

**ALGUMAS PROPRIEDADES DE ENDOGLUCANASES PRODUZIDAS POR  
*STREPTOMYCES* SPP. EM MEIO À BASE DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR**

**SOME PROPERTIES OF ENDOGLUCANASES PRODUCED BY *STREPTOMYCES* SPP.  
IN MEDIUM BASED ON SUGAR CANE BAGASSE**

Joanna Cysneiros Silva; Ester Ribeiro Gouveia  
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE – Recife – Brasil  
estergouveia@gmail.com

**Resumo**

*Neste trabalho, foram avaliadas algumas propriedades de endoglucanases produzidas por duas linhagens de Streptomyces (UFPEDA SC08 e UFPEDA SC21) em meio à base de bagaço de cana-de-açúcar. Foram determinados a temperatura e o pH ótimos de reação, a termoestabilidade e ainda testes de conversão da celulose do bagaço de cana-de-açúcar. As temperaturas avaliadas foram: 30, 40, 50, 60 e 70<sup>o</sup> C, com o pH igual a 4,8. Na temperatura ótima, foi determinado o pH ótimo, variando de 4,0-8,0. Na avaliação da termoestabilidade, os ensaios foram realizados a 60<sup>o</sup> C durante 4 horas. As reações enzimáticas foram realizadas na temperatura e pH ótimos, previamente determinados. Amostras de bagaço pesando aproximadamente 0,1 g e 10 mL das amostras dos cultivos, previamente filtradas, e medindo 0,5 U/ml, foram incubadas à temperatura ambiente e 200 rpm. Após 5 dias, a suspensão foi filtrada e analisada quanto aos teores de celobiose e glicose. A temperatura e o pH ótimos foram 60<sup>o</sup> C e 4,8, respectivamente. A linhagem UFPEDA SC 21 apresentou enzimas mais termoestáveis. Ainda, em futuros experimentos de hidrólise, faz-se necessário a utilização de beta-glicosidase para aumentar a conversão e, conseqüentemente evitar o acúmulo de celobiose e inibição das endoglucanases.*

**Palavras-chave:** endoglucanases; bagaço; *Streptomyces*.

**1. Introdução**

Atualmente, uma alternativa econômica para o bagaço de cana que está sendo desenvolvida pelos laboratórios de pesquisa, consiste na sua utilização como matéria-prima para a produção de bioetanol. A utilização do bagaço de cana para a produção de álcool combustível envolve, basicamente, dois processos: hidrólise, através de rota química ou biológica, dos polissacarídeos contidos neste material lignocelulósico, em açúcares e a fermentação destes em etanol. O grande desafio da produção economicamente viável de bioetanol a partir de uma biomassa lignocelulósica consiste em determinar a melhor opção de disponibilizar a glicose a partir da hidrólise da celulose,

em termos de custo global, rendimento glicosídico e fermentabilidade do hidrolisado. Comparativamente às rotas químicas, a rota enzimática apresenta-se como uma alternativa mais adequada à produção de etanol a partir do bagaço, do ponto de vista técnico, em virtude da maior possibilidade em se obter rendimentos glicosídicos elevados, ao mesmo tempo em que hidrolisados com reduzida toxicidade aos microrganismos da fermentação são obtidos. (Finguerut *et al.*, 2006).

Três principais enzimas estão envolvidas na degradação da celulose para glicose: endoglucanase (endo-1,4- $\beta$ -D-glucanase, EC 3.2.1.4), celobiohidrolase (exo-1,4- $\beta$ -D-glucanase, EC 3.2.1.91) e  $\beta$ -glicosidase (1,4- $\beta$ -D-glicosidase, EC 3.2.1.21). A endoglucanase age de forma aleatória, clivando ligações beta, dentro da molécula da celulose; a celobiohidrolase remove as unidades de celobiose a partir das extremidades da cadeia da celulose e  $\beta$ -glicosidase quebra celobiose em duas unidades de glicose (Lee *et al.*, 2002).

A habilidade em decompor a biomassa celulósica em glicose, a qual poderá ser convertida em produtos de valor agregado e energia, tem tornado as celulases um dos sistemas enzimáticos multicomponentes mais investigados. Entretanto, biomassas lignocelulósicas contêm, além de 75-80% de polissacarídeos (celulose e hemicelulose), 20-25% de lignina e, por isso, não podem ser facilmente convertidos em simples açúcares monoméricos, devido à natureza recalcitrante dessas moléculas. Para tornar a celulose disponível ao ataque das celulases, pré-tratamentos físicos e químicos são geralmente utilizados. Algumas opções de pré-tratamento são: pré-tratamento com ácido, com álcali, com vapor, com solventes orgânicos e com água quente (Adsul *et al.*, 2005).

O alto custo das celulases no processo também dificulta a aplicação dessas enzimas para a produção de bioetanol. O uso de biomassa celulósica de baixo custo na produção de celulases reduziria significativamente o custo, fornecendo atividades celulolíticas comparáveis àquelas obtidas na presença de outras fontes de carbono (Adsul *et al.*, 2004). Neste aspecto, o Brasil conta com grandes vantagens para a produção de celulases, devido à disponibilidade, a baixo custo, de materiais lignocelulósicos, como o bagaço de cana-de-açúcar (Domingues *et al.*, 2001).

Na natureza, existe uma grande variedade de microrganismos que produzem celulases, mas apenas alguns são conhecidos como verdadeiros celulolíticos, isto é, capazes de degradar a celulose natural (Ruegger *et al.*, 2004). Dentre esses microrganismos, estão os actinomicetos ou actinobactérias, que são bactérias filamentosas, Gram-positivas, citadas na literatura como produtores de importantes enzimas industriais, envolvidas na degradação da biomassa lignocelulósica (Flores *et al.*, 1997).

*Streptomyces* são actinomicetos produtores de um grande número de antibióticos e de outros compostos como enzimas, incluindo aquelas que apresentam importância industrial na degradação de material lignocelulósico (Jan & Chen, 2003). Atividade endoglucanásica foi encontrada em várias espécies de *Streptomyces* (Shrempf & Walter, 1995; Jan & Chen, 2003; Lima *et al.*, 2005)

O objetivo deste trabalho foi avaliar algumas propriedades de endoglucanases produzidas por duas linhagens de *Streptomyces*, em meio de bagaço de cana-de-açúcar, tais como, a temperatura e o pH ótimos, a termoestabilidade e a conversão da celulose do bagaço em celobiose e glicose.

## **2. Material e Métodos**

### **2.1. Microrganismos**

*Streptomyces* sp. UFPEDA SC 08 e UFPEDA SC 21, isolados de solo de canavial foram utilizados neste trabalho. As linhagens foram gentilmente cedidas pela Coleção de Culturas do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco. Os isolados foram preservados por repiques sucessivos em meio ISP-2 e mantidos a 4°C