

SABRINA PINTO SALAMONI

BIÓLOGA - UFRGS

Dissertação apresentada como um dos requisitos para obtenção do grau de
Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente

Porto Alegre/ RS, Brasil.

Maio de 2005.

Agradecimentos

A Dra. Sueli T. Van Der Sand pela orientação, pela paciência e por acreditar na realização deste trabalho.

Ao Dr. José Carlos Germani pela co-orientação, pelo auxílio e incentivo.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente e em especial aos professores Gertrudes Corção, Marisa da Costa e Amauri Braga Simoneti.

Ao prof Sydnei Mitidieri Silveira pelos conselhos, pela troca de idéias e pelas sugestões para enriquecer este trabalho.

Ao prof João Henrique Corrêa Kanan por ter possibilitado a finalização deste trabalho.

À colega de curso e de laboratório Caroline Seitenfus Symanski e a bolsista de iniciação científica Melissa de Azevedo pela amizade, pelo companheirismo e colaboração.

Ao colega mestrando Fabrício Ferreira Luz e aos alunos de iniciação científica do laboratório de Tecnologia Bioquímica, Tiago, Fernanda, Amanda, Bruna, Rosana e Ana Paula pelo convívio e auxílio.

Aos funcionários do Depto. de Microbiologia, em especial a Sayonara Peixoto Rosa e Raquel Margarida González.

À minha mãe, Cheila Salamoni, e irmãos pelo grande incentivo, pelo carinho e dedicação.

Ao meu namorado, Frederico Ludwig, pelo seu amor, incentivo e compreensão.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro ao longo destes dois anos.

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CELULASES SECRETADAS POR *STREPTOMYCES* sp. ISOLADO DE PROCESSO DE COMPOSTAGEM¹

Autor : Sabrina Pinto Salamoni
Orientadora : Sueli T. Van Der Sand
Co-orientador: José Carlos Germani

RESUMO

Os actinomicetos são bactérias Gram positivas com crescimento filamentososo e que em culturas submersas podem formar grumos. Estes microrganismos são de grande interesse industrial devido à sua capacidade de produzir diferentes antibióticos e uma variedade de enzimas capazes de hidrolisar substratos contendo celulose, hemicelulose e lignina. Para avaliar a atividade celulolítica de diferentes actinomicetos, foram utilizados 30 isolados, provenientes de processo de compostagem, previamente identificados. Todos os isolados apresentaram atividade celulolítica quando crescidos em carboximetilcelulose. Destes, uma linhagem pertencente ao gênero *Streptomyces* Grupo C apresentou maior atividade e portanto foi selecionado. Este isolado foi utilizado para estudos de produção e caracterização de celulases. O isolado foi crescido em culturas submersas com quatro diferentes fontes de celulose (carboximetilcelulose, celulose microcristalina, palha de aveia e palha de milho) em diferentes condições de crescimento. A cada 24 horas de crescimento foram analisados o pH, a atividade enzimática e a massa celular da cultura. O substrato palha de milho induziu maior atividade enzimática, 7,75 UAE/mL, após 96 horas de crescimento. A temperatura ótima para a atividade de hidrólise das celulases foi de 50 °C e o valor ótimo de pH foi de 9,0. Foram detectadas duas celulases através de PAGE/SDS, com massa molecular de aproximadamente 20 e 32 kDa .

¹Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS, Brasil.

PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF CELLULASES SECRETED BY *STREPTOMYCES* sp. ISOLATED FROM COMPOSTING¹

Author : Sabrina Pinto Salamoni
Adviser : Sueli T. Van Der Sand
Co-adviser: José Carlos Germani

ABSTRACT

Actinomycetes are filamentous Gram - positive bacteria that grow in submerged cultures and may form clumps. These microorganisms have gained industrial importance due to the capacity to produce different antibiotic substances and a variety of enzymes that can hydrolyze cellulose, hemicellulose and lignin substrates. Thirty isolates of different actinomycete species were characterized for cellulolytic activity. The isolates were obtained from composting piles and identified. All isolates presented cellulolytic activity when grown in carboxymethylcellulose. A *Streptomyces* group C strain presented the highest cellulolytic activity and was therefore chosen for further analysis. The isolate was grown in liquid medium using 4 different cellulose sources (carboxymethylcellulose, microcrystalline cellulose, oat straw and maize straw) at different culture conditions. Enzyme activity, pH and cellular mass were evaluated every 24 h during culture growth. Maize straw was the substrate that induced the highest enzyme activity (7.75 AUE/mL) at the 96 h incubation time. The optimal temperature for cellulase hydrolysis activity was 50 °C, and the optimal pH was 9.0. Two cellulases were detected via SDS-PAGE with molecular sizes of 20 and 32 kDa.

¹Master of Science Degree Dissertation in Agricultural and Environmental Microbiology. Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre – RS, Brasil.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
2.1 Bioconversão de materiais de origem vegetal.....	12
2.2 Celulose	14
2.3 Celulases	16
2.4 Microrganismos celulolíticos	22
2.4.1 Bactérias e fungos	22
2.4.2 Actinomicetos.....	25
2.4.2.1 Características gerais.....	25
2.4.2.2 Classificação de actinomicetos	27
2.4.3 Actinomicetos celulolíticos	29
2.5 Potenciais aplicações de celulases.....	31
3. MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.1 Amostras	33
3.2 Isolamento bacteriano.....	33
3.3 Identificação morfológica.....	34
3.4 Identificação bioquímica.....	35
3.4.1 Utilização de diferentes fontes de carbono e nitrogênio.....	35
3.4.2 Produção de pigmentos	36
3.5 Avaliação qualitativa da atividade celulolítica de actinomicetos em placas com CMC	36
3.6 Identificação molecular	37
3.6.1 Extração de DNA das amostras de actinomicetos	37
3.6.2 Extração de DNA das amostras controle - negativo.....	38
3.6.3 Quantificação do DNA por intensidade de banda	39
3.6.4 Reação em cadeia da polimerase.....	39
3.6.4.1 Oligonucleotídeos iniciadores	39
3.6.4.2 Condições para amplificação	40
3.6.4.3 Eletroforese em gel de agarose	41
3.7 Condições de crescimento dos isolados em culturas submersas	42
3.7.1 Curva de crescimento	42
3.7.2 Condições de crescimento dos isolados	42
3.7.3 Determinação da produção de celulases em diferentes substratos	43
3.8 Determinação da atividade enzimática	43
3.9 Propriedades do extrato bruto e da enzima concentrada.....	44
3.9.1 Avaliação do efeito da temperatura e do pH na atividade enzimática	45
3.9.1.1 Efeito da temperatura sobre a atividade ótima e termoresistência das celulases no extrato bruto	45
3.9.1.2 Efeito do pH sobre a atividade enzimática e estabilidade das celulases no extrato bruto.....	45
3.9.2 Concentração da enzima	46
3.9.2.1 Atividade enzimática do extrato bruto e da enzima concentrada	46
3.9.2.2 Avaliação da estabilidade térmica das celulases	46
3.9.2.3 Caracterização da enzima produzida pelo isolado celulolítico selecionado: SDS-PAGE e zimografia	47
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
4.1 Identificação bioquímica dos isolados.....	48

4.2 Avaliação da atividade celulolítica em placas com carboximetilcelulose (CMC)	49
4.3 Identificação molecular	52
4.4 Avaliação da atividade celulolítica em culturas submersas com CMC	58
4.4.1 Curva de crescimento	58
4.4.2 Atividade celulolítica em culturas submersas	59
4.5 Produção de celulases por <i>Streptomyces</i> Grupo C 107e	60
4.6 Determinação do pH e da massa celular do cultivo de <i>Streptomyces</i> do Grupo C 107e.....	66
4.7 Propriedades das celulases produzidas pelo isolado <i>Streptomyces</i> do Grupo C 107e.....	69
4.7.1 Efeito da temperatura sobre a atividade de hidrólise e termorresistência das celulases no extrato bruto	69
4.7.2 Efeito do pH na atividade de e na estabilidade das celulases.....	71
4.8 Atividade hidrolítica em diferentes concentrações de CMC	74
4.9 Avaliação da estabilidade térmica das celulases	75
4.10 Determinação da massa molecular	76
5. CONCLUSÕES	80
6. PERSPECTIVAS.....	81
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82
8. APÊNDICES	91

RELAÇÃO DE TABELAS

TABELA 1. Espécies e número de isolados de <i>Streptomyces</i> identificados....	40
TABELA 2. Medida do halo de hidrólise de CMC dos isolados.....	43
TABELA 3. Atividade enzimática de CMCase.....	51
TABELA 4. Massa celular das culturas de <i>Streptomyces</i> , 107 e.....	59
TABELA 5. Atividade de CMCase em diferentes concentrações de CMC.....	66

RELAÇÃO DE FIGURAS

FIGURA 1. Mecanismo de ação de glicanase.....	10
FIGURA 2 Halo de hidrólise de CMC em placa.....	42
FIGURA 3. Produto de amplificação (oligonucleotídeos F243 e R513).....	44
FIGURA 4. Produto da amplificação (oligonucleotídeos StrepB e StrepF).....	47
FIGURA 5. Produto da amplificação (oligonucleotídeos StrepB e StrepE).....	47
FIGURA 6. Curva de crescimento de <i>Streptomyces</i> Grupo C.....	49
FIGURA 7. Crescimento de <i>Streptomyces</i> Grupo C, 107 e a 30 °C.....	52
FIGURA 8. Crescimento de <i>Streptomyces</i> Grupo C, 107 e a 35 °C.....	53
FIGURA 9. Crescimento de <i>Streptomyces</i> Grupo C, 107 e a 40°C.....	54
FIGURA 10. Efeito da temperatura sobre atividade de CMCase.....	61
FIGURA 11. Efeito do pH sobre atividade de CMCase.....	64
FIGURA 12. Estabilidade térmica de celulases a 40 e 50 °C.....	67
FIGURA 13. Massa molecular das celulases em SDS/PAGE.....	69
FIGURA 14. Atividade de celulases em SDS/PAGE.....	70

1. INTRODUÇÃO

A biomassa de origem vegetal representa o maior reservatório de carbono da Terra. O acúmulo destes resíduos sejam municipais, agrícolas ou florestais e o seu não reaproveitamento, representam uma grande perda econômica, além de causarem grande impacto no ambiente.

A bioconversão destes resíduos em produtos utilizáveis representa uma alternativa para estas questões. Estes resíduos constituem uma fonte de baixo custo e praticamente inesgotável para processos de bioconversão, podendo, assim, serem convertidos numa variedade de produtos economicamente importantes para as indústrias químicas, têxtil, de alimentos, de papel e polpa entre outras.

O processo de bioconversão envolve diferentes populações microbianas as quais interagem sinergicamente. Para que os substratos sejam consumidos, estes microrganismos necessitam de um engenhoso sistema enzimático para degradar compostos orgânicos mais complexos, como a celulose, as ligninas e as hemiceluloses, que se encontram em grandes

proporções nos resíduos sólidos orgânicos. Os polímeros de celulose são os mais abundantes e representam cerca de 40 % do material de origem vegetal. As enzimas celulolíticas são produzidas por uma gama de microrganismos, principalmente os actinomicetos. Estes microrganismos são muito importantes no processo de bioconversão pois são capazes de colonizar substratos complexos e hidrolisar vários polímeros, além de crescerem em temperaturas elevadas e serem habitantes naturais do solo.

Embora um amplo espectro de microrganismos celulolíticos, principalmente fungos e actinomicetos, tenham sido isolados e identificados, poucos foram estudados extensivamente. Sendo assim, este trabalho teve por objetivos: identificar actinomicetos isolados de leiras de compostagem, com capacidade de produzir celulases; selecionar o melhor produtor e avaliar a produção de celulases na presença de diferentes fontes de celulose (bruta e purificada), sob diferentes temperaturas de crescimento; caracterizar parcialmente as enzimas produzidas, quanto à sua massa molecular, estabilidade térmica e atividade em diferentes temperaturas e faixas de pH.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Bioconversão de materiais de origem vegetal

A lignocelulose é o maior componente estrutural da parede celular das plantas e consiste principalmente de hemicelulose (20-30%), de lignina (20-30%) e de celulose (40 – 50%), representando a maior fonte de matéria orgânica renovável (Bisaria & Ghose, 1981; Tuomela et al., 2000).

As hemiceluloses, a segunda maior reserva de carbono presente nas plantas, são heteropolímeros de pentoses (xilose, arabinose) e hexoses (manose, galactose) e seus ácidos urônicos. Estes polímeros são classificados de acordo com o resíduo de carboidratos. A xilana é o maior constituinte complexo da hemicelulose de parede celular das plantas, formada de uma cadeia principal de resíduos de xilopiranosil unidos por ligações glicosídicas (Bisaria & Ghose, 1981; Béguin & Aubert, 1994; Howard et al., 2003).

A lignina é um polímero altamente ramificado, composta basicamente de unidades de fenilpropano, acoplados de forma irregular, formando assim uma molécula tridimensional e amorfa. Uma matriz de lignina cobre polímeros

de celulose e hemicelulose, formando uma barreira física que previne a penetração de soluções e enzimas (Bisaria & Ghose, 1981; Howard et al., 2003).

A degradação da lignina é um processo oxidativo desempenhado por poucos organismos, principalmente fungos filamentosos como o *Phanerochaete chrysosporium*. Os actinomicetos podem solubilizar e modificar extensivamente a estrutura da lignina, resultando numa parcial delignificação para garantir seu acesso a substratos celulósicos, entretanto, sua habilidade para mineralizá-la é limitada (Zimmermann, 1990).

A conversão destes polímeros pode ser realizada através do processo de compostagem. O processo de compostagem é um processo natural, no qual microrganismos decompõem a matéria orgânica em nutrientes simples que podem ser assimilados por outros organismos vivos. Durante a compostagem os microrganismos convertem a matéria orgânica em dióxido de carbono, biomassa, calor e um produto semelhante ao húmus. Os principais componentes da matéria orgânica são carboidratos (celulose), proteínas, lipídeos e lignina. A capacidade dos microrganismos para assimilar a matéria orgânica depende de sua habilidade em produzir as enzimas necessárias para a degradação do substrato (Tuomela et al., 2000).

O processo de compostagem pode ser dividido em quatro fases distintas: 1. psicrófila; 2. mesófila; 3. termófila e 4. maturação. A eficiência do processo de bioconversão e sua duração, dependem não somente da presença de populações microbianas, mas também da constituição dos materiais a serem degradados e de fatores ambientais. A biomassa no início

do processo de compostagem está em temperatura ambiente e apresenta-se levemente ácida. As fontes de carbono solúveis e facilmente degradáveis como os monossacarídeos, o amido e os lipídeos são utilizados pelos microrganismos no primeiro estágio do processo de compostagem. O valor de pH diminui porque são formados ácidos orgânicos a partir dos compostos durante a sua degradação. No estágio seguinte os microrganismos começam a degradar as proteínas, resultando na liberação de amônia e um gradual aumento do valor de pH. No início do processo as fontes mais simples são consumidas; os compostos mais resistentes e complexos, como a celulose, a hemicelulose e a lignina, começam a ser hidrolisados na fase mesofílica (McCarthy & Williams, 1992; Tuomela et al., 2000). Os actinomicetos se fazem notar durante a fase termofílica assim como na fase de maturação, sendo capazes de degradar celulose e solubilizar lignina, sendo mais tolerantes a altas temperaturas e pH do que os fungos (Zimmermann, 1990).

2.2 Celulose

As plantas representam o maior reservatório de carbono, sendo a celulose o polímero mais abundante e a sua degradação representa uma parte importante no ciclo do carbono. A celulose é um polímero linear de subunidades de glicose, unidas por ligações β -1-4 e cada resíduo de glicose é rotacionado 180° em relação ao resíduo vizinho. O comprimento da cadeia varia de 100 a 14 000 resíduos. Durante a biossíntese de celulose as cadeias individuais de glicose são unidas por pontes de hidrogênio intra e intermoleculares e forças de van der Waals, o que lhes confere uma forma rígida com microfibrilas insolúveis e geralmente resistentes à hidrólise

enzimática. As cadeias de microfibrilas são orientadas em paralelo com uma extremidade redutora e outra não redutora. Esta estrutura resulta em regiões altamente ordenadas e cristalinas intercaladas por regiões paracristalinas ou amorfas. A celulose tem função estritamente estrutural e é o principal componente da parede primária das plantas. A forma cristalina é também produzida por algas (*Valonia* spp.), os animais (*Halocynthia*) e algumas bactérias como *Acetobacter* spp. e *Agrobacterium* spp. (Béguin & Aubert, 1994; Schwarz, 2001; Mansfield & Meder, 2003).

Na natureza a celulose não ocorre na forma pura. Em qualquer fonte natural, mesmo fibras de algodão que são a forma mais pura de celulose prontamente disponível, contêm cerca de 10% de materiais não celulósicos, proteínas e elementos minerais. Este polímero encontra-se associado com uma variedade de outros polisacarídeos como amido, pectina, lignina e hemicelulose (Bisaria & Ghose, 1981).

O grau de cristalinidade depende da origem e do pré-tratamento e pode variar de 0% (amorfa) até próximo de 100%. O grau de cristalinidade da maioria das celulosas comerciais varia de 30 – 70%. A celulose pura é comercialmente disponível em várias formas (algodão, papel filtro, avicel). Estas celulosas são geralmente empregadas para avaliar os sistemas de celulasas, mas não são adequadas para os estudos de componentes celulolíticos individuais, que são fracamente ativos nestes substratos. As formas amorfas e solúveis são freqüentemente empregadas por sua rápida taxa de hidrólise, como a carboximetil celulose (CMC) e a hidroximetilcelulose. Entretanto, a CMC não deve ser empregada como um indutor universal uma

vez que ela não é atacada por todas as enzimas presentes em fluídos de cultura celulolíticos, sendo um pobre indutor de exoglicanases (Bisaria & Ghose, 1981; Béguin & Aubert, 1994). A diversidade e a heterogeneidade de substratos de celulose contribuem para dificultar a ampliação de estudos enzimológicos (Rabinovich et al., 2002a).

2.3 Celulases

A bioconversão de resíduos de celulose até glicose é catalisada por um grupo de enzimas denominadas celulases. Este processo é de crucial importância na ciclagem de nutrientes, uma vez que a celulose representa cerca de 40% do material de origem vegetal. Para que ocorra a hidrólise enzimática da celulose é necessário que ocorra a adsorção da enzima à superfície do substrato, com a formação de um complexo - enzima e celulose. A adsorção das celulases sobre o substrato promove, não somente um contato físico entre estes componentes, mas em muitos casos pode desempenhar um importante papel na eficiência da hidrólise de celulose (Klyosov, 1990).

A classificação das hidrolases O-glicosídicas (EC. 3.2.1), conforme a nomenclatura enzimática clássica, é feita com base na seqüência de aminoácidos, as propriedades estruturais e sua especificidade (Gilkes et al., 1991).

As celulases apresentam diferentes especificidades para hidrolisar as ligações glicosídicas β -1-4 na celulose sendo, assim, divididas em três classes: endoglicanases, exoglicanases e β -glicosidases. As endoglicanases (EC 3.2.1.4), [EG] são enzimas que catalisam a hidrólise interna de ligações β -1,4-D-glicosídicas da celulose, atuando aleatoriamente sobre regiões amorfas e

sobre substratos solúveis de celulose, liberando celoligosacarídeos. Elas podem hidrolisar também ligações β -1,4 em D-glicanas que contenham ligações β -1,3. As endoglicanases são também conhecidas como celulases, endo β -1,4 glicanases, glicanases e carboximetil celulases. Seu substrato natural é a celulose e xiloglicana, apresentando especificidade variável sobre carboximetilcelulose (CMC), Avicel, β -glicana e xilana. As exoglicanases (EC 3.2.1.91, E.C. 3.2.1.74), [CBH] conhecidas também como celobiohidrolases, β -1,4 – celobiohidrolases ou Avicelases, catalisam a hidrólise de ligações β -1,4-glicosídicas na celulose e celotetraose, das extremidades com resíduos redutores e não redutores (EC 3.2.1.91) e unidades de glicose de terminais não redutores (EC 3.2.1.74) da cadeia. A completa hidrólise é realizada pela ação das β -glicosidases (EC 3.2.1.21), conhecidas também como celobiasas, que convertem celobiose em glicose e catalisam a hidrólise de resíduos de β -D-glicose terminais não redutores liberando β -D-glicose (Gilkes et al., 1991; Perez - Pons, 1995; Bhat & Bhat, 1997; Cao & Tan, 2002; Lynd et al., 2002; Howard et al., 2003).

A ação sinérgica dos componentes individuais do sistema de celulases, especialmente endo e exoglicanases sobre a celulose insolúvel tem sido relatada por diversos trabalhos (Béguin & Aubert, 1994; Bhat & Bhat, 1997; Mansfield & Meder, 2003). Endoglicanases e celobiohidrolases podem causar dispersão da celulose, seja por ação hidrolítica ou mecânica. A ação de dois ou mais componentes celulolíticos individuais é maior do que a soma de cada ação individual. Embora estas ações aumentem a taxa de hidrólise dos substratos, a complexibilidade para estudos de mecanismos de ação torna-se

dificultada, pois o efeito sinérgico varia em relação às múltiplas formas dos componentes celulolíticos (diferentes celulasas e isoformas), as fontes de celulasas e as amostras de celulose (Klyosov, 1990). A hidrólise enzimática das pontes glicosídicas ocorre via um mecanismo ácido/base, sendo necessários dois resíduos de aminoácidos: um atuando como ácido fornecendo um próton ao oxigênio da ligação (Figura 1) e o segundo resíduo atuando como um nucleófilo que interage com o oxocarbono ou promove a formação do íon OH da molécula de água. A catálise ácida é usualmente promovida pelos resíduos aspartato e glutamato, ou ambos. Nesta catálise, ocorre uma reação de remoção simples ou dupla, resultando em inversão ou retenção, respectivamente, da configuração anomérica do carbono do glicosídeo hidrolisado (Gilkes et al., 1991; Schullein, 2000; Schwarz, 2001; Rabinovich et al., 2002a).

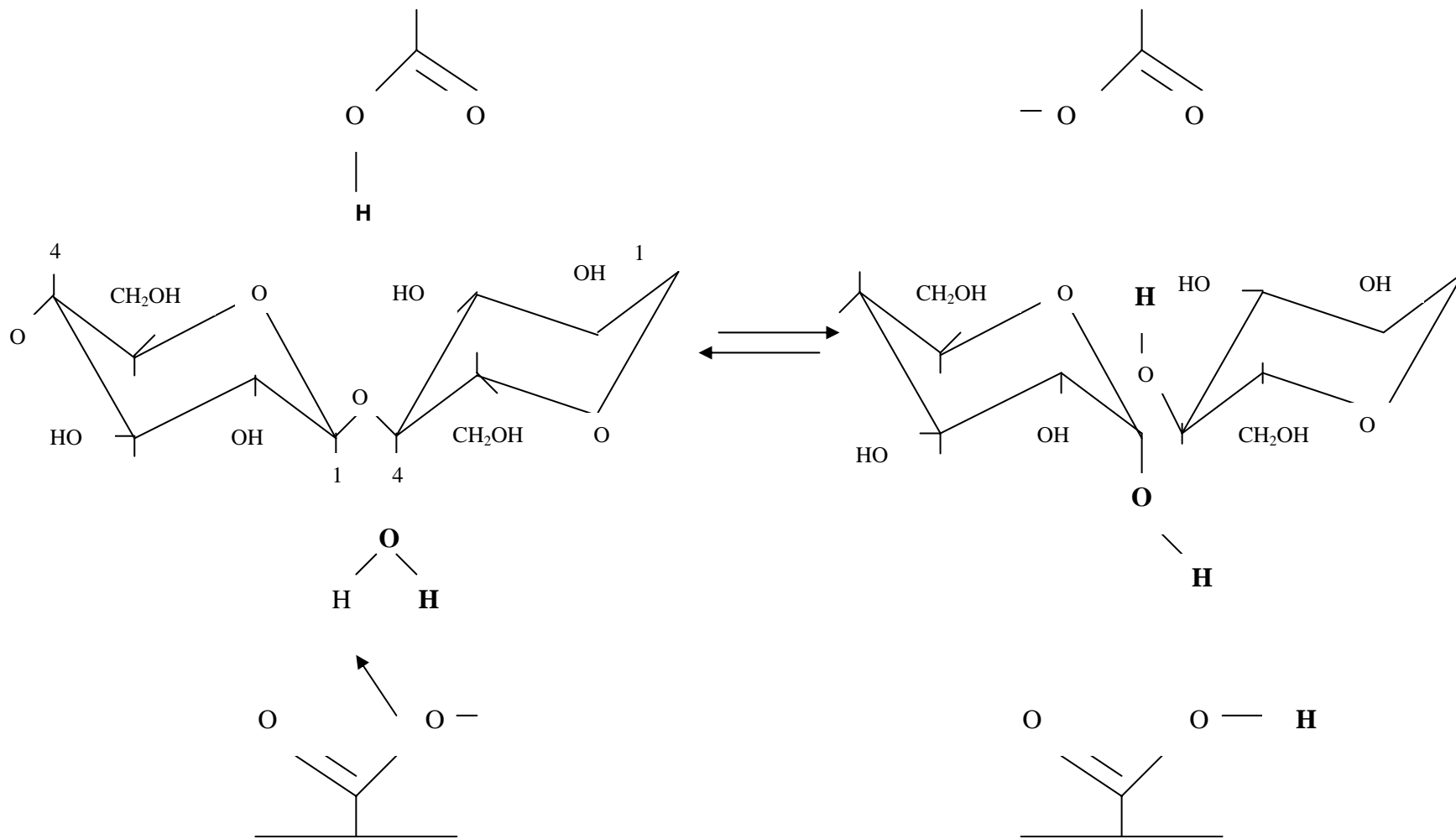


Figura 1. Mecanismo de ação de glicanase atuando no polímero de celulose, com inversão da configuração do carbono anomérico.

A maioria das enzimas celulolíticas são proteínas multifuncionais, sendo compostas de pelo menos três elementos estruturais, com diferentes funções: domínio catalítico (DC); domínio ligador de celulose (“cellulose binding domain”) e interdomínio. As enzimas com seqüências similares (domínios catalíticos) apresentam diferentes especificidades (exo ou endohidrólise), o que sugere que esta atividade seja consequência de detalhes na estrutura tridimensional da proteína. As seqüências dos domínios ligadores são menos variáveis, identificados como módulos ligadores a carboidratos (“carbohydrate-binding-module”) e definidos como uma seqüência de aminoácidos contígua, dentro de uma enzima ativa sobre o carboidrato. As enzimas celulolíticas compreendem 15 famílias das 99 famílias de glicosil hidrolases. Esta nomenclatura é aplicada para uma variedade de domínios catalíticos da enzima. Entretanto, baseado nos domínios ligadores à celulose pode-se ainda fazer uma nova classificação, dentro de 13 famílias, a qual não necessariamente acompanha as mesmas famílias de DC. Dentro de uma mesma família, as enzimas relacionadas não necessariamente refletem uma relação filogenética entre os organismos que as produzem (Gilkes et al., 1991; Thomson, 1993; Lynd et al., 2002; Rabinovich et al., 2002b).

A produção de celulasas por microrganismos é dependente do controle de regulação por mecanismos genéticos e bioquímicos. Os baixos níveis de celulasas são produzidos constitutivamente mas sua síntese pode ser induzida por celulose e seus derivados. Têm sido aceito que os verdadeiros indutores de celulasas são os produtos da hidrólise inicial. Estes açúcares agiriam como verdadeiros indutores, direta ou indiretamente, influenciando a

ligação de proteínas ao DNA promovendo, assim, a expressão dos genes para celulasas. A presença de substratos facilmente assimiláveis, a repressão do catabólito, o acúmulo do produto final ou fontes de carbono restritas podem inibir a síntese destas enzimas (Bisaria & Ghose, 1981; Coughlan, 1992; Bhat & Bhat, 1997). Celulasas produzidas por *Thermomonospora fusca*, *Streptomyces halstedii*, *S. reticuli* e *S. lividans* foram seqüenciadas, sendo identificada uma região comum de 14 pb repetidas invertidas. Esta região representa o sítio de ligação de uma proteína reguladora de celulasas que é reprimida em baixas concentrações de celobiose (Garda et al., 1997; Spiridonov & Wilson, 1999).

Os microrganismos celulolíticos têm desenvolvido uma bateria de enzimas com diferentes especificidades com respeito, ao modo de ação (endo/exo), à atividade sobre regiões amorfas ou cristalinas da celulose, ou preferência aos substratos com cadeias de diferentes comprimentos. Tal diversidade pode estar relacionada, em parte com a necessidade em competir com a heterogeneidade física do substrato. Além disso, a estrutura da celulose é alterada durante o processo de hidrólise, requerendo diferentes enzimas em diferentes tempos. Muitas vezes, as celulasas estão presentes como isoenzimas, outras diferindo somente no ponto isoelétrico dificultando assim sua separação (Bisaria & Ghose, 1981; Béguin & Aubert, 1994).

Embora as enzimas celulolíticas possuam especificidades para ligações β -1,4, celulasas isoladas de várias fontes, bem como de um mesmo microrganismo, apresentam importantes diferenças funcionais em seu modo de ação em relação ao substrato (grau de pureza, cristalinidade, tamanho das

partículas), quanto às suas características moleculares (massa molecular, composição e seqüência de aminoácidos, ponto isoelétrico), na adsorvidade sobre celulose, em sua atividade catalítica e especificidade ao substrato (Klyosov, 1990; Mansfield & Meder, 2003).

2.4 Microrganismos celulolíticos

Os microrganismos celulolíticos são encontrados em grupos taxonômicos extremamente variados sendo a maioria pertencente as eubactérias e fungos. Os organismos celulolíticos ocorrem em todas as biotas onde há acúmulo de resíduos de celulose. Usualmente, ocorrem em populações mistas, compreendendo espécies celulolíticas e não celulolíticas que interagem sinergicamente. Estas interações levam à completa hidrólise da celulose que é convertida em glicose, e esta em dióxido de carbono e água, em condições aeróbias, e em dióxido de carbono, metano e água em condições de anaerobiose (Béguin & Aubert, 1994).

2.4.1 Bactérias e fungos

Embora microrganismos capazes de degradar celulose sejam distribuídos em diferentes grupos, os sistemas de celulasas de bactérias e fungos têm sido estudados mais detalhadamente. Bactérias aeróbias e anaeróbias, mesofílicas e termofílicas (*Acetobacter xylinium*, *Bacillus* spp., *Cellulomonas* spp., *Clostridium* spp.) produzem celulasas individuais ou associadas à parede (celulossomo) (Bisaria & Ghose, 1981; Belaich et al., 1997; Samejima et al., 1998; Schwarz, 2001).

Alguns microrganismos são conhecidos por produzirem um completo sistema de celulases, no entanto, outros produzem um sistema incompleto ou carecem de estudos. *Cellulomonas fimi* secreta pelo menos duas distintas celobiohidrolases e quatro endoglicanases com diferentes especificidade e atividade sobre o substrato (Mansfield & Meder, 2000).

As espécies pertencentes ao gênero *Bacillus* produzem celulases e carboximetilcelulases (CMCase) na presença de celulose microcristalina, variando a atividade de 7,3 a 9,1 UI/mL. Alguns genes que codificam celulases nestes microrganismos já foram clonados e seqüenciados (Mawadza et al., 2000).

A degradação anaeróbia da celulose pode ocorrer numa variedade de biotas, incluindo esterco, composto, lagoas de tratamento de resíduos, em sedimentos marinhos, entre outros. Microrganismos como *Fibrobacter spp.*, *Butyvirbio fibriosolvens*, *Rumonococcus albus*, *R. flavefaciens*, no rúmen e no trato gastrointestinal desempenham um importante papel na nutrição de animais herbívoros (Bisaria & Ghose, 1981; Weimer et al., 1991).

Em bactérias aeróbias e fungos, as várias enzimas que constituem as celulases, ocorrem como unidades separadas, cada qual tendo uma ação específica diferentemente das bactérias anaeróbias, como *Clostridium thermocellum*, *C. cellulolyticum* e *Fibrobacter succinogenes*, que apresentam complexos celulolíticos extracelulares multi-enzimáticos, os chamados celulosomos. Estes complexos apresentam-se como protuberâncias na parede bacteriana com uma variedade de enzimas, não somente celulolíticas, mas xilanases, manases e quitinases também estão presentes. Devido à

interface célula/substrato, a celobiose não se acumula nem se dissipa no meio, podendo ser mantida em concentrações apropriadas para uma utilização mais eficiente pela célula. Celulossomos são encontrados principalmente em sistemas anaeróbios onde a economia metabólica é crucial (Biosset et al., 1999; Shoham et al., 1999; Schwarz, 2001). O cellulossomo de *C. cellulolyticum* possui 600 kDa, consiste de 14 proteínas com massa molecular que variam de 35 kDa a 160 kDa, as celulasas tendo peso de 29,5 – 89,6 kDa e todas apresentando atividade sobre CMC (Gal et al., 1997).

Assim como as bactérias, fungos também hidrolisam polímeros de celulose. *Trichoderma reesei*, um fungo aeróbio altamente celulolítico, é provavelmente o microrganismo cujo sistema de celulasas tem sido mais amplamente estudado. Este microrganismo produz pelo menos seis endoglucanases e duas celobiohidrolases ativas em diferentes fontes de celulose, solúveis ou não, amorfas e cristalinas (Lee et al., 1993; Karlsson et al., 2002). Muitas das enzimas produzidas por este fungo foram clonadas e expressas (Gama & Mota, 1998). *Aspergillus terreus* e *Neurospora crassa* são também fungos celulolíticos, onde a produção de *A. terreus* na presença de palha de trigo é de 250 UI/mL, *N. crassa* produz cerca de 350 UI/mL de CMCase com celulose microcristalina (Yazdi et al., 2000; Emtiazi et al., 2001).

Outros fungos celulolíticos incluem as espécies *Arthrographis cellulolyticum*, *Fusarium solani*, *Mucor circinelloides*, *Penicillium funiculosum*, *Sinortizobium fredii* (simbionte), *Sporotrichium pruinosum* (Bisaria & Ghose, 1981; Okeke, 1995; Jacobus & Wyk, 1997; Rabinovich et al., 2002a; Chen et al., 2004; Saha, 2004).

2.4.2 Actinomicetos

2.4.2.1 Características gerais

Os actinomicetos representam um grupo de bactérias Gram positivas com alto conteúdo de GC e com grande diversidade, seja em relação aos habitats que ocupam, às suas características morfológicas (presença ou ausência de micélio aéreo, coloração da colônia, formação de esporos/esporângia), às características bioquímicas (constituição de parede), às metabólicas (aeróbios e anaeróbios facultativos, mesofílicos e termofílicos), e fisiológicas (utilização de diferentes fontes de carbono, de energia) (Lechevaier & Lechevaier , 1965; Embley & Stackebrandt, 1994; Holt et al., 1994).

Estes microrganismos são principalmente aeróbios, mas alguns gêneros são facultativos ou anaeróbios obrigatórios. Representam um grupo diverso metabolicamente podendo ser autotróficos, heterotróficos, quimiotróficos ou fototróficos (Kennedy, 1999). Estão amplamente distribuídos no ambiente, podendo ser isolados de humanos, animais, plantas, águas residuais, alimentos, pedras, mas são encontrados predominantemente no solo. Os actinomicetos, especialmente o gênero *Streptomyces*, são reconhecidos por sua capacidade de produzir antibióticos e diversas enzimas que hidrolisam resíduos contendo celulose e hemicelulose, sendo também capazes de solubilizar a lignina, o que os torna de grande importância em processos de compostagem (McCarthy & Williams, 1992). Os actinomicetos prevalecem em processos de compostagem devido à sua habilidade de crescimento em temperaturas relativamente altas e em degradar diferentes

polímeros (Stutzenberger, 1971). As suas fontes primárias de carbono são os substratos insolúveis e poliméricos, necessitando assim de diferentes enzimas extracelulares e hifas que penetrem e colonizem o substrato. Embora poucos sejam os trabalhos já realizados para isolar e identificar actinomicetos em resíduos domésticos e vegetais, os gêneros mais comumente encontrados são: *Micromonospora*, *Nocardia*, *Saccharomonospora*, *Saccharopolyspora*, *Streptomyces*, *Thermoactinomyces* e *Thermomonospora* (Lacey, 1997; Tuomela et al., 2000; Oliveira, 2002).

Os esporos de dispersão dos actinomicetos podem ser conídios ou artrósporos únicos (*Micromonospora*, *Saccharomonospora*, *Promicromonospora*, *Thermoactinomyces*, *Thermomonospora*) ou as cadeias de comprimento variável como os gêneros *Pseudonocardia*, *Microtetraspora*, e *Streptomyces*. Nestes últimos, as cadeias de esporos podem apresentar-se na forma espiral ou reta, verticilada e, em alguns gêneros, estes podem estar contidos em esporângios (*Streptosporangium*, *Planomonospora*). Os Actinoplanaceae formam esporângios, com geralmente um único esporo, podendo conter até três esporos por esporângio, com superfície lisa (Lechevaier & Lechevaier, 1965; Williams et al., 1983; Embley & Stackebrandt, 1994). Alguns gêneros fragmentam as hifas resultando em elementos de tamanho irregular, outros permanecem estáveis e produzem artrospóros. Muitos destes microrganismos produzem esporos nas hifas aéreas, estes sendo hidrofóbicos e adaptados para dispersão no ar. Actinomicetos formadores de esporângios e o gênero *Micromonospora* que não formam hifas aéreas produzem esporos hidrofílicos que se dispersam pelo solo através do

movimento da água (McCarthy & Williams, 1992). Alguns actinomicetos são patógenos de humanos e de plantas. Os esporos de *Saccharomonospora* e *Saccharopolispora*, que estão associadas à deterioração de cereais estocados podem causar alveolite em humanos (Embley & Stackebrandt, 1994).

Embora grande parte dos antibióticos produzidos por actinomicetos, sejam predominantemente sintetizados por *Streptomyces*, espécies pertencentes a *Nocardia*, *Micromonospora*, *Pseudonocardia* e *Thermoactinomyces* também os produzem (Lechevaier & Lechevaier, 1965; Embley, 1994).

2.4.2.2 Classificação de actinomicetos

As primeiras classificações de actinomicetos foram realizadas com base nas características morfológicas; tentativas para uma nova classificação deste grupo avaliaram a composição química da parede celular. Os primeiros estudos, identificaram quatro diferentes composições da parede, onde dois tipos de parede seriam característicos de actinomicetos aeróbios e os outros dois seriam característicos de actinomicetos microaerófilos–anaeróbios. Estes últimos conteriam grande quantidade de lisina e o outro grupo, aeróbio, conteria ácido diaminopimélico. Posteriormente, análises de composição de parede (principalmente açúcares, aminoácidos e lipídios), assim como características fisiológicas, foram empregadas para uma reclassificação. Critérios para identificar actinomicetos têm incluído as mais diversas características: 1) análises das estruturas reprodutivas como tamanho, número e forma de esporos; 2) análises da superfície dos esporos: lisa, enrugada, espinhosa ou felpuda. Mais recentemente no Bergey's Manual of

Determinative Bacteriology, os actinomicetos estão classificados dentro do Filo e da classe Actinobacteria, compreendendo 6 ordens, 39 famílias, 139 gêneros e centenas de espécies. As actinobactérias compartilham duas características, todas são Gram positivas e apresentam uma alta razão de guanina/citosina em seu DNA, podendo exceder 70 % do total de bases nucleotídeas.

Os recentes progressos em biologia molecular e genética de populações têm aumentado a quantidade de informações, disponibilizado-as para a classificação de microrganismos relativamente próximos (Kataoka et al., 1997; Peteres et al., 2000; Roberts & Crawford, 2000). A aplicação de técnicas moleculares para amostras ambientais tem permitido a análise da diversidade microbiana, sem a necessidade de cultivá-las. Procedimento de cultivo pode inevitavelmente favorecer o crescimento de alguns membros, enquanto outros são inibidos ou não cultiváveis. As técnicas de cultivo subestimam a diversidade presente nos diferentes ambientes. Marcadores moleculares genéticos são poderosas ferramentas para análises de relações genéticas e diversidade. Métodos genotípicos têm sido aplicados para identificar isolados microbianos revelando a macrodiversidade entre espécies e microdiversidade em populações clonais (Martin et al., 2000).

As análises de seqüências de proteínas e ácidos nucleicos têm sido empregadas para determinar as relações filogenéticas entre os diferentes grupos de actinomicetos e gêneros relacionados. Devido às potenciais aplicações dos metabólitos secundários produzidos por estes microrganismos, principalmente por *Streptomyces*, e com vistas no longo tempo requerido para o isolamento e identificação destes organismos empregando provas

tradicionais, as técnicas moleculares têm sido amplamente utilizadas. A partir da análise molecular busca-se uma forma mais rápida e precisa para identificação. Muitos aspectos da filogenia microbiana e evolução, investigados via árvores filogenéticas, são produzidos por análises de seqüências da subunidade 16S rDNA. Monciardini et al. (2002) desenharam cinco pares de oligonucleotídeos iniciadores para identificação da ordem Actinomycetales e de quatro famílias (Streptomycetaceae, Micromonosporaceae, Streptosporangeaceae e Thermomonosporaceae). Os oligonucleotídeos apresentaram uma especificidade de 97-98%. Seqüenciamento do gene 16S rRNA é um poderoso método para elucidação das relações genéticas entre organismos procarióticos e tem sido amplamente empregado para facilitar a identificação diferencial do gênero *Streptomyces* (Song et al., 2004).

A análise da seqüência do gene 16S rDNA tem sido reportada por diversos trabalhos (Kataoka et al., 1997; Roberts & Crawford, 2000), no entanto, análises das seqüências das regiões 23S e 5S do rDNA também têm sido empregadas (Mehling et al., 1995). As técnicas moleculares, como “restriction fragment length polymorphism” (RFLP) e “randomly amplified polymorphic DNA” (RAPD) têm sido empregadas para distinguir linhagens (Martin et al., 2000).

2.4.3 Actinomicetos celulolíticos

Os actinomicetos são capazes de utilizar uma variedade de fontes de carbono, sejam monossacarídeos, dissacarídeos ou polissacarídeos (celulose). A produção de celulasas por estes microrganismos tem sido avaliada por diversos trabalhos, os quais têm empregado fontes de celulose

(bruta e purificada, cristalina e amorfa) para induzir a síntese de celulases. As melhores condições para o crescimento dos microrganismos como temperatura, aeração, pH e concentração do substrato, assim como para a atividade destas enzimas, têm sido reportadas. Apesar deste grupo ser extremamente diverso, quatro gêneros têm sido mais amplamente estudados em relação à sua atividade celulolítica: *Microbispora*; *Streptomyces*; *Thermoactinomyces* e *Thermomonospora*, incluindo actinomicetos mesofílicos e termofílicos (Stutzenberger, 1971; Crawford & McCoy, 1972; Ishaque & Kluepfel, 1980; Wachinger et al., 1989; Lao et al., 1991; Sprey & Bochem, 1992; Okeke, 1995; Gallagher et al., 1996; Yazdi et al., 2000; Tuncer et al., 2004).

Streptomyces reticuli produz celulases somente quando crescido com celulose microcristalina; o crescimento com glicose, glicerol ou CMC inibe a produção destas enzimas, que apresentam ótima atividade a 55°C e em pH neutro, tendo peso molecular de 82 kDa (Schrempf & Walter, 1995).

Li et al. (1997; 1998) reportaram celulases produzidas por *Streptomyces* spp. que apresentam ótima atividade a temperaturas entre 50-55 °C e são estáveis em uma ampla faixa de pH, sendo seu ótimo entre 5,5 e 6,4. *Streptomyces rochei* produz endoglicanases e β -glicosidase quando crescido à temperatura de 42°C (Perito et al., 1994; Tamburini et al., 2004).

Embora o peso molecular de grande parte das celulases produzidas por *Streptomyces* varie entre 23 e 82 KDa, celulases com peso inferior a 10 kDa têm sido reportadas (Stutzenberger et al., 1971; Hägerdal et al., 1978; Perito et al., 1994; Garda et al., 1997; Li et al., 1998).

Actinomicetos termofílicos têm recebido atenção especial, principalmente por produzirem enzimas estáveis a altas temperaturas e ampla faixa de pH. *Termomonospora sp.* e *Termomonospora fusca*, têm exibido ótima atividade celulolítica na presença de fontes solúveis (glicose, celobiose, xilose e CMC) como em fontes insolúveis (celulose microcristalina e grama seca) a temperaturas entre 50°C – 60°C e apresentam atividade numa faixa de pH entre 4 e 9 (Stutzenberger & Lupo, 1985; Spiridonov & Wilson, 1998; George et al., 2001). *Thermoactinomyces* apresenta ótima atividade celulolítica com celulose microcristalina a uma temperatura de 55 °C. O peso molecular das celulasas produzidas por este actinomiceto varia entre 37 e 46 kDa (Stutzenberger, 1971; Hägerdal et al., 1978).

Microbispora bispora, outro actinomiceto termofílico, produz um sistema completo de celulasas incluindo cinco endoglucanases, duas celobiohidrolases e uma β -glicosidase, cujo gene *ggh A* que a codifica já foi clonado e seqüenciado (Goyal & Eveleigh, 1996).

Muitas das celulasas produzidas por actinomicetos foram purificadas, caracterizadas, seqüenciadas e clonadas (Mastromei et al., 1992; Wittmann et al., 1994; Goyal & Eveleigh, 1996; Garda et al., 1997).

2.5 Potenciais aplicações de celulasas

Nas últimas décadas, atenção especial tem sido dada a processos de bioconversão, especialmente isolamento, purificação, caracterização e clonagem de enzimas capazes de degradar compostos constituídos por celulose, hemicelulose e lignina. Um futuro promissor, com a aplicação destas enzimas nas indústrias têxtil, no tratamento de papéis e de polpas para a

remoção ou parcial hidrólise de resíduos de xilana para o seu branqueamento, têm despertado o interesse dos mais diversos grupos (Bisaria & Ghose, 1981; Bhat & Bhat, 1997). Da mesma maneira, a bioconversão da celulose à glicose abre caminhos para aplicações de processos enzimáticos microbianos para obtenção de etanol ou para produção de proteínas de células únicas para alimentos (Rabinovich et al., 2002b). Preparações de celulases têm sido empregadas para a clarificação de sucos de frutas, onde partículas de polpa permanecem. São também empregadas para auxiliar a extração de sucos e óleos de sementes e no processamento de ração animal para melhorar a digestibilidade de animais monogástricos (Malek et al., 1988). Celulases podem ser adicionadas a amaciantes de roupas para “aparar” microfibrilas de roupas, que após várias lavagens tendem a se desprender. Na indústria têxtil são empregadas para remover o excesso de cor, para estonação de jeans e para o amaciamento das fibras (Bhat & Bhat, 1997; Lynd et al., 2002). Outra importante área é o tratamento de resíduos de celulose, municipais ou agrícolas. A biomassa destes resíduos acumula-se em grandes quantidades a cada ano, resultando na deterioração do ambiente e uma perda de recursos potencialmente valiosos. A bioconversão destes poderia ser uma solução prática para estes problemas. Apesar das inúmeras aplicações, parece que a maior utilização destas enzimas é para conversão à glicose e posterior fermentação na produção de solventes e combustíveis (Bhat & Bhat, 1997; Howard et al., 2003).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Amostras

Para a realização deste trabalho foram empregados 30 isolados de actinomicetos provenientes de leiras de compostagem da Central de Triagem e Compostagem de Resíduos Sólidos de Sapiranga e de uma composteira experimental da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. A coleta das amostras, o isolamento e a identificação bioquímica dos actinomicetos foram realizados por Oliveira (2002).

3.2 Isolamento bacteriano

Os isolados de actinomicetos estavam conservados em glicerol 15% a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Para reavivar as células e para uma posterior confirmação da identificação, uma alíquota de $100\text{ }\mu\text{L}$ das amostras foi semeada, através da técnica de espalhamento em superfície com alça de Drigalski em placas de Petri com o meio ágar amido caseína (ACA) (8.1.1). As placas foram incubadas em estufa a 37°C por 7-10 dias. Após o período de incubação, colônias foram

semeadas em placas com ACA através da técnica de esgotamento. Após 10 dias de incubação, a 37 °C, realizou-se a coloração de Gram e uma vez confirmada a pureza das colônias, as mesmas foram transferidas para tubos inclinados com ACA, incubados a 37°C por mais 10 – 14 dias.

3.3 Identificação morfológica

Para confirmar a identificação dos isolados de actinomicetos, os mesmos foram submetidos a análises morfológicas. Para observar a estrutura do micélio, a presença de hifas sob o substrato e hifas aéreas, bem como a fragmentação das mesmas, a produção de esporos ou a formação de esporângio foi realizada a técnica do microcultivo. Em uma placa de Petri contendo um pedaço de algodão, uma lâmina de microscópio e dois palitos (tudo estéril), foi realizado o microcultivo. Sobre a lâmina foi adicionado 1 mL de ágar nutriente 1,5% a uma temperatura de 40 °C. Após a solidificação do meio o actinomiceto foi inoculado, através de um risco transversal, com o auxílio de uma alça de platina. Uma alíquota de 1,5 mL de água estéril foi adicionada ao algodão para manter a umidade no meio. As placas foram incubadas a uma temperatura de 37 °C durante 10-14 dias. Após o período de incubação, as lâminas foram observadas em microscópio óptico com aumento de 400X. Através desta técnica é possível visualizar as estruturas reprodutivas e com isso identificar os microrganismos em nível de gênero.

3.4 Identificação bioquímica

Uma vez realizado microcultivo dos isolados, os mesmos foram submetidos às provas bioquímicas clássicas (Shirling & Gottlieb, 1966; Williams et al., 1983; Holt et al., 1994). Para a identificação bioquímica avaliou-se a utilização de diferentes fontes de carbono, de nitrogênio, degradação de diferentes substratos (amido, caseína, esculina, gelatina, tirosina, xantina), redução de nitrato, crescimento em diferentes concentrações de NaCl, produção de pigmentos e produção de gás sulfídrico.

3.4.1 Utilização de diferentes fontes de carbono e nitrogênio

As provas bioquímicas para utilização de fontes de carbono e nitrogênio foram realizadas em meio sólido. As amostras foram inoculadas em placas de Petri com meio basal suplementado com diferentes fontes de carbono (8.2.1) (arabinose, celobiose, frutose, galactose, lactose, manitol, ramnose, rafinose, salicina, trealose) e de nitrogênio (8.2.2) (arginina, cisteína, fenilalanina, histidina, nitrato de potássio, treonina). As amostras foram inoculadas com o auxílio de uma alça, na forma de estrias, sendo inoculados seis isolados em cada placa. As placas foram incubadas à temperatura de 37 °C durante 10-14 dias. Para proceder a posterior leitura das placas, as amostras foram inoculadas em placas - controle, onde o controle - positivo para as fontes de carbono era composto do meio basal suplementado com glicose e o controle positivo para nitrogênio, suplementado com aspargina ou prolina. As placas controle - negativo consistiam somente de meio basal, sem qualquer fonte de C ou N. Para leitura dos testes, o crescimento dos isolados, nas placas com a fonte de carbono testada, foi comparado com o crescimento

nas placas dos controles positivos e negativos. As amostras eram consideradas positivas quando seu crescimento era igual ou superior ao seu crescimento na placa controle positivo.

3.4.2 Produção de pigmentos

Para avaliar a coloração dos esporos os isolados foram inoculados em placas de Petri com o meio amido sais minerais (8.2.3). A cor do micélio sobre o substrato foi determinada inoculando-se as amostras em ágar glicerol-aspargina (8.2.4). A produção de pigmentos difusíveis, a melanina, foi avaliada em meio agar tirosina (8.2.5). As amostras foram semeadas em estrias e as placas incubadas durante um período de 14 dias à temperatura de 37° °C.

3.5 Avaliação qualitativa da atividade celulolítica de actinomicetos em placas com CMC

A avaliação da atividade celulolítica foi realizada em placas de Petri com o meio de cultivo proposto por Tuncer et al. (1999) (8.3) suplementado com 0,5% de carboximetilcelulose. Os isolados de actinomicetos foram inoculados, em triplicata, com uma agulha em “picada” e as placas foram incubadas à temperatura de 35 °C por 5 dias. Para a visualização do halo de hidrólise as placas foram coradas com uma solução de vermelho congo 0,03% e posteriormente lavadas com NaCl 1 M (Teather & Wood, 1983). Os halos de hidrólise foram medidos (halo de hidrólise - halo da colônia) para selecionar os isolados com maior potencial celulolítico.

3.6 Identificação molecular

Após a identificação bioquímica das amostras realizou-se a identificação molecular utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores para a amplificação de fragmentos do rDNA 16S. Foi empregada a técnica da reação em cadeia da polimerase.

3.6.1 Extração de DNA das amostras de actinomicetos

Os isolados de actinomicetos foram inoculados em Erlenmeyer de 100 mL com 20 mL de meio infuso de cérebro e coração BHI (8.4.1). Os frascos foram incubados à temperatura de 37 °C a 120 r.p.m. (Shaker Certomat Bs-1, B. Braun Biotech International) durante 48 horas. As células obtidas após centrifugação a 5000 r.p.m. por 20 minutos (Sigma Laborzentrifugen 2K15) foram ressuspensas em 5 mL de tampão SET (8.4.2). A lisozima, em concentração de 1 mg/mL (8.4.3), foi adicionada e esta mistura que foi incubada em banho de água a 37 °C por uma hora. Posteriormente adicionou-se SDS (concentração final de 1%) (8.4.4) e uma solução de proteinase K com concentração final de 0,5 mg/mL (8.4.5). A mistura foi incubada em banho de água a 55 °C por duas horas. Após, adicionou-se uma solução de NaCl 5M a uma concentração final de 1,25 M. A mistura foi homogeneizada e um volume igual de clorofórmio foi adicionado e misturado por inversão durante 30 minutos. Após centrifugação (20 minutos, 5 000 r.p.m.), o sobrenadante foi transferido para tubos de microcentrífuga e extraído duas vezes com fenol, uma vez com fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (8.4.6) e duas vezes com clorofórmio/álcool isoamílico (8.4.7). O sobrenadante foi desprezado e ao DNA foi adicionado isopropanol (0,6 volumes). O material foi incubado a -20 °C por

18 horas e posteriormente centrifugado por 20 minutos a 15 000 r.p.m., O isopropanol foi desprezado e o DNA lavado com NaCl 1 M e deixado secar à temperatura ambiente. O DNA foi ressuspedido em 200 µL de TE (8.4.8).

3.6.2 Extração de DNA das amostras controle - negativo

Para a extração do DNA cromossomal das amostras controle (negativo), empregou-se o protocolo de Sambrook et al. (1989). As amostras foram inoculadas em frascos de Erlenmeyer de 100 mL contendo 20 mL de BHI. Os frascos foram incubados a 37°C em agitação de 120 r.p.m. durante 18-24 horas. Posteriormente as amostras foram centrifugadas durante 10 minutos a 5 000 r.p.m.. O sobrenadante foi desprezado e as células bacterianas foram lavadas com NaCl 1M. As células centrifugadas foram ressuspendidas em TE 1X (8.4.9) e adicionados SDS a uma concentração final de 0,6% e lisozima (0,2 mg/mL). A mistura foi incubada a 37 °C em banho de água por uma hora. Após o banho, proteinase K (0,6 mg/mL) foi adicionada e a mistura novamente incubada por 15 minutos a uma temperatura de 56 °C. Um volume de fenol foi adicionado na mistura, homogeneizado e centrifugado por 20 minutos a 5 000 r.p.m. Após este período, o sobrenadante foi transferido para tubos de microcentrífuga e realizou-se uma nova extração com fenol, uma com fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (24:24:1) e duas extrações com clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). Isopropanol, 0,7 volumes, foi adicionado ao sobrenadante, que foi deixado a -20 °C por 16 horas e posteriormente centrifugado. O isopropanol foi desprezado, o DNA foi secado à temperatura ambiente, e após ressuspendido em 50 µL de TE .

3.6.3 Quantificação do DNA por intensidade de banda

A quantificação do DNA das amostras foi realizada por comparação de intensidade das bandas, em gel de agarose 1 % (8.4.10) e com brometo de etídeo (8.4.11) utilizando-se DNA lambda de concentração conhecida como controle.

3.6.4 Reação em cadeia da polimerase

3.6.4.1 Oligonucleotídeos iniciadores

Foram empregados oligonucleotídeos iniciadores, F243 e R513, para amplificação de fragmentos de DNA da região 16S do rDNA dos actinomicetos.

F243 (226-243) - 5' GGATGAGCCCGCGGCCTA 3'

R513 (513-528) - 5' CGGCCGCGGCTGCTGGCACGTA 3'

O F243 foi desenhado por Heuer et al. (1997), sendo específico para a região 16S do rDNA de actinomicetos; o oligonucleotídeo iniciador R513 anela a um domínio universalmente conservado e possui uma base adenina na extremidade 3', fazendo com que este anele preferencialmente com bactérias Gram positivas e β -proteobactérias. Este par de oligonucleotídeos anela na região V3 variável do 16S rDNA e produz um fragmento de 302 pb.

Para a identificação do gênero *Streptomyces* utilizou-se três oligonucleotídeos iniciadores StrepB, StrepE e StrepF (Rintala et al., 2001).

StrepB (139-158) - 5' ACAAGCCCTGGAAACGGGGT 3'

StrepE (640-657) - 5' CACCACCAATTCCCATCT 3'

StrepF (1194-1212) - 5'ACGTGTGCAGCCCAAGACA 3'

Embora a região 16S do rDNA seja altamente conservada entre os procariotos, apresentando similaridade entre *Streptomyces griseus*, *E. coli* e *B. subtilis* (70 e 80% respectivamente), estas seqüências contêm regiões variáveis adequadas para distinguir taxa. As regiões V1-V8 têm sido empregadas para a construção de oligonucleotídeos específicos, especialmente as regiões V2, V6 e V7 para distinguir espécies de *Streptomyces*. Os oligonucleotídeos StrepB e StrepF amplificam um fragmento de 1074 pb (região V1-V8 do gene 16S rRNA) e os oligonucleotídeos StrepB/StrepE amplificam um fragmento, mais interno, de 519 pb (região entre V1/V2 –V4/V5) (Rintala et al., 2001).

3.6.4.2 Condições para amplificação

Para a amplificação dos fragmentos 16S rDNA dos actinomicetos a PCR foi realizada num aparelho termociclador (Mastercycler personal Eppendorf). Foi utilizada a seguinte mistura : DNA (20 ng); MgCl₂ (2,5 mM); tampão de reação 1X; oligonucleotídeos iniciadores (158 nM de cada); desoxinucleotídeos (0,3mM de cada) (8.4.12); albumina de soro bovino (100 ng); 1 unidade de Taq polimerase e água estéril para completar volume de 25 µL.

Os controles negativos para a reação foram *Escherichia coli* (ATCC 11105), *Bacillus subtilis* (ATCC 19659) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145); como controles positivos foram empregadas amostras de *Streptomyces rochei* (ATCC 10739) e *Rhodococcus equi* (ATCC 6939).

Para as amplificações dos fragmentos específicos de *Streptomyces*, foi utilizada a mesma mistura de reação descrita acima, sendo que a

concentração final dos oligonucleotídeos StrepB/StrepF foi de 0,3 μ M e para os oligonucleotídeos StrepB/StrepE foi de 0,6 μ M .

As condições de amplificação empregando os oligonucleotídeos F243 e R513 foram as descritas por Heuer et al. (1997): 5 minutos de desnaturação inicial a 94 °C; 35 ciclos, 1 minuto de desnaturação a 94 °C, 1 minuto de anelamento a 63 °C e 2 minutos de extensão a 72 °C; 10 minutos de extensão final a 72 °C. Para a amplificação dos fragmentos específicos para o gênero *Streptomyces* foram empregadas as condições descritas por Rintala et al. (2001), com modificação do tempo de anelamento para cada par de oligonucleotídeos: 5 minutos de desnaturação inicial a 98 °C, 30 ciclos de 1 minuto de desnaturação a 95 °C, 1 minuto de anelamento a 58 °C (StrepB/StrepF) e 54 °C para StrepB/StrepE, 2 minutos de extensão a 72 °C e 10 minutos de extensão final a 72 °C.

3.6.4.3 Eletroforese em gel de agarose

Os fragmentos obtidos através da técnica da PCR foram observados em gel de agarose 1% , corados com brometo de etídeo. O gel foi submetido a uma voltagem de 60 Volts em tampão TAE 1X (8.4.13) por um período de 45 minutos e os fragmentos foram visualizados através de transluminador com luz ultra violeta e fotografados com uma máquina Kodak DC 120 1 (Zoom Digital Picture Transfer Application versão 3.5.2).

3.7 Condições de crescimento dos isolados em culturas submersas

3.7.1 Curva de crescimento

Para determinar o tempo de geração do isolado celulolítico, o tempo de crescimento necessário para os experimentos de produção de enzimas e para determinar os intervalos de coleta de amostra para realização dos ensaios enzimáticos, foi realizada uma curva padrão. Um pré-inóculo de 5 mL, crescido por 24 horas, foi adicionado a 12 frascos de Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultivo (8.3) suplementado com 1% de glicose. Os frascos foram incubados à temperatura de 35 °C, durante 144 horas em agitação. Em intervalos de 12 horas foi determinada a massa celular através do peso seco.

3.7.2 Condições de crescimento dos isolados

Para avaliar a produção de celulases dos actinomicetos que apresentaram as melhores atividades em placas com CMC foi realizado um experimento em meio de cultivo líquido. Este ensaio foi realizado para determinar o isolado de actinomiceto celulolítico que seria utilizado para os demais experimentos. Em frascos de Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultura (8.3) suplementado com 0,5% de CMC, foram inoculados 5 mL de um pré-inóculo de actinomiceto celulolítico, crescido por 24 horas, a uma temperatura de 35 °C e 150 r.p.m. Os frascos foram incubados durante 144 horas. Cada isolado foi inoculado em 12 frascos (duplicata para cada dia), sendo determinada a atividade enzimática (3.8) dos isolados em intervalos de 24 horas.

3.7.3 Determinação da produção de celulases em diferentes substratos

Para avaliar a influência do substrato na produção de celulase, o isolado celulolítico selecionado no experimento anterior (3.7.2) foi crescido com quatro diferentes fontes de celulose: CMC, celulose microcristalina, palha de aveia e palha de milho (triturados e sem prévio tratamento). Para cada experimento foram empregados 18 frascos de Erlenmeyer de 250 mL com 50 mL de meio de cultivo (8.3) acrescido de 0,5% de uma das fontes de celulose. Destes frascos, 12 foram inoculados com o actinomiceto pré-crescido por 24-48 horas. Os demais 6 frascos (não inoculados) foram empregados como controle quando da determinação da massa celular. As culturas foram crescidas em agitação de 150 r.p.m. por um período de 144 h, nas temperaturas de 30, 35 e 40 °C. Os 6 frascos não inoculados foram incubados nestas mesmas condições. A cada 24 horas era determinada a biomassa celular, a atividade enzimática e o pH das amostras. Para determinar a massa celular, as culturas e os meios de cultivo sem microrganismo (controle) foram filtrados em sistema com membrana de 0,45 µm. Após filtração as membranas foram mantidas em estufa de 40 °C para secagem e posteriormente foram pesadas.

3.8 Determinação da atividade enzimática

A atividade enzimática no extrato foi determinada pela dosagem de açúcares redutores conforme o método de Somogyi e Nelson (Nelson, 1944; Somogyi, 1952). Para determinar a atividade de celulases, 1,5 mL da cultura foi centrifugado a 10 000 r.p.m. durante 15 minutos e 400µL do sobrenadante foram utilizados para cada ensaio. A reação foi realizada em tubos de ensaio

com 1,5 mL de CMC a 0,5 % e 100 μ L de acetato de sódio (pH 7,0). Os tubos para o ensaio enzimático foram incubados em banho de água a 30 °C durante 30 minutos. Após a incubação foi adicionado 1 mL do reativo de Somogy (25 partes do reagente A para 1 parte do reagente B) (8.5.1.1 e 8.5.1.2) e os tubos foram colocados em banho de água fervente durante 10 minutos, sendo posteriormente resfriados em banho de água fria e adicionado 1 mL do reativo de Nelson (8.5.1.3). Em cada tubo foram acrescentados 6 mL de água destilada. Os tubos foram agitados para homogeneização da amostra e centrifugados por 10 min. Após centrifugação, a absorbância foi determinada em um fotocolorímetro com comprimento de onda de 570 nm. Uma unidade de atividade enzimática (UEA) foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 μ mol de glicose/mL/min. Glicose foi utilizada como padrão para determinação de açúcares redutores na amostra. Curvas padrões de glicose foram realizadas em intervalos de 10-15 dias.

3.9 Propriedades do extrato bruto e da enzima concentrada

A amostra foi crescida em 6 Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio com 0,5 % de palha de milho como fonte de celulose, durante 96 horas a uma temperatura de 35 °C e agitação de 150 r.p.m. Cada três frascos foram reunidos para formarem uma amostra. Após, as culturas foram filtradas em membrana de 0,45 μ m em ambiente estéril. Uma das amostras com volume de 150 mL, foi empregada para avaliar o efeito da temperatura e do pH na atividade de hidrólise da enzima no extrato bruto. A outra porção foi reservada para concentrar a enzima.

3.9.1 Avaliação do efeito da temperatura e do pH na atividade enzimática

3.9.1.1 Efeito da temperatura sobre a atividade ótima e termoresistência das celulases no extrato bruto

Para avaliar o efeito da temperatura na atividade enzimática, os ensaios foram realizados em banhos de água nas diferentes temperaturas (30, 40, 50, 60 e 70 °C), com 0,5 % CMC durante 30 minutos de reação.

Para avaliar a termoresistência das celulases, tubos de ensaio contendo 2 mL do extrato bruto foram incubados em banho de água a temperaturas entre 30 - 70°C durante 30 minutos. Após o banho de água, foram realizados ensaios enzimáticos para se verificar a atividade residual das celulases. Os experimentos e os ensaios enzimáticos foram realizados em duplicatas.

3.9.1.2 Efeito do pH sobre a atividade enzimática e estabilidade das celulases no extrato bruto

Para verificar a influência do pH sob a atividade de hidrólise das celulases, as reações enzimáticas foram realizados em tubos de ensaio com 1,5 mL de CMC 0,5% acrescidos com 100 µL de solução tampão. Foram empregados os valores de pH de 5,0 a 10,0. A solução tampão de McIlvaine (fosfato dissódico e ácido cítrico) (8.6.1) foi empregada para os valores de pH entre 4,0 e 8, e a solução de Sørensen (glicocol -NaOH) (8.6.2) para os valores de 9,0 e 10,0. Os experimentos foram realizados em banho de água a temperatura de 30 °C durante 30 minutos. A estabilidade das celulases foi avaliada incubando-se tubos de ensaio com 2 mL de amostra à temperatura de

30 °C durante 30 minutos, com os diferentes tampões; após a incubação realizou-se o ensaio enzimático para determinar a atividade residual das enzimas.

3.9.2 Concentração da enzima

Um volume de 150 mL da amostra obtida como descrito anteriormente (3.9) foi previamente filtrado em membrana de 0,45 μ m. Após, o mosto foi concentrado (10 vezes) no sistema Nucleopore, com uma membrana de 10 kDa, sob pressão de 5 bar, durante 40 minutos e mantido a – 4 °C para posterior caracterização.

3.9.2.1 Atividade enzimática do extrato bruto e da enzima concentrada

Para avaliar-se o efeito da concentração da enzima sobre a atividade de hidrólise, foram realizados novos ensaios enzimáticos. Empregou-se as concentrações de 0,5, 1 e 2 % de CMC e os tempos de 15, 30 e 60 minutos para determinar a atividade enzimática. A amostra bruta da enzima foi testada juntamente com a enzima concentrada para comparação dos resultados.

3.9.2.2 Avaliação da estabilidade térmica das celulasas

Uma vez determinada à temperatura ótima para a hidrólise do substrato foram realizados experimentos nas temperaturas de 40 e 50 °C para a determinação da estabilidade térmica das celulasas produzidas. Os tubos de ensaio contendo 2mL do extrato bruto foram incubados por 5 horas nas diferentes temperaturas. Em intervalos de 60 minutos foi determinada a

atividade das celulasas. Para determinar a estabilidade térmica no extrato concentrado empregou-se a temperatura de 40 °C.

3.9.2.3 Caracterização da enzima produzida pelo isolado celulolítico selecionado: SDS-PAGE e zimografia

A massa molecular e a atividade das celulasas produzidas pelo isolado foram determinadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 12 % (8.7.1) em condições desnaturantes (PAGE/SDS). Para detectar a atividade das celulasas empregou-se um gel de poliacrilamida (12%) com 0,2% de CMC.

Uma alíquota de 30 µL das amostras foi empregada. Na amostra, bem como nos marcadores moleculares (kit MSW/SDS/200 e Promega V849A), foi adicionado tampão de corrida (5 amostra para 1 tampão) (8.7.2). A migração eletroforética foi realizada em tampão Tris/Glicina (8.7.3) a uma voltagem de 200 Volts durante 2 horas. Após a corrida o gel com CMC foi partido, uma parte sendo imediatamente corada com azul de Comassie (8.7.4) para determinação da massa molecular, durante o período de 4 h. Após a coloração, o gel foi descorado (8.7.5) durante 12 horas e posteriormente lavado com água destilada para remover os resquícios de corante. A outra parte do gel foi corada com uma solução de vermelho congo 0,1% para visualização das zonas de hidrólise.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Identificação bioquímica dos isolados

As trinta amostras de actinomicetos que haviam sido isoladas e identificadas por Oliveira (2002) a partir de processo de compostagem, foram recuperadas de estoques contendo glicerol 15% e confirmada a sua identificação. Os isolados foram identificados a partir das análises morfológicas de microcultivo e provas bioquímicas (Shirhling & Gottlieb, 1966; Williams et al., 1983; Holt et al., 1994). Os trinta isolados foram identificados como pertencentes ao gênero *Streptomyces*. Foram identificadas sete diferentes espécies, com predominância de *S. cyaneus* (9), *S. grupo C* (8) e *S. griseoviridis* (6). Somente um isolado de *S. diastaticus* e *S. lavendulae* foram identificados, conforme mostra a Tabela 1. Segundo alguns trabalhos há predominância do gênero *Streptomyces* em processos de compostagem (McCarthy & Williams, 1992; Tuomela et al., 2000; Oliveira, 2002). Avaliando a presença de actinomicetos em amostras de solo, feno, esterco e composto, Ramirez e Cocha (2003) isolaram um total de 158

actinomicetos, destes 83% (131) foram isolados do composto e o gênero *Streptomyces* foi predominante entre os isolados, representando 50,63% das amostras. Taiwo e Oso (2004), avaliando a diversidade de populações microbianas durante o processo de compostagem, isolaram e identificaram várias bactérias (Gram positivas e Gram negativas); espécies pertencentes ao gênero *Streptomyces* foram encontrados durante a fase mesofílica e de maturação.

TABELA 1. Espécies de *Streptomyces* e número de isolados identificados.

Espécies de <i>Streptomyces</i>	Nº de isolados
S. do grupo C	8
<i>S. cyaneus</i>	9
<i>S. diastaticus</i>	1
<i>S. griseoviridis</i>	6
<i>S. lavendulae</i>	1
<i>S. rochei</i>	3
<i>S. violaceus</i>	2

4.2 Avaliação da atividade celulolítica em placas com carboximetilcelulose (CMC)

Para avaliar a produção de celulases dos diferentes isolados de *Streptomyces*, os mesmos foram inoculados em placas de Petri com 0,5% de CMC e incubados a temperatura de 35 °C por 5 dias. A visualização do halo de hidrólise foi realizada empregando uma solução 0,03% de vermelho congo.

Áreas de hidrólise aparecem como zonas claras ao redor das colônias (Figura 2). Todos os isolados testados apresentaram atividade celulolítica. As medidas dos halos de hidrólise variaram de 17 mm a 48 mm de diâmetro. Das amostras identificadas, sete dos trinta isolados apresentaram halo de hidrólise igual ou superior a 40 mm e os demais apresentaram medidas inferiores a 32 mm (Tabela 2). Os isolados de *S. cyaneus* (77e, 83e, 84e), *S. grupo C* (34e, 107e, 37s) e *S. rochei* (28s) apresentaram os maiores halos. As espécies pertencentes a *S. griseoviridis* apresentaram valores de 17 a 28 mm de diâmetro. A linhagem 107e, pertencente ao Grupo C, apresentou o maior halo (48 mm), nas demais linhagens as medidas variaram de 27 a 48 mm. Das espécies de *Streptomyces* isoladas por Ramirez e Cocha (2003), 92% apresentaram atividade celulolítica na presença de CMC e filtro de papel. Wirth et al. (2002) avaliaram a atividade celulolítica de 39 isolados de *Streptomyces*, em placas com substratos brutos e purificados (celulose amorfa e cristalina). Nos ensaios realizados todos os isolados hidrolisaram o substrato CMC, destes 11 apresentaram capacidade de hidrolisar tanto celulose pura, amorfa ou cristalina, quanto celulose nativa; outros 11 hidrolisaram formas coloidais, mas não hidrolisaram celulose nativa e cristalina e 17 (43,6%) somente foram capazes de hidrolisar CMC. Resultados similares foram encontrados por Wachinger et al. (1989), onde num total de 160 isolados, 100% hidrolisaram celulose solúvel e somente 24 (15%) hidrolisaram celulose microcristalina.

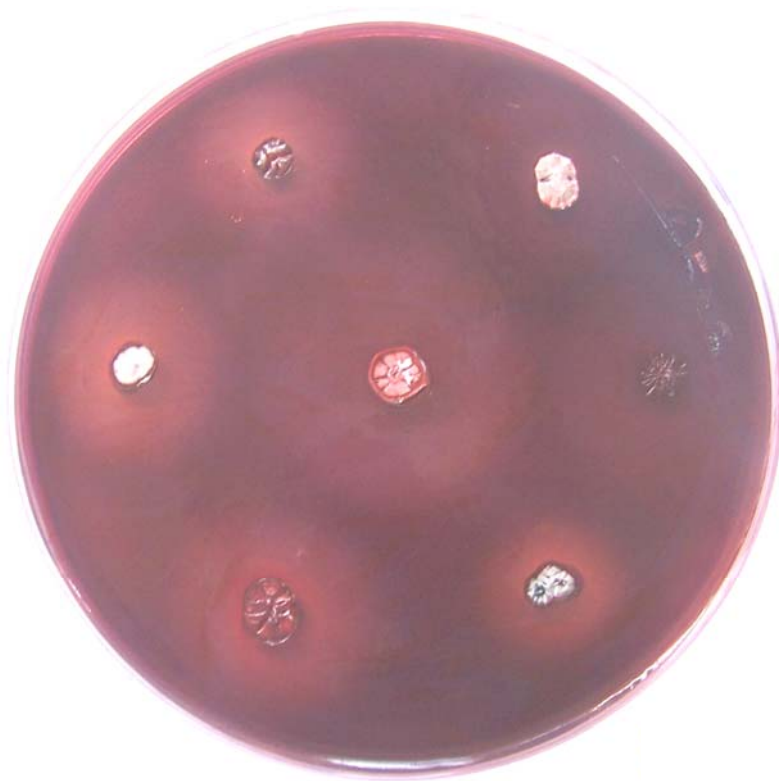


FIGURA 2. Halo de hidrólise de CMC produzidos por (1, 2, 3) *S. cyaneus*, (4, 5, 6) *S.* do Grupo C e (7) *S. rochei*.

TABELA 2. Medidas do halo de hidrólise CMC em placas de Petri pelos isolados de *Streptomyces*.

Amostra	Espécie	Halo de hidrólise (mm)
18e	<i>S. cyaneus</i>	28
22e	<i>S. cyaneus</i>	31
35e	<i>S. cyaneus</i>	29
77e	<i>S. cyaneus</i>	42
80e	<i>S. cyaneus</i>	27
83e	<i>S. cyaneus</i>	40
84e	<i>S. cyaneus</i>	42
2s	<i>S. cyaneus</i>	30
3s	<i>S. cyaneus</i>	23
25e	<i>S. diastaticus</i>	18
6e	S. Grupo C	32
34e	S. Grupo C	42
103e	S. Grupo C	27
107e	S. Grupo C	48
21s	S. Grupo C	28
23s	S. Grupo C	28
31s	S. Grupo C	31
37s	S. Grupo C	42
34e	<i>S. griseoviridis</i>	23
36e	<i>S. griseoviridis</i>	17
100e	<i>S. griseoviridis</i>	24
1s	<i>S. griseoviridis</i>	28
6s	<i>S. griseoviridis</i>	24
43s	<i>S. griseoviridis</i>	21
3e	<i>S. lavendulae</i>	19
8e	<i>S. lavendulae</i>	17
28s	<i>S. rochei</i>	44
48s	<i>S. rochei</i>	31
37e	<i>S. violaceus</i>	19
95e	<i>S. violaceus</i>	21

4.3 Identificação molecular

A reação em cadeia da polimerase foi utilizada, para os sete isolados que apresentaram melhor atividade celulolítica em placas de Petri com CMC, para confirmar os resultados obtidos bioquimicamente, uma vez que para alguns dos isolados foi muito difícil a identificação das características morfológicas quando feito o microcultivo. Os oligonucleotídeos iniciadores F243

e R513 específicos para actinomicetos, foram utilizados inicialmente e os seus produtos de amplificação podem ser observados na figura 3. O produto de amplificação esperado é de 302 pb, o que foi observado em todas amostras inclusive nos controles positivos, *S. rochei* e *R. equi*. As amostras de *E. coli*, *B. subtilis*, e *P. aeruginosa*, controles negativos, não apresentaram nenhum produto de amplificação.

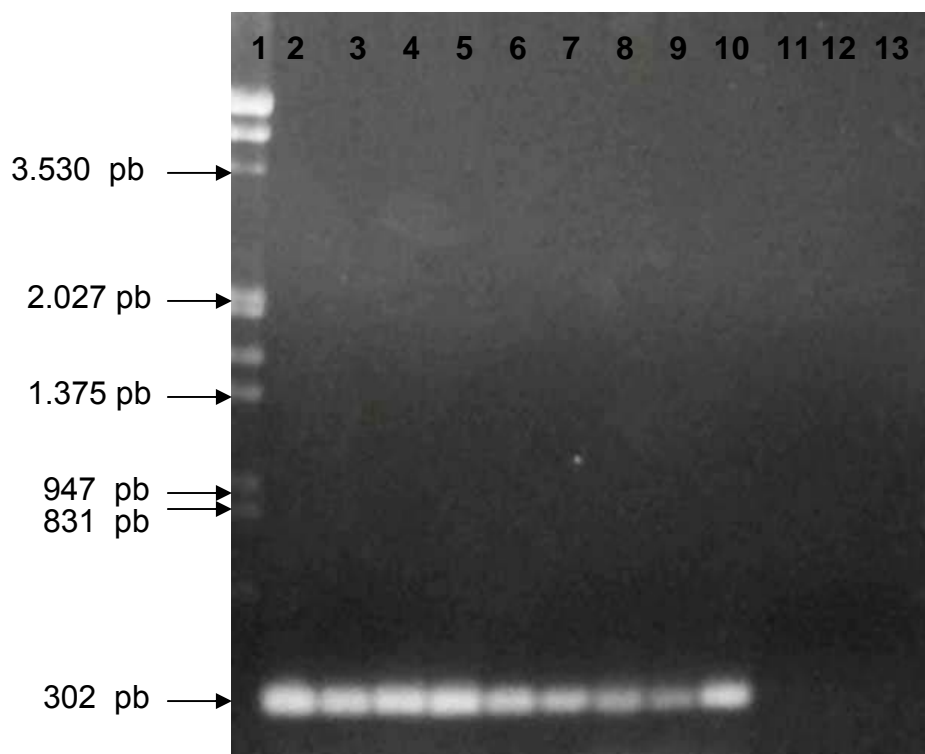


FIGURA 3. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. Produtos de amplificação empregando os oligonucleotídeos F243 e R513. Canaleta (1) marcador molecular, (2) *S. rochei* (ATCC); (3) *R. equi* (ATCC) (4) 28s; (5) 34e; (6) 37s; (7) 77e; (8) 83e; (9) 84e; (10) 107e; (11) *E. coli*; (12) *B. subtilis*; (13) *P. aeruginosa*.

Heuer et al. (1997) empregaram os oligonucleotídeos F243 e R513 para a detecção de actinomicetos no ambiente. Todos os actinomicetos testados foram positivos para a amplificação. Para uma melhor análise das diferenças entre os gêneros empregados, o produto da amplificação foi analisado por “denaturing gradient gel electrophoresis” (DGGE), onde foi possível observar um perfil de mobilidade eletroforética entre muitas das linhagens analisadas. Peteres et al. (2000), empregando o mesmo par de oligonucleotídeos F243 e R513, avaliaram a diversidade da comunidade microbiana durante o processo de compostagem. Análises comparativas destes fragmentos foram realizadas por “amplified ribosomal DNA restriction analysis” ARDRA e DGGE. Os produtos sugerem que a diversidade de actinomicetos aumentou durante o processo de compostagem. Espécies de *Streptomyces nodosus* e *Streptomyces thermodiastaticus* foram identificados e o seu aumento durante o processo foi confirmado. Análises de seqüências da região 16S do rDNA de actinomicetos foram reportados por Monciardini et al. (2002), que empregaram oligonucleotídeos iniciadores para amplificar fragmentos específicos de membros da ordem Actinomycetales e de quatro famílias. O oligonucleotídeo F243 foi empregado para a ordem Actinomycetales. O produto de amplificação de 1.25 pb foi identificado em uma grande variedade de gêneros de actinomicetos. Dos 30 clones gerados a partir dos fragmentos obtidos por amplificação de amostras do solo e clonagem, 29 foram relacionados a essa ordem e um foi relacionado à classe actinobacteria, demonstrando assim uma especificidade de 97% com a ordem Actinomycetales (Monciardini et al., 2002). Populações de actinomicetos endofíticos também

têm sido caracterizadas a partir das seqüências geradas por PCR (Song et al., 2004). Sessitsch et al. (2002) realizaram análises por DGGE dos fragmentos gerados por amplificação com o oligonucleotídeo F243 e verificou a presença de espécies pertencentes aos subgrupos *S. scabiei* e *S. coelicolor* (similaridade entre 99 –100%).

Os oligonucleotídeos StrepB, StrepF e StrepE desenhados por Rintala et al. (2001) foram utilizados para a confirmação do gênero *Streptomyces*. A espécie *Streptomyces rochei*, controle positivo, assim como os sete isolados de *Streptomyces* apresentaram um produto de amplificação de 1074 pb, quando utilizados os oligonucleotídeos StrepB/StrepF (Figura 4) e um produto de 519 pb quando empregado o par de oligonucleotídeos StrepB/StrepE (Figura 5), como era esperado. Os isolados de *E. coli*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa* e o actinomiceto *R. equi*, todos controles negativos para estes dois pares de oligonucleotídeos, não apresentaram produtos de amplificação. Ambos pares de oligonucleotídeos amplificam a região V2 que compreende distintas diferenças entre os Streptomyces (Huddleston et al., 1997).

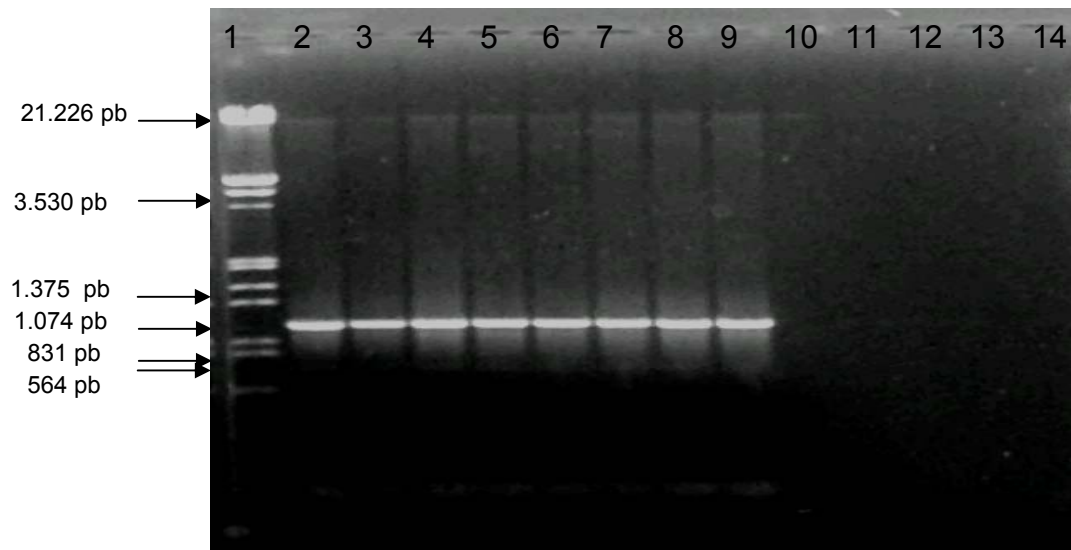


FIGURA 4. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. Produtos de amplificação empregando os oligonucleotídeos StrepB e StrepF (1074 pb). Canaleta (1) marcador molecular (2) *S. rochei* (ATCC); (3) 28s; (4) 34e; (5) 37s; (6) 77e; (7) 83e; (8) 84e; (9) 107e; (10) *R. equi* (ATCC); (11) *E. coli*; (12) *B. subtilis*; (13) *P. aeruginosa* (14) Sem DNA.

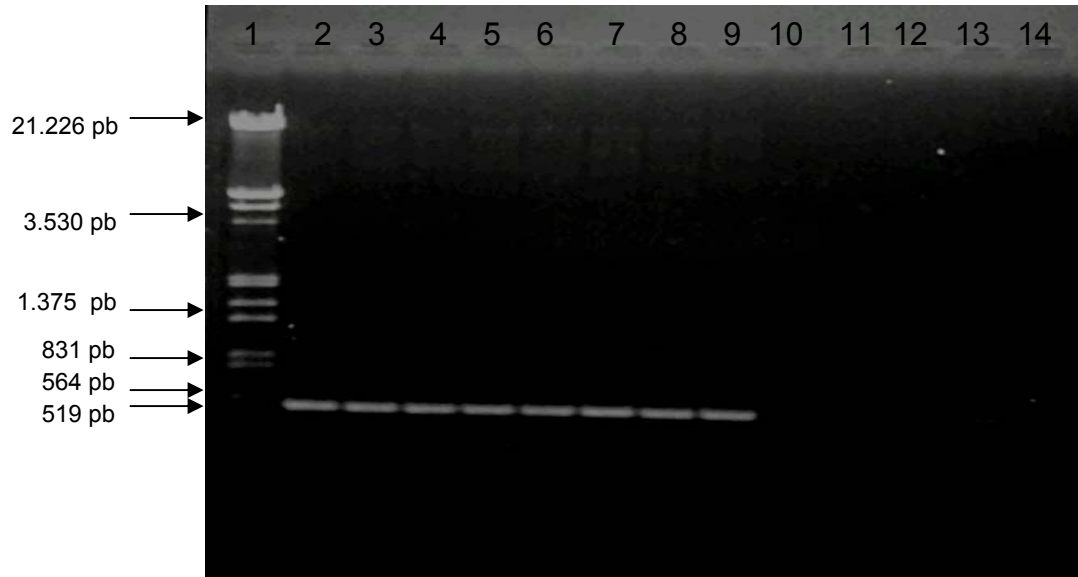


FIGURA 5. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. Produtos de amplificação empregando os oligonucleotídeos StrepB e StrepE (519 pb). Canaleta (1) marcador molecular (2) *S. rochei* (ATCC); (3) 28s; (4) 34e; (5) 37s; (6) 77e; (7) 83e; (8) 84e; (9) 107e; (10) *R. equi* (ATCC); (11) *E. coli*; (12) *B. subtilis*; (13) *P. aeruginosa* (14) Sem DNA.

No trabalho reportado por Rintala et al. (2001), o oligonucleotídeo StrepF pareou perfeitamente com todas as seqüências de *Streptomyces* testados. Os pareamentos perfeitos representaram 96,5% das seqüências, se considerados os três oligonucleotídeos. A especificidade dos oligonucleotídeos foi realizada empregando-se 9 isolados de *Streptomyces* e 10 de outras bactérias (não pertencentes ao gênero). Quando empregados os oligonucleotídeos StrepB/StrepF, *Cellulomonas*, *Promicromonospora* e *Micrococcus* foram positivos para a amplificação, mas análises de fragmentos gerados com endonucleases de restrição, demonstraram um perfil diferente entre estes isolados e os de *Streptomyces*. O oligonucleotídeo StrepF demonstrou ser específico para *Streptomyces*, o que foi confirmado por PCR e digestão com a endonuclease de restrição (BstY1), originando fragmentos de 567 e 507 pares de base.

Os oligonucleotídeos desenhados por Monciardini et al. (2002) para amplificação das seqüências da região 16S do rDNA foram criados para a família Streptomycetaceae, sendo que os produtos obtidos por PCR a partir de amostras do solo foram clonados e parcialmente seqüenciados. Análises das seqüências demonstraram uma especificidade de 97% (22 clones entre os 23 clones gerados). Suutari et al. (2002), analisando seqüências da região 16S, relacionaram as onze linhagens de *Streptomyces* empregadas como pertencentes às espécies *S. griseus* (99,8 %), *S. albidoflavus* (99,7%) e *S. coelicolor* (99,7%). A importância da região 16S tem se confirmado em estudos

de diversidade de espécies pertencentes ao gênero *Streptomyces* (Kataoka et al. 1997; Song et al., 2004).

4.4 Avaliação da atividade celulolítica em culturas submersas com CMC

4.4.1 Curva de crescimento

Com objetivo de se estabelecer as condições de crescimento em culturas submersas dos sete isolados que apresentaram maior atividade celulolítica em meio sólido, foi realizado cultivo com os isolados de *Streptomyces*. A partir dos resultados obtidos estabeleceu-se o período de 144 horas para o crescimento dos isolados e intervalos de 24 horas para se determinar a atividade de celulases (Figura 6).

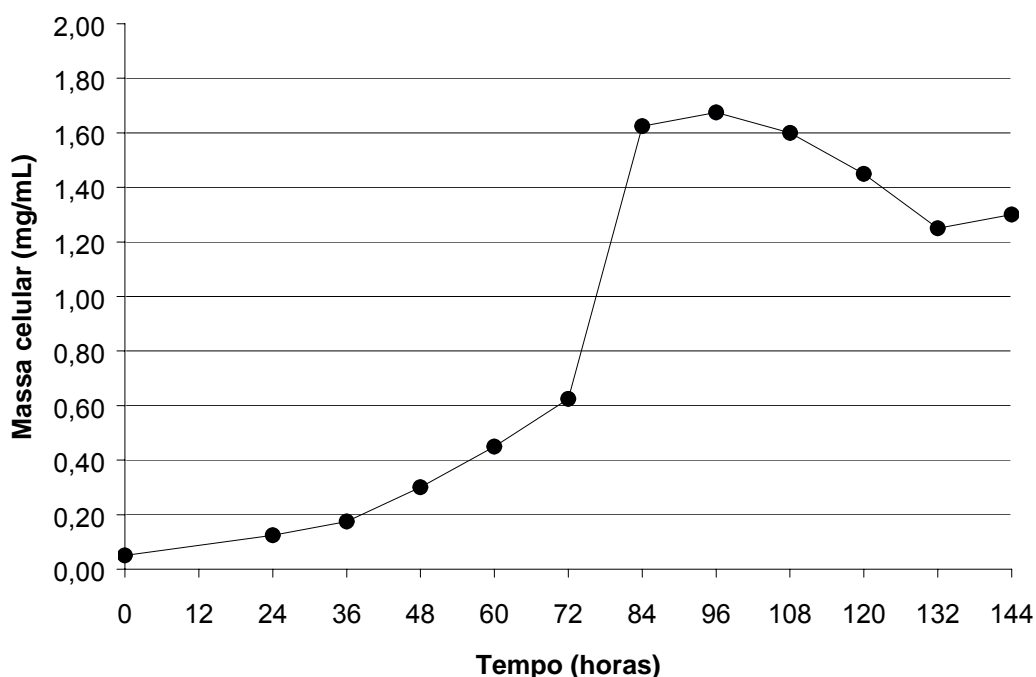


FIGURA 6. Curva de crescimento de *Streptomyces* Grupo C em meio Tuncer et al. (1999) com 1% de glicose, em agitação de 150 r.p.m. durante 144 horas de crescimento.

4.4.2 Atividade celulolítica em culturas submersas

A partir dos dados obtidos pela curva de crescimento estabeleceu-se o tempo de crescimento (144 h) e os intervalos para realização dos ensaios (24 h). Os sete isolados de *Streptomyces* foram utilizados para determinar a atividade celulolítica conforme descrito no item 3.7.2. Para avaliar a atividade de celulasas, a concentração de açúcares redutores nas amostras foi determinada, empregando glicose como padrão.

A produção de celulasas dos sete isolados variou de 2,58 a 7,411 UAEmL/min, conforme é apresentado na Tabela 3. Dos sete isolados, a amostra 83e, *Streptomyces cyaneus*, apresentou menor atividade celulolítica, tendo máxima atividade de 3,51 UAE/mL as 72 horas de crescimento. As amostras 107e e 28s obtiveram maior atividade às 96 horas de crescimento com 7,41 e 5,9 UAE/mL respectivamente. A atividade de celulasas da amostra 107e, diferiu significativamente das demais amostras sendo esta, então, selecionada para otimização da produção de enzimas celulolíticas neste trabalho.

Ramirez e Cocha (2003) reportaram a produção de celulasas por 10 isolados de *Streptomyces*, com 72 horas de crescimento. Os valores de máxima atividade celulolítica também foram atingidos a partir das 72 horas de crescimento por outros isolados de *Streptomyces*, no estudo realizado por Ishaque & Kluepfel (1980).

TABELA 3.. Atividade enzimática (UAE/mL/min) de CMCase em isolados de *Streptomyces*.

Tempo	34e	107e	37s	83e	84e	77e	28s
24h	3,1	4,73	3,51	2,96	2,83	3,51	4,5
48h	4,02	5,66	3,71	3,48	3,38	3,67	5,05
72h	4,15	5,92	4,6	3,51	4,32	4,64	5,57
96h	4,8	7,41	4,83	2,86	4,3	4,85	5,9
120h	5,66	5,8	3,65	2,58	4,18	3,21	4,64
144h	3,7	5,32	3,2	2,64	4,1	3,02	4,3

4.5 Produção de celulases por *Streptomyces* Grupo C 107e

A produção de celulases pelo isolado 107e foi realizada utilizando-se quatro diferentes fontes de celulose (CMC, celulose microcristalina, palha de aveia e palha de milho) e três temperaturas de crescimento 30, 35 e 40 °C. A atividade celulolítica, assim como a massa celular e o pH das amostras, foram avaliados em intervalos de 24 horas.

Nos experimentos realizados para produção de celulases à temperatura de 30 °C, a máxima atividade foi detectada em 96 horas (3,9 UAE/mL) com CMC e (3,6 UAE/mL) com palha de milho. Nos ensaios com palha de aveia, a produção máxima de celulases foi de 2,61 UAE/mL, também em 96 h. Quando crescido na presença de celulose microcristalina, o isolado atingiu máxima atividade de celulases em 120 horas de crescimento, atingindo o valor de 2,87 UAE/mL (Figura 7).

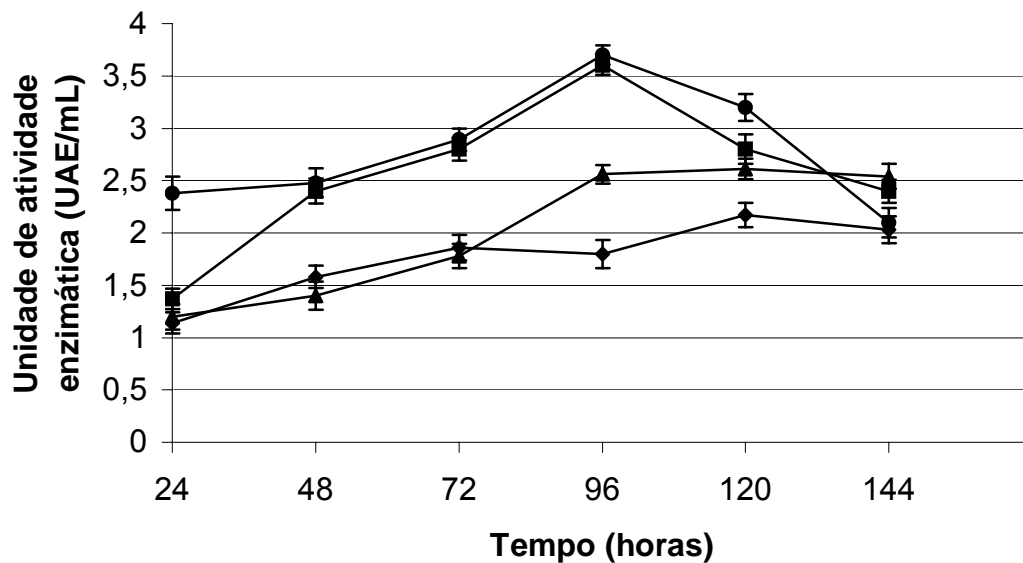


FIGURA 7. Atividade de CMCCase produzida pelo isolado 107e, crescido em meio (Tuncer et al., 1999) suplementado com 0,5% de CMC (■), celulose microcristalina (◆), palha de aveia (▲) e palha de milho (●) à temperatura de 30 °C durante 144 horas. Cada ponto representa a média de pelo menos quatro ensaios.

Nos experimentos realizados à temperatura de 35 °C (Figura 8) a atividade de celulasas foi significativamente maior com o substrato palha de milho. A máxima atividade, 7,75 UAE/mL, foi atingida após 96 h. A alta atividade celulolítica também foi observada com CMC (6,17 UAE/mL). Nos substratos de palha de aveia e celulose microcristalina a atividade de celulasas foi inferior se comparada aos outros dois substratos; com palha de aveia a atividade máxima foi de 4,5 UAE/mL e 3,1 UAE/mL com celulose microcristalina, após 120 horas de crescimento.

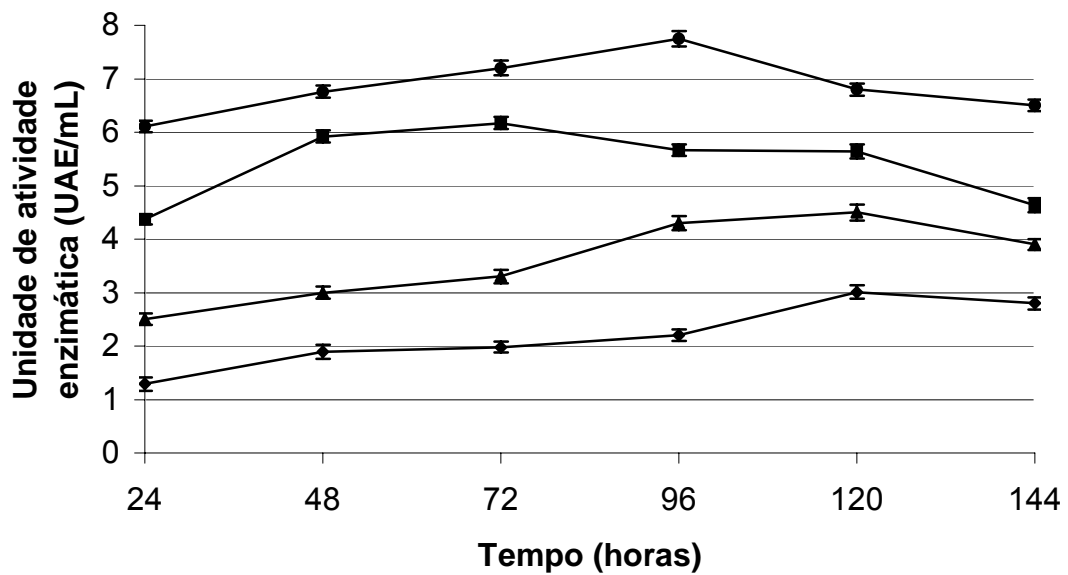


FIGURA 8. Atividade de CMCCase produzida pelo isolado 107e, crescido em meio (Tuncer et al., 1999) suplementado com 0.5% de CMC (■), celulose microcristalina (◆), palha de aveia (▲) e palha de milho (●) à temperatura de 35 °C durante 144 horas. Cada ponto representa a média de pelo menos quatro ensaios enzimáticos.

A palha de milho e a CMC, nos ensaios a 40 °C, foram os substratos que induziram maior produção de celulasas, 5,3 e 4,99 UAEmL respectivamente (Figura 9). Da mesma maneira que nos experimentos a 30 e 35 °C, a indução de celulasas por aveia e celulose microcristalina atingiu valores mais baixos. Comparando-se esses dois substratos a aveia induziu mais atividade, variando a produção de 2,63 a 3,18 UAE/mL. Na temperatura de 40 °C, a celulose microcristalina induziu os seus mais baixos valores (0,8-2,78 UAE/mL) de atividade de celulasas.

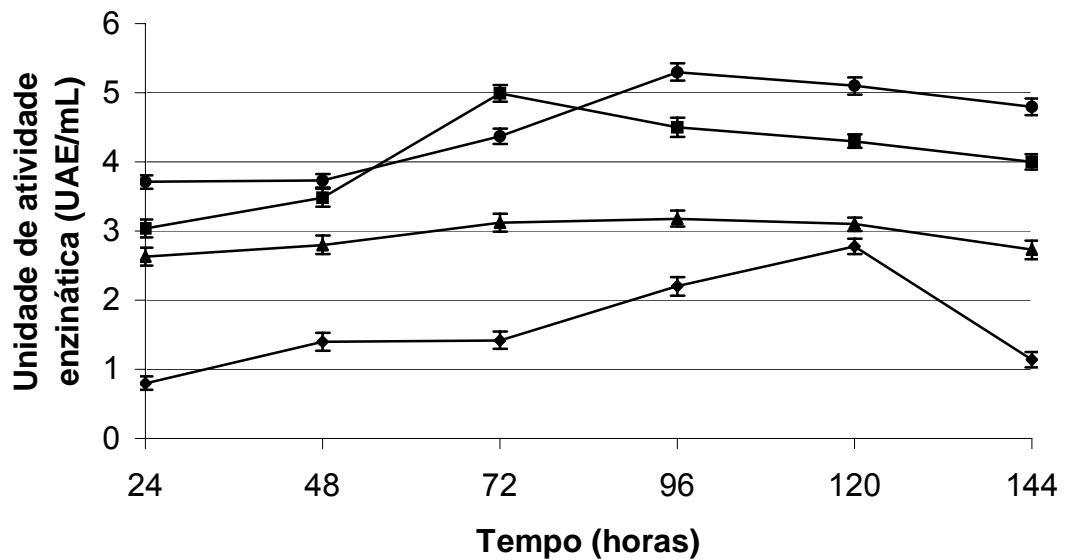


FIGURA 9. Atividade de CMCCase produzida pelo isolado 107e, crescido em meio (Tuncer et al., 1999) suplementado com 0,5% de CMC (■), celulose microcristalina (◆), palha de aveia e (▲) palha de milho (●) à temperatura de 40 °C durante 144 horas. Cada ponto representa a média de pelo menos quatro ensaios enzimáticos.

Avaliando-se as diferentes temperaturas para a produção das celulasas, a temperatura de 35 °C foi a que melhor induziu a síntese destas enzimas nos diferentes substratos testados. Máxima produção de celulasas por *Streptomyces* tem sido atingidas a 37 °C (Malek et al., 1988), 35 °C (Tuncer et al., 2004) e 30 °C (Ishaque & Kluepfel, 1980), diferentemente de actinomicetos termofílicos que exibem ótima produção quando crescidos a 50 °C (George et al., 2001).

Dos quatro substratos testados, a palha de milho mostrou ser o melhor indutor para a síntese de celulasas. Embora, a 30 °C a máxima atividade tenha sido com CMC (3,9 UAE/mL), seguida de palha de milho (3,6 UAE/mL), esta diferença não é significativa. O substrato CMC também induziu alta atividade nos experimentos realizados nas diferentes temperaturas, sendo este o segundo melhor substrato para a síntese de celulasas por *Streptomyces*

Grupo C, amostra 107e. Já os substratos palha de aveia e a celulose microcristalina foram os substratos que induziram baixa atividade celulolítica, sendo este último o pior indutor. A maior atividade celulolítica foi atingida a partir de 72 horas de crescimento, com os maiores picos em 96 horas de cultivo; estes dados estão em conformidade com os resultados obtidos por outros autores (Crawford & McCoy, 1972; Ishaque & Kluepfel, 1980; Tuncer et al., 1999).

A produção de celulases por *Streptomyces*, crescido a 45 °C com 1% de CMC, variou de 1,01 a 2,49 UAE/mL no trabalho realizado por Ramirez & Cocha (2003). Estes resultados são inferiores aos obtidos no presente estudo, onde a produção com este mesmo substrato, mas com 0,5%, variou de 1,37 UAE/mL (30 °C) a 6,17 UAE/mL (35 °C). George et al. (2001) reportaram a produção de endoglicanases de um actinomiceto termofílico sobre diferentes substratos. A máxima atividade (12,5 UAE/mL) foi obtida igualmente na presença do substrato natural, farelo de milho, após 120 h de crescimento. Malek et al. (1988) avaliaram a produção de celulases por *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Streptomyces* na presença de substratos naturais e comerciais (bagaço de cana, juta, avicel, CMC). Máxima atividade de celulases foi atingida no crescimento com substrato natural, o bagaço de cana. *Streptomyces* atingiu o maior valor (22 UAE/mL) se comparado à produção por *Bacillus* e *Pseudomonas* (20 e 18 UAE/mL). No substrato CMC os valores foram, respectivamente de 20, 14,2 e 17 UAE/mL. Da mesma maneira que os resultados obtidos em nosso trabalho, celulose nativa e CMC induziram maior

atividade, enquanto que a celulose microcristalina induziu os mais baixos valores quando comparado aos demais (Malek et al., 1988).

Avaliando a produção de celulases em duas espécies de *Streptomyces*, *S. flavogriseus* e *S. olivochromogena*, na presença de celulose microcristalina (Avicel), CMC e farelo de trigo, Mackenzie et al. (1987) verificaram que a produção destas enzimas, diferiram entre os dois isolados e entre os substratos testados. Os substratos celulose microcristalina e farelo de trigo foram os melhores indutores de celulases. O sobrenadante das culturas foram concentrados em membrana de 10 kDa e empregados para os ensaios enzimáticos. Os dois isolados obtiveram uma ótima produção de celulases com celulose microcristalina. *S. flavogriseus* atingiu 20,8 UAE/mL enquanto que *S. olivochromogeno* a produção foi de 35,7 UAE/mL, diferentemente dos resultados obtidos neste trabalho, onde este substrato apresentou uma baixa indução de celulases. Na presença de farelo de trigo, atividades relativamente significativas de CMCase foram detectadas, *S. olivochromogeno* (9,8 UAE/mL) e *S. flavogriseus* (4 UAE/mL). Embora muitos trabalhos reportem a produção de celulases na presença de celulose microcristalina por diferentes gêneros de actinomicetos como *Streptomyces*, *Thermomonospora* e *Thermoactinomyces*, esta produção é extremamente dependente da origem deste substrato, do seu grau de cristalinidade e da pureza (Crawford & McCoy, 1972; Hägerdal et al, 1978). A produção de celulases na presença deste substrato mostra-se bastante variável não somente entre diferentes grupos de microrganismos, mas também entre diferentes espécies pertencentes ao mesmo gênero. A degradação deste substrato requer a ação sinérgica de celulases,

especialmente endo e exoglucanases (Bhat & Bhat, 1997; Béguin & Aubert, 1994; Lynd et al., 2002; Haki & Rakshit, 2003). A baixa atividade de celulases na presença de celulose microcristalina poderia ser explicada pelo seu alto grau de cristalinidade, próximo a 100%, e sua forma altamente organizada, o que dificultaria o acesso da enzima ao seu sítio catalítico (Rabinovich et al., 2002a). A baixa produção de exoglicanases poderia estar interferindo na produção de endoglicanases, uma vez que estas enzimas atuam primeiramente nas regiões mais cristalinas do polímero de celulose, o que garantiria o acesso de endoglicanases para a hidrólise do substrato. Em nosso trabalho embora não tenhamos avaliado a atividade específica de exoglicanases, outros pesquisadores têm reportado a baixa indução destas celulases por *Streptomyces* (Maleck et al., 1988; Ramirez & Cocha, 2003).

4.6 Determinação do pH e da massa celular do cultivo de *Streptomyces* do Grupo C 107e

O isolado de *Streptomyces* do Grupo C, amostra 107e foi inoculado em meio de cultura (Tuncer et al., 1999) com pH neutro e crescido sob agitação de 150 r.p.m. Após 24 h de crescimento o pH tornou-se alcalino, atingindo valores de 8,3 para os ensaios com palha de aveia e celulose microcristalina, 8,6 com CMC e 8,9 com palha de milho. Após 72 h de crescimento, o pH das amostras atingiu 9, permanecendo assim até o final do processo.

Os valores da biomassa celular com diferentes substratos acompanhou a produção de celulases, sendo os maiores valores atingidos nas horas de máxima atividade celulolítica, entre 72 – 120 h, nas diferentes temperaturas testadas (Tabela 4).

Comparando-se os valores de massa celular obtidos a partir do crescimento com CMC, é possível verificar que na temperatura de 35 °C, o isolado 107e obteve maior crescimento, 0,69 mg/mL as 96 h, quando comparado ao crescimento nas temperaturas de 30 e 40 °C, 0,39 e 0,53 mg/mL, respectivamente. Nos ensaios realizados com celulose microcristalina, o isolado teve menor crescimento, atingindo máximo valor de massa celular, 0,28 mg/mL as 120 h, à temperatura de 35 °C. Este crescimento baixo que levou a pouca atividade de celulasas (0,8 – 3,01 UAE/mL). Com palha de aveia o máximo crescimento foi observado também à temperatura de 35 °C (0,43 mg/mL as 120 h). Avaliando o crescimento nos diferentes substratos, a palha de milho foi o substrato que proporcionou um maior crescimento do isolado com 0,73mg/mL as 96 h e conseqüentemente uma maior atividade de celulasas (7,75 UAE/mL).

Tabela 4

4.7 Propriedades das celulases produzidas pelo isolado *Streptomyces* do Grupo C 107e

4.7.1 Efeito da temperatura sobre a atividade de hidrólise e termorresistência das celulases no extrato bruto

Na Figura 10 é possível verificar a termorresistência das celulases no extrato bruto. As temperaturas utilizadas para os ensaios variaram de 30 - 70 °C. As celulases, num período de 30 minutos de incubação, mantiveram cerca de 90 a 100% de atividade residual nas temperaturas entre 30-50 °C. Na temperatura de 60 °C, as celulases permaneceram com 28,1% da atividade residual e quando incubadas a 70 °C por 30 minutos, a atividade residual foi somente de 15,9%.

Quanto à influência da temperatura na atividade de hidrólise da CMC, as celulases produzidas pelo isolado obtiveram ótima atividade (máxima produção de celulases) à temperatura de 50 °C. Nas temperaturas de 30 e 40 °C a atividade de hidrólise foi de 86,1 e 89,2%, respectivamente. No entanto, com o aumento da temperatura para 60 °C e 70 °C, as celulases perderam 44,5% e 78,5% de atividade hidrolítica, respectivamente.

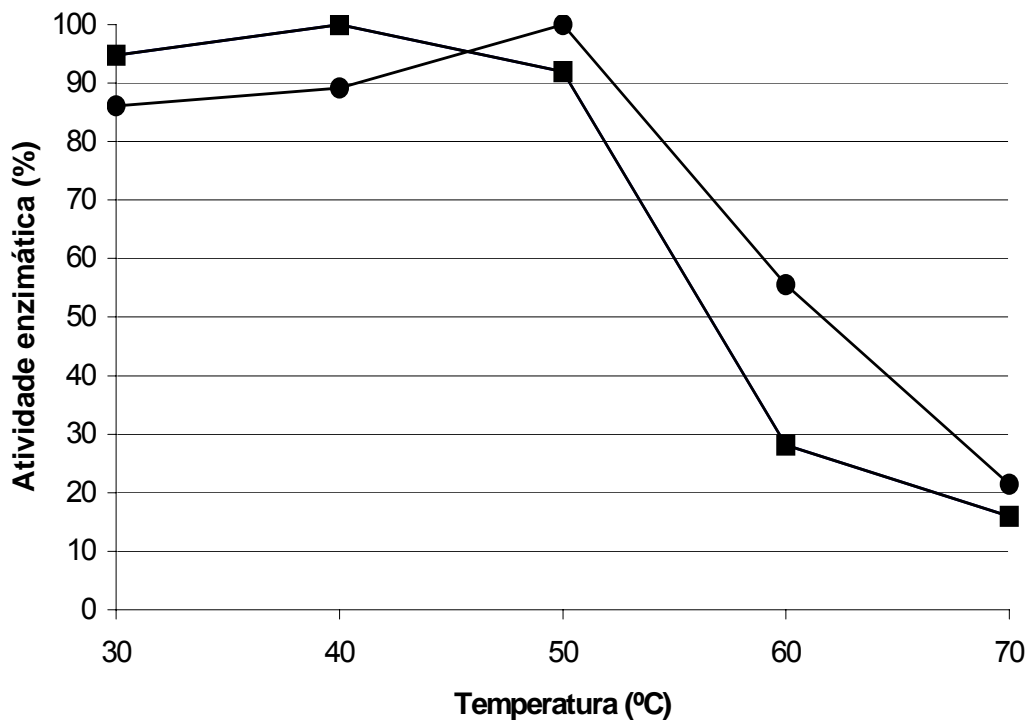


FIGURA 10. Efeito da temperatura sobre a estabilidade da enzima (■) e sob a atividade de hidrólise (●). A atividade de endoglucanase foi determinada com 0,5 % de CMC nas temperaturas indicadas. A estabilidade foi determinada incubando-se a enzima em diferentes temperaturas por 30 minutos, seguida do ensaio enzimático. A atividade residual foi expressa como percentual.

Diversos trabalhos têm reportado máxima atividade de celulasas à temperatura de 50 °C. A máxima atividade de celulasas por *Streptomyces* sp., isolado por Ishaque e Kluepfel (1980) foi atingida na temperatura de 50 °C, onde o aumento da atividade celulítica acompanhou o aumento da temperatura. Na temperatura de 55 °C a enzima perdeu 35 % da sua atividade e a 60 °C a perda foi de 60%. *Streptomyces* sp. LX também apresentou temperatura ótima de 50 °C para a hidrólise do substrato, sendo que a 60 °C a atividade foi de 78 %. A estabilidade térmica foi mantida entre 40-60 °C, com 100 % de atividade residual, e a 70 °C somente 20 % (Li & Gal, 1998).

Igualmente, a temperatura de 50 °C tem sido reportada como sendo ótima para as celulases produzidas por um actinomiceto alcalotermofílico, mantendo 50 % de atividade entre 40 – 60 °C (George et al., 2001). Outras espécies de (*Streptomyces*, *S. halstedii*, *S. thermodiastaticus* e *S. reticuli*) têm apresentado uma ótima atividade de celulases à temperatura de 55 °C, resultados esses similares ao encontrado neste trabalho (Crawford & McCoy, 1972; Schrempf & Walter, 1995; Garda et al., 1997). Actinomicetos termofílicos, como *Thermomonospora curvata* e *T. fusca*, têm exibido uma ótima atividade em temperaturas entre 50 e 65 °C. Em *T. curvata*, estas enzimas têm apresentado uma estabilidade nas temperaturas entre 45 °C e 60 °C, sendo que em temperaturas acima de 75 °C, as celulases perdem cerca de 33% de sua atividade. Temperaturas superiores a 50 – 55 °C, provavelmente modifiquem a estrutura tridimensional das proteínas acarretando, assim, a perda da atividade hidrolítica (Stutzenberger, 1971; Crawford & McCoy, 1972).

4.7.2 Efeito do pH na atividade de e na estabilidade das celulases

Nos ensaios realizados para determinação do efeito do pH na atividade de hidrólise, as celulases produzidas pelo isolado de *Streptomyces* apresentaram máxima atividade em pH 9,0. Maior atividade celulolítica foi mantida em pH alcalino. Cerca de 85% da atividade foi mantida entre pH de 8,0 – 10,0. Em pH neutro (7,0) as celulases mantiveram 74% de atividade de hidrólise. Na faixa de pH ácido (6,0 e 5,0) as celulases perderam cerca de 30 e 35% de atividade, conforme pode ser observado na Figura 11.

Para avaliar a estabilidade da enzima nas diferentes faixas de pH, tubos com 2 mL da amostra bruta, com o pH ajustado (5,0 – 10,0), foram incubadas em banho de água a 30 °C, durante 30 minutos e posteriormente foi determinada a atividade de celulases com o ensaio enzimático. Nos ensaios realizados, as enzimas demonstraram manter grande parte da sua atividade, 75 -100%, nos valores de pH entre 7,0 e 10,0. Em pH ácido (6,0 e 5,0) a atividade das celulases decaiu cerca de 28, 32% respectivamente. Os resultados encontrados neste trabalho diferem dos resultados encontrados por outros trabalhos onde as celulases produzidas por isolados de *Streptomyces* tem apresentado máxima atividade de hidrólise enzimática em pH 7,0 (Ishaque & Kluepfel, 1980; Schrempf & Walter, 1995). Valores abaixo de pH 6,0 e acima de 7,0 demonstraram uma grande perda na atividade de hidrólise. Celulases produzidas por outros isolados de *Streptomyces* (Li et al. 1998) têm máxima atividade de celulases em pH de 4,5 e 6,0, apresentando estabilidade numa faixa de pH de 3,0 a 7,0. Resultados similares foram reportados por Garda et al., (1997), onde *S. halstedii* apresentou máxima atividade de celulases em pH 6,0. Celulases produzidas por outros gêneros de actinomicetos, *Thermomonospora* sp., apresentaram pH de 5,0 como seu ótimo e uma tolerância em ampla faixa de pH (4,0-10,0) onde a enzima permanece com 80% da atividade (George et al., 2001). Da mesma maneira, as celulases produzidas por duas linhagens de *Bacillus* sp. apresentaram uma ótima atividade nesta mesma faixa de pH, demonstrando estabilidade numa faixa de pH entre 6,0 – 10,0 (Mawadza et al., 2000).

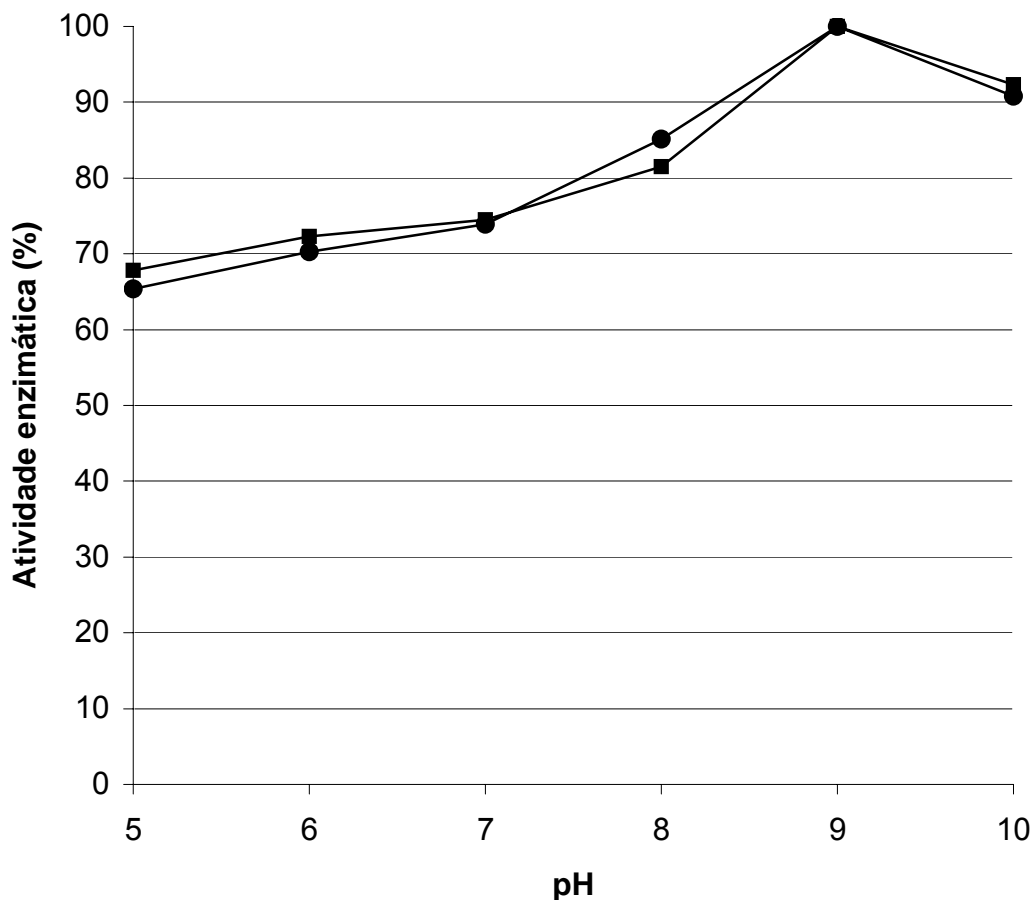


FIGURA 11. Efeito do pH sob a estabilidade da enzima (■) e na atividade de hidrólise (●). A atividade de endoglucanase foi determinada com 0,5% CMC nos valores de pH indicados. A estabilidade foi medida incubando-se a enzima em diferentes faixas de pH, seguido de ensaio enzimático. A atividade residual foi expressa como percentual.

De acordo com os dados obtidos em nosso trabalho verifica-se que as celulasas produzidas pelo isolado 107e toleram uma variação no pH (60 – 10,0) e são mais estáveis em pH alcalino. O pH ótimo de actinomicetos difere do ótimo para atividade das celulasas de fungos onde estes valores encontram-se numa faixa mais ácida entre 4,5 e 5,2 (Stutzenberger, 1971).

4.8 Atividade hidrolítica em diferentes concentrações de CMC

Para avaliar a atividade de celulases no extrato bruto e na amostra concentrada, foram realizados novos ensaios enzimáticos empregando as concentrações de 0,5, 1 e 2% de CMC e os tempos de reação de 15, 30 e 60 minutos à temperatura de 30 °C. Os resultados obtidos com o extrato bruto e com as celulases concentradas pode ser observado na Tabela 5. A partir dos resultados, verifica-se que nos ensaios com amostra concentrada foram atingidos os maiores valores de atividade de CMCase, o que já era esperado. Avaliando atividade de celulases no extrato bruto, verifica-se que o aumento das concentrações do substrato não provocou um aumento na atividade de celulase, onde a máxima atividade foi de 11,39 UAE/mL com 1% de CMC depois de 15 minutos de reação. Diferentemente ocorreu nos ensaios com a enzima concentrada, onde o aumento da concentração do substrato levou a um aumento da atividade das celulases, sendo a máxima atividade atingida com 2 % de CMC (53,83 UI/mL). Avaliando-se a atividade nos diferentes tempos de reação, os primeiros 15 minutos de reação foi o pico de atividade das celulases, o que demonstra que a partir deste intervalo de tempo, o substrato torna-se escasso para os ensaios com a enzima concentrada. A partir dos resultados, verifica-se que a concentração de 0.5% de CMC para os ensaios, com amostra bruta, foi suficiente para quantificar a atividade de celulases, pois a atividade manteve-se praticamente constante nas diferentes concentrações empregadas (7,14, 7,3 e 7,29 UAE/mL). Para a determinação da atividade de celulases no extrato concentrado é possível verificar que a concentração de 0,5 % mostrou-se insuficiente; dobrando-se esta concentração, observou-se um

aumento de 34%, e utilizando-se uma concentração de substrato de 2% a atividade aumentou em 39,6%. Comparando-se os valores de atividade enzimática no extrato bruto e no extrato concentrado com 2% de CMC, verifica-se que o processo de concentração da enzima aumentou em 3,9 vezes a atividade das celulasas produzidas por *Streptomyces*.

TABELA 5. Atividade hidrolítica sobre CMC do extrato bruto e do extrato concentrado em diferentes concentrações do substrato.

Concentração de CMC	Tempo de incubação	Extrato Bruto (UAE/mL)	Extrato concentrado (UAE/mL)
0,5%	15 min.	11,22	39,6
	30 min.	7,14	22,43
	60 min.	4,73	12,31
1%	15 min.	11,39	53,15
	30 min.	7,36	28,3
	60 min.	4,65	16,48
2%	15 min.	11,25	55,3
	30 min.	7,29	29,1
	60 min.	4,41	16,0

4.9 Avaliação da estabilidade térmica das celulasas

Para avaliar a estabilidade térmica das celulasas produzidas, empregaram-se as temperaturas de 40 e 50 °C. À temperatura de 40 °C as celulasas mantiveram 100% de atividade mesmo variando o tempo de incubação até duas horas. Após quatro horas de incubação, 86% de atividade foi mantida e em 5 horas, a atividade decaiu para 75,6%. A estabilidade térmica das celulasas no extrato concentrado, à temperatura de 40 °C, não diferiu da estabilidade apresentada pelas celulasas no extrato bruto. As celulasas do extrato concentrado permaneceram com 86% de atividade após 3 horas de

incubação, sendo que em 4 horas e 5 horas a atividade de celulases foi de 80 e 72%, respectivamente (Figura 12).

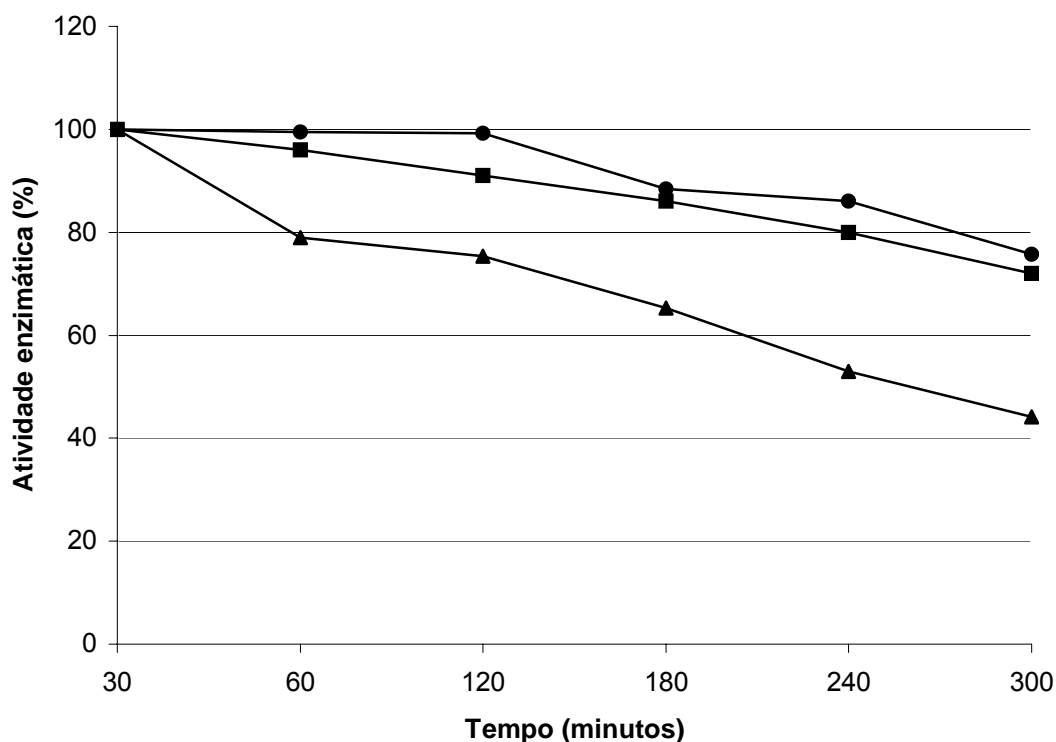


FIGURA 12. Atividade residual das celulases no extrato bruto (●) e no extrato concentrado (■) a temperatura de 40 °C e 50°C (▲) durante 5 horas de incubação.

Nos ensaios à temperatura de 50 °C, as celulases apresentaram menor estabilidade térmica. As celulases no extrato bruto, após uma hora de incubação, apresentaram 79 % de atividade residual e cerca de 50% da atividade foi perdida após 5 horas de incubação (Figura 12).

4.10 Determinação da massa molecular

Para se determinar a massa molecular das celulases produzidas pela amostra selecionada, foi realizada SDS-PAGE com o extrato bruto e o extrato concentrado. Na figura 13 é possível observar que pelo menos duas

celulases (A e B) foram produzidas pelo isolado de *Streptomyces* Grupo C, 107e. A massa molecular das celulases é de aproximadamente 20 e 32 kDa. Na figura 14 é possível verificar a atividade das celulases no gel com 0,2% de CMC. Tanto no extrato bruto como no extrato concentrado podem ser observadas duas zonas de hidrólise.

Massa molecular de celulases purificadas produzidas por *Streptomyces* LX foi de 48 kDa com uma única banda segundo Li et al. (1998). Endoglicanases de massa molecular de 23 kDa e 38 kDa foram reportadas por Geroge et al. (2001). Celulases, avicelases, de *S. reticuli*, têm sido reportadas com peso de 42 kDa (Schrempf & Walter, 1995). *S. rochei* produz celulases com 29 e 43 kDa (Perito et al., 1994) *S. lividans* tem massa molecular de 36 kDa (Wittmann, 1994). *S. hastedii* produz pelo menos três celulases, sendo uma celobiohidrolase de massa de 28 KDa (Garda et al, 1997). *Thermomonospora fusca* produz 6 celulases, 3 endo, 2 exo e 1 com atividade de endo/exo (Spiridonov & Wilson, 1999).

As celulases produzidas por outras bactérias, como as espécies pertencentes ao gênero *Bacillus*, possuem massa molecular de 40 kDa (Mawadza et al., 2000). *Fibrobacter succinogenes* produz endoglicanases e celobiohidrolases com peso molecular de 65 kDa e 58 kDa, respectivamente (Beta & Broussole, 2000).

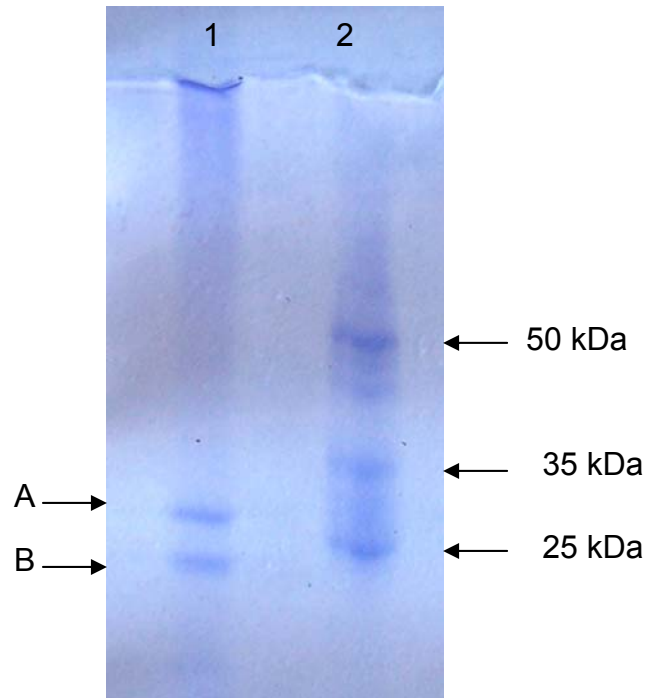


FIGURA 13. Massa molecular das celulasas produzidas por *Streptomyces* do Grupo C, 107e, em SDS/PAGE (12%). Canaleta (1) Celulasas no extrato concentrado, (2) Marcador molecular Promega V849A. Gel corado com azul de Comassie.

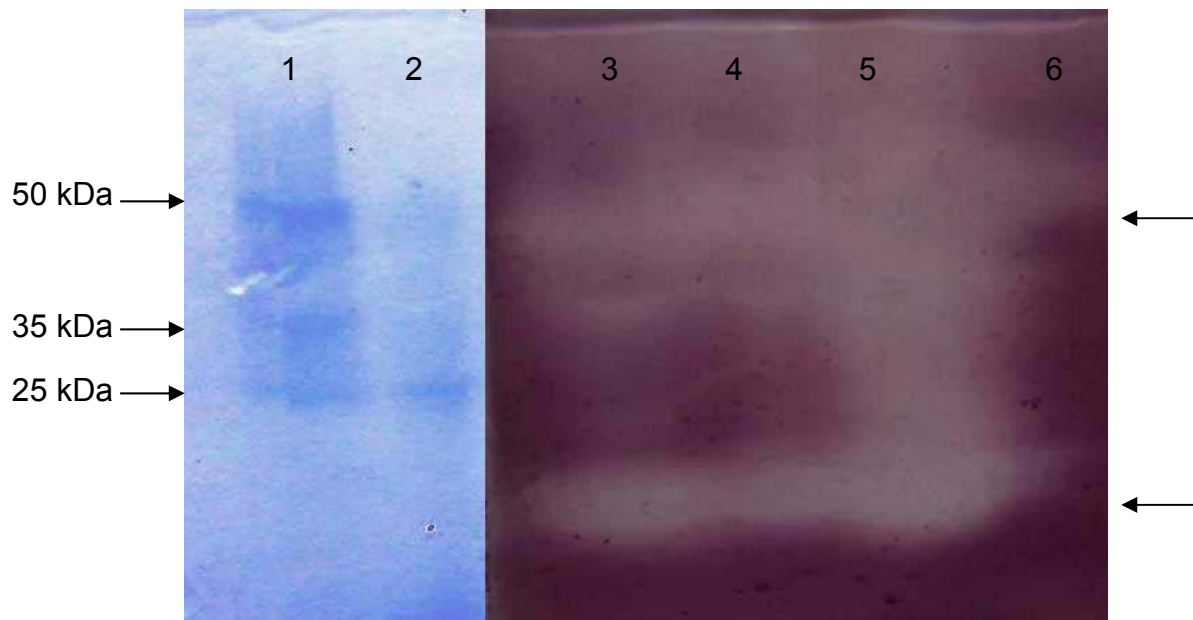


FIGURA 14. Atividade de celulases produzidas por *Streptomyces* do Grupo C, 107e, em SDS/PAGE (12%) com 0,2% de CMC. Canaleta (1) Marcador molecular Promega V849A, (2) Marcador sigma MW/SDS/200, (3) Extrato bruto 20 μ L, (4) Extrato bruto 30 μ L, (5) Extrato concentrado, 20 μ L e (6) Marcador molecular Promega. Canaletas 1 e 2 coradas com azul de Comassie, canaletas 3, 4 e 5 corada com vermelho congo.

5. CONCLUSÕES

1. Todos os 30 isolados de actinomicetos são pertencentes ao gênero *Streptomyces* e apresentaram atividade de celulases com CMC;
2. O emprego de provas bioquímicas e da técnica de PCR permitiram a confirmação do gênero dos isolados com maior atividade celulolítica;
3. O isolado 107e apresentou maior atividade de celulases em culturas submersas com 0,5% de carboximetilcelulose;
4. Máxima produção de celulases foi atingida quando empregado o substrato palha de milho e a temperatura de 35 °C para o crescimento do isolado de *Streptomyces* do Grupo C, 107e.
5. A temperatura ótima das celulases foi atingida à temperatura de 50 °C.
7. As enzimas apresentaram estabilidade térmica a 40 °C;
8. O pH ótimo para a hidrólise do substrato pelas celulases produzidas foi de 9,0;
9. As celulases produzidas pela amostra selecionada têm massa molecular de aproximadamente 20 e 32 kDa.

6. PERSPECTIVAS

1. Realizar a amplificação de fragmentos da região 16S do rDNA, empregando os oligonucleotídeos StreptB, StreptF e StreptE para os 23 isolados de *Streptomyces*;
2. Ampliar o número de isolados testados para avaliar a especificidade dos oligonucleotídeos para *Streptomyces*;
3. Proceder à purificação das celulases produzidas por *Streptomyces*, com palha de milho a 35 °C;
4. Avaliar o efeito do pH e da temperatura sobre a atividade e estabilidade da enzima concentrada;
5. Determinar o ponto isoelétrico das celulases;
6. Estudar a ação das celulases com diferentes tipos de resíduos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BÉGUIN, P.; AUBERT, J. P. The biological degradation of cellulose. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, Netherlands, v. 13, p. 25 - 58, 1994.

BÉLAÏCH, J. P. et al. The cellulolytic system of *Clostridium cellulolyticum*. **Journal of Biotechnology**, Japan, v. 57, p. 3 -14, 1997.

BÉRA - MALLET, C. et al. Characterisation of endoglucanases EGB and EGC from *Fibrobacter succinogenes*. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, Netherlands, v. 1476, p. 191 - 202, 2000.

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

BIOSSET, C. et al. Digestion of crystalline cellulose substrates by the *Clostridium thermocellum* cellulossomo: structural and morphological aspects. **Biochemical of Journal**, Hoboken, v. 340, p. 829 - 35, 1999.

BISARIA, V. S.; GHOSE, T. K. Biodegradation of cellulosic materials: substrates, microorganisms, enzymes and products. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 3, p. 90 - 104, 1981.

CAO, Y; TAN, H. Effects of cellulase on the modification of cellulose. **Carbohydrate Research**, Oxford, v. 337, p. 1291-6, 2002.

COUGHLAN, M. P. Enzymic hydrolysis of cellulose: an overview. **Bioresource Technology**, Amsterdam, Netherlands, v. 39, p. 107 - 15, 1992.

CRAWFORD, D. L.; MCCOY, E. Cellulases of *Thermomonospora fusca* and *Streptomyces thermodiastaticus*. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, p. 150 - 2, 1972.

EMBLEY, T. M.; STACKEBRANDT, E. The molecular phylogeny and systematics of the actinomycetes. **Annual Review Microbiology**, Canada, v. 48, p. 257 - 89, 1994.

EMTIAZI, G.; NAGHAVI, N.; BORDBAR, A. Biodegradation of lignocellulosic waste by *Aspergillus terreus*. **Biodegradation**, Amsterdam, Netherlands v. 12, p. 259 - 63, 2001.

GAL, L. et al. Characterization of the cellulolytic complex (cellulosome) produced by *Clostridium cellulolyticum*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, p. 903 - 9, 1997.

GALLAGHER, J. et al. Production of cellulase and β -glucosidase activity during growth of the actinomycete *Micromonospora chalcae* on cellulose-containing media. **Biotechnology Letters**, Amsterdam, Netherlands, v. 18, p. 537-40, 1996.

GAMA, F. M.; MOTA, M. Cellulases for oligosaccharide synthesis a preliminary study. **Carbohydrate Research**, Oxford, v. 37, p. 279 - 81, 1998.

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

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

GILKES, N. R. et al. Domains in microbial α -1,4 glycanases: sequence conservation, function, and enzyme families. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 55, n. 2, p. 303 - 15, 1991.

GOYAL, A. K.; EVELEIGH, D. E. Cloning, sequencing and analysis of the ggh-A gene encoding 1,4- β -D glucan glucanhydrolase from *Microbispora bispora*. **Gene**, Amsterdam, Netherlands, v. 172, p. 93 - 8, 1996.

HÄGERDAL, B. G. R.; FERCHAK, J. D.; PYE, E. K. Cellulolytic enzyme system of *Thermoactinomyces* sp. Sp. Grown on microcrystalline cellulose. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, p. 606 - 12, 1978.

HAKI, G. D.; Rakshit, S. K. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. **Bioresource Technology**, Amsterdam, Netherlands, v. 89, p. 17 – 34, 2003.

HEUER, H. et al. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, p. 3233 – 41, 1997.

HOLT, J. G.; WILLIAMS, S. T.; SHARPE, M. E. **Bergey'S Manual of Sistematic Bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1989. v. 4, p. 2300 – 2648.

HOLT, J.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P. H. A. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology** 9 ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. 787 p.

HOWARD R. L. et al. Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion & enzyme production. **African Journal of Biotechnology**, Toronto, v. 2, p. 602 - 19, 2003.

HUDDLESTON, A. S.; CRESSWELL, N.; NEVES, M. C. P. Molecular detection of streptomycin producing *Streptomyces* in Brazilian soils. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, p. 1288 - 97, 1997.

IGUAL, J.M. et al. Cellulase isoenzymes profile in *Frankia* strains belonging to different cross-inoculation groups. **Plant and Soil**, Dordrecht, Netherlands, v. 229, p. 35 - 9, 2001.

ISHAQUE, M.; KLUEPFEL, D. Cellulase complex of a mesophilic *Streptomyces* strain. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, Canada, v. 26, p. 183 - 9, 1980.

JACOBUS, P. H.; WYK, Y. Cellulase adsorption-desorption and cellulose saccharification during enzymatic hydrolysis of cellulose materials. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, Netherlands, v. 19, n. 8, p. 775 - 8, 1997.

KARLSSON, J. et al. Enzymatic properties of the low molecular mass endoglucanases Cel12A (EG III) and Cel45A (EG V) of *Trichoderma reesei*. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, Netherlands, v. 99, p. 63 - 78, 2002.

KATAOKA, M. et al. Application of the variable region in 16S rDNA to create an index for rapid species identification in the genus *Streptomyces*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, Netherlands, v. 151, p. 249 - 55, 1997.

KENNEDY, A.C. Bacterial diversity in agroecosystems. **Agriculture Ecosystems and Environmental**, Amsterdam, Netherlands, v. 74, 65 - 76, 1999.

KLYOSOV, A. A. Trends in biochemistry and enzymology of cellulose degradation. **Journal of Biochemistry**, Tokio, Japan, v. 29, n. 47, p. 10577 - 85, 1990.

LACEY, J. – Actinomycetes in composts. **Annals Agriculture Environmental and Medical**, Tokio, Japan, v. 4, 113 -121, 1997.

LAO, G, GHANGAS, G. S.; WILSON D. B. DNA sequence of tree β -1,4-endoglucanase genes from *Thermomonospora fusca*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 173, 3397 - 407, 1991.

LECHEVALIER, H.A.; LECHEVALIER, M.D. Biology of actinomycetes. **Annals Institute Pauster**, Paris, v.108, p. 662 - 73,1965.

LEE, I. et al. Substrate-enzyme interactions in cellulase systems. **Bioresource Technology**, Amsterdam, Netherlands, v. 58, p. 163 - 9, 1993.

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

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

LYND, L. R. et al. Microbial cellulases utilization: Fundamentals and Biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 66, n. 3, p. 506 - 77, 2002.

MACKENZIE, C. R. et al. Cellulolytic and xylanolytic enzyme systems in *Streptomyces* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, p. 2835 - 9, 1987.

MALEK, M. A. et al. Bacterial cellulases and saccharification of lignocellulosic materials. **Enzyme of Microbial Technology**, New York, v. 10, p. 750 - 3, 1988.

MANSFIELD, S. D.; MEDER, R. Cellulose hydrolysis – the role of monocomponent cellulases in crystalline cellulose degradation. **Cellulose**, Dordrecht, Netherlands, v. 10, p. 159 – 69, 2000.

MARTIN, P. et al. Identification and typing *Streptomyces* strains evaluation of interspecific, intraspecific and intracolonial differences by RAPD fingerprinting. **Research Microbiology**, Tokio, Japan, v. 151, p. 853 - 64, 2000.

MASTROMEI, G. et al. Cloning and expression in *Escherichia coli* of a *Streptomyces* β -glucosidase gene. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, Netherlands, v.24, p. 149 – 57, 1992.

MAWADZA, C. et al. Purification and characterization of cellulases produced by two *Bacillus* strains. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, Netherlands, v. 83, p. 177 - 87, 2000.

MCCARTHY, A. J.; WILLIAMS, S. T. Actinomycetes as agents of biodegradation in the environment – a review. **Gene**, Amsterdam, Netherlands, v. 115, p. 189 - 92, 1992.

MEHLING, A.; WEHMEIER, V.F.; PIEPERBERG, W. Application of random amplified polymorphic DNA (RAPD) assays in identifying conserved regions of actinomycete genomes. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, Netherlands, v. 128, p. 119 - 26, 1995.

MONCIARDINI, P. et al. New PCR primers for selective amplification of 16S rDNA from different group of actinomycetes. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, Netherlands, v. 142, p. 419 - 29, 2002.

NELSON, N. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. **The Journal of Biological Chemistry**, New York, v. 153, p. 375 - 80, 1944.

OKEKE, B. C. Saccharification of agro-waste materials by fungal cellulases and hemicellulases. **Bioresource Technology**, Amsterdam, Netherlands, v. 51, p. 23 - 7, 1995.

OLIVEIRA, M. F. **Identificação de actinomicetos isolados de processo de compostagem**. 2002. 124 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós – Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.

PÉREZ-PONS, J. A.; REBORDOSA, X.; QUEROL, E. Induction and preliminary characterization of intracellular β -glucosidases from a cellulolytic *Streptomyces* strains. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, Netherlands, v. 128, p. 235 – 39, 1995.

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

PETERES, S. et al. Sucesion of microbial communities during hot composting as detected by PCR-single-strand-conformation polymorphism-based genetic profiles of small-subunit rRNA genes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 3, p. 930 - 6, 2000.

RABINOVICH, M. L.; MELNICK, M. S.; BOLOBOVA, A. V. The structure and mechanisms of action of cellulolytics enzymes. **Biochemistry**, Moscow, v. 65, n. 8, p. 850 - 71, 2002a.

RABINOVICH, M. L.; MELNICK, M. S.; BOLOBOVA, A. V.. Microbial cellulases (Review). **Applied Biochemistry and Microbiology**, Moscow, v. 38, n. 4, p. 304 - 21, 2002b.

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

RINTALA, H. et al. PCR primers targeting the 16S rRNA gene for the specific detection of Streptomyces. **Molecular and Cellular Probes**, London, v. 15, p. 337 - 47, 2001.

ROBERTS, M. A.; CRAWFORD, D. L. Use of randomly amplified polymorphic DNA as a means of developing genus-and strains-specific *Streptomyces* DNA probes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, p. 2555 - 64, 2000.

SAHA, B. C. Production, purification and propertis of endoglucanase from newly isolated strains of *Mucor circinelloides*. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 39, p. 1871 - 6, 2004.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SAMEJIMA, M. et al. Enzymatic hydrolysis of bacterial cellulase. **Carbohydrate Research**, Oxford, United Kingdom, v. 305, p. 281 - 8, 1998.

SESSITSCH, A. et al. Cultivation-independent analysis of bacterial endophytes in tree varieties based on eubacterial and Actinomycetes-specific PCR of 16S rRNA genes. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, Netherlands, v. 39, p. 23 - 32, 2002.

SHAREK, F. et al. Sequences of three specifying xylanase in *Streptomyces lividans*. **Gene**, Amsterdam, Netherlands, v. 107, p. 75 - 82, 2001.

SCHÜLEIN, M. Protein engineering of cellulases. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, Netherlands, v. 1543, p. 239 - 52, 2000.

SCHWARZ, W. H. The cellulosome and cellulose degradation by anaerobic bacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, Germany, v. 56, p. 634 - 49, 2001.

SHIRLING, E. B.; GOTTLIEG, D. Characterization of *Streptomyces* species. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Berks, United kingdom, v. 16, n. 3, p. 313 - 40, 1966.

SHOHAM, Y; LAMED, R.; BAYER, E. A. The cellulosome concept as an efficient microbial strategy for the degradation of insoluble polysaccharides. **Trends in Microbiology**, Cambridge, United Kingdom, v. 7, n. 7, p. 275 - 80, 1999.

SOMOGYI, M. Notes on sugar determination. **The Journal of Biological Chemistry**, New York, v. 195, p. 19 – 23, 1952.

SONG, J. et al. Phylogenetic analysis of *Streptomyces* spp. Isolated from potato scab lesions in Korea on the basis of 16S rRNA gene and 16S-23S rDNA internally transcribed spacer sequences. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Berks, United Kingdom, v. 54, p. 203 - 9, 2004.

SPIRIDONOV, N.A.; WILSON, D.B. Regulation of biosynthesis of individual cellulases in *Thermomonospora fusca*. **Journal of Bacteriology**, Washington, p. 3529 - 32, 1998.

SPIRIDONOV, N.A.; WILSON, D.B. Characterization and cloning of CelR, a transcriptional regulatory of cellulases genes from *Thermomonospora fusca*. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, United States, v. 274, n. 19, p. 13127 - 32, 1999.

SPREY, B.; BOCHEM, H. P. Effect of endoglucanase and cellobiohydrolase from *Trichoderma reesei* on cellulose microfibril structure. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, Netherlands, v. 97, p. 113 - 7, 1992.

STUTZENBERGER, F. J. Cellulase production by *Thermomonospora curvata* isolated from municipal solid waste compost. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 22, n. 2, p. 147 - 52, 1971.

STUTZENBERGER F.; LUPO, D. pH-dependent thermal activation of endo-1,4-glucanase in *Thermomonospora curvata*. **Enzyme of Microbial Technology**, New York, v. 8, p. 205 - 8, 1985.

STUTZENBERGER, G. The *Streptomyces lividans* family 12 endoglucanase. Construction of the catalytic core, expression and X-ray structure at 1,75 Å resolution. **Journal of Biochemistry**, Tokio, Japan, v. 36, p. 16032 - 9, 1997.

SUUTARI, P. et al. Characterisation of *Streptomyces* spp. Isolated from water-damaged buildings. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, Netherlands, v. 39, p. 77 - 84, 1992.

TAIWO, L. B.; OSO, B. A. Influence of composting techniques on microbial succession, temperature and pH in a composting municipal solid waste. **African Journal Biotechnology**, Toronto, v. 3, n. 4, p. 239 - 43, 2004.

TAMBURINI, E.; PERITO, B.; MASTROME, G. Growth phase-dependent expression of an endoglucanase encoding gene (eg IS) in *Streptomyces rochei* A2. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, Netherlands, v. 237, p. 267 - 72, 2004.

TEATHER R. M.; WOOD, P. J. Use of congo red polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 53, p. 41 - 6, 1983.

THOMSON, J. A. Molecular biology of xylan degradation. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, Netherlands, v. 104, p. 65 - 82, 1993.

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

TUNCER, M. et al. Optimization of extracellular endoxylanase, endoglucanase and peroxidase production by *Streptomyces* sp. F2621 isolated in Turkey. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 97, p. 783 - 91, 2004.

TUOMELA, M. et al. Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. **Bioresource Technology**, Amsterdam, Netherlands, v. 72, p. 169 - 83, 2000.

YAZDI, M. T. et al. Cellulase production by *Neurospora crassa*: Purification and characterization of cellulolytic enzymes. **Enzyme of Microbial Technology**, New York, v. 12, p. 120 - 3, 2000.

WACHINGER, G. et al. Identification of mycelium-associated cellulase from *Streptomyces reticuli*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 55, p. 2653 - 7, 1989.

WEIMER, P. J.; FRENCH, A. D.; CALAMARI, A. JR. Differential fermentation of cellulose allomorphs by ruminal cellulolytic bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, p. 3101 - 6, 1991.

WILLIAMS, S. T. et al. Numerical classification of *Streptomyces* and related genera. **Journal of General and Applied Microbiology**, Tokio, Japan, v. 129, p. 1743 – 813, 1983.

WIRTH, S.; ULRICH, A. Cellulose-degrading potentials and phylogenetic classification of carboxymethyl-cellulose decomposing bacteria isolated from soil. **Systematic and Applied Microbiology**, Jane, Germany, v. 25, p. 584-91, 2002.

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

ZIMMERMANN, W. Degradation of lignin by bacteria. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, Netherlands, v. 13, p. 119 - 30, 1990.

8. APÊNDICES

8.1 Meio de cultura para isolamento de actinomicetos

8.1.1 Ágar amido caseína

Amido	10,0g
Caseína	0,3g
K ₂ PO ₄	2,0g
NaCl	2,0g
K ₂ HPO ₄	2,0g
MgSO ₄	0,05g
FeSO ₄	0,01g
Ágar	18,0g
Água	10000 mL

8.2 Meios para identificação de actinomicetos

8.2.1 Meio base para utilização de fontes de carbono

Solução Basal	
NH ₄ SO ₄	2,64g
KH ₂ PO ₄	2,38g
K ₂ HPO ₄	5,65g
MgSO ₄	1,0g
Ágar	18,0g
Água	1000,0mL
Solução I	1,0mL
pH	6.8 – 7

Solução I – Solução de Pridham & Gottlieb/100mL

CuSO ₄	0,64g
FeSO ₄	0,11g
MnCl ₂	0,79mg
ZnSO ₄	0,15g
Água	100,0mL

*controle positivo: adiciona-se 1ml de uma solução glicose 10%

*controle negativo: sem fonte de carbono

8.2.2 Meio base para utilização de fontes de nitrogênio

Glicose	10,0g
MgSO ₄	0,5g
NaCl	0,5g
FeSO ₄	0,01g
K ₂ HPO ₄	1,0g
Ágar	12,0g
Água	100,0mL

*fonte de nitrogênio a ser testada adiciona-se 0,1g

*controle positivo: aspargina ou prolina

*controle negativo: sem fonte de nitrogênio

8.2.3 Ágar amido sais minerais

Amido	10,0g
(NH ₄) ₂ SO ₄	2,0g
CaCO ₃	2,0g
K ₂ HPO ₄	1,0g
NaCl	1,0g
Ágar	20,0g
Água	1000,0mL

8.2.4 Agar glicerol aspargina

Glicerol	10,0g
L-aspargina	1,0g
K ₂ HPO ₄	1,0g
Ágar	20,0g
Água	1000,0mL

8.2.5 Ágar tirosina

Glicerol	15,0g
L-tirosina	0,5g
L-aspargina	1,0g
K ₂ HPO ₄	0,5g
MgSO ₄	0,5g
NaCl	0,5g
FeSO ₄	0,01g
Água	1000,0mL

Soluções Traço	1,0mL
Solução Traço	
FeSO ₄	0,1g
MnCl ₂	0,1g
ZnSO ₄	0,1g
Água	100,0mL

8.3 Meio para avaliação da atividade celulolítica

Extrato de levedura	6g
NH ₃ SO ₄	0,1g
NaCl	0,3 g
MgSO ₄	0,1 g
CaCO ₃	0,02 g
Água	1000 mL
Solução traço	1,0 mL

Solução traço	
FeSO ₄	0,1%
ZnSO₄	0,09%
MnSO₄	0,02 %

8.4 Meio de crescimento e soluções para extração de DNA cromossomal

8.4.1 Caldo infuso de cérebro e coração (BHI)

NaCl	5,0g
Dextrose	2,0g
Na ₂ PO ₄	2,5g
*Infuso de Cérebro e Coração	17,5g
Peptona de Carne	5,0g
Peptona de Caseína	5,0g
*Infuso Cérebro Coração : 12,5g (cérebro de carneiro)+ 5,0g (coração de boi)	

8.4.2 Tampão SET (75mM NaCl, 25mM EDTA, 20mM Tris, pH 7.5)

NaCl 1M	7.5 mL
EDTA 0.5 M	5.0mL
Tris	2.0 mL
Água	85.5 mL

8.4.3 Lisozima (10 mg/mL)

Lisozima	0.01g
Água	1.0mL

8.4.4 SDS (10%)

SDS	10.0g
Água	100,0 mL

8.4.5 Proteinase K (20 mg/mL)

Proteinase K	0.02 g
--------------	--------

Água	1.0 mL
------	--------

8.4.6 Fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (24:24:1)

Fenol	48.0 mL
Clorofórmio	48.0 mL
Álcool isoamílico	2.0 mL

8.4.7 Clorofórmio/álcool isoamílico (24:1)

Clorofórmio	96.0 mL
Álcool isoamílico	4.0 mL

8.4.8 TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8)

Tris	1.0 mL
EDTA	0.2 mL
Água	98.8 mL

8.4.9 TE 1X (10 mM Tris, 25 mM EDTA, pH 8.0)

Tris	1.0 mL
EDTA	5.0 mL
Água	94 mL

8.4.10 Gel de agarose 1%

Agarose	1.0 g
TAE	100 mL
Brometo de etídeo	5 µL

8.4.11 Brometo de etídeo

Brometo de etídeo	0.50 mg
Álcool etílico	1000.0 mL

8.4.12 Desoxinucleotídeos

dATP	5.0 µL
dTTP	5.0 µL
dCTP	5.0 µL
dGTP	5.0 µL

8.4.13 TAE 1X

TAE 50X	20.0 mL
Água	980.0 mL

8.5 Reativos para determinação de açúcares redutores

8.5.1 Reativo de Somogy (A)

8.5.1.1 Reativo A

Na ₂ CO ₃	25 g
Bitartrato de sódio e potássio	25 g
NaHCO ₃	20 g
Na ₂ SO ₄	200 g

Água 1000 mL

8.5.1.2 Reativo B

CuSO₄ 15 g
H₂SO₄ 1 gt
Água 100 mL

8.5.1.3 Reativo de Nelson

Molibdato de amônio 50 g
H₂SO₄ 50 mL
Arseniato de sódio 6 g
Água 950 mL

8.6 Soluções tampões

8.6.1 Solução de Mcllvaine

8.6.1.1 Solução tampão pH 4,0

Na₂HPO₄ (0,2 M) 7,71 mL
Ácido cítrico (0,1 M) 12,29 mL

8.6.1.2 Solução tampão pH 5,0

Na₂HPO₄ (0,2 M) 10,3 mL
Ácido cítrico (0,1 M) 9,7 mL

8.6.1.3 Solução tampão pH 6,0

Na₂HPO₄ (0,2 M) 12,63 mL
Ácido cítrico (0,1 M) 7,37 mL

8.6.1.4 Solução tampão pH 7,0

Na₂HPO₄ (0,2 M) 16,47 mL
Ácido cítrico (0,1 M) 3,53 mL

8.6.1.4 Solução tampão pH 8,0

Na₂HPO₄ (0,2 M) 19,45 mL
Ácido cítrico (0,1 M) 0,55 mL

8.6.2 Solução de Sörensen

8.6.2.1 Solução tampão pH 9,0

Glicocol (0,1 M) 9,0 mL
NaOH (0,1 M) 1,0 mL

8.6.2.1 Solução tampão pH 10,0

Glicocol (0,1 M) 6,0 mL
NaOH (0,1 M) 4,0 mL

8.7 Soluções utilizadas na etapa de caracterização enzimática

8.7.1 Gel poliacrilamida 12% (20mL)

Água	6.6 mL
Solução acrilamida 30%	8.0 mL
Tris 1.5 M (pH 8.8)	5.0 mL
SDS 10%	0.2 mL
TEMED	0.008mL

8.7.2 Solução tampão para amostras

Tris HCl	50mM
SDS	2%
Azul de bromofenol	0.1%
Glicerol	10%

8.7.3 Tampão de corrida Tris/Glicina (5X)

Tris base	15.1 g
Glicina	94g
SDS (10%)	50 mL
Água	900mL

8.7.4 Corante Coomassie

Coomassie blue	0,25 g
Metanol	45 mL
Água	45 mL
Ácido acético glacial	10 mL

8.7.5 Descorante de Coomassie

Metanol	45 mL
Água	45 mL
Ácido acético glacial	10 mL

Solução estoque

Tris 1M

Tris	12.1 g
Água	100.0 mL

EDTA 0.5M

EDTA	18.6 g
Água	100.0 mL

TAE 50 X

Tris	240.0 g
Acido acético glacial	57.1 mL
EDTA 0.5M	100.0 mL
Água para completar	1000,0 mL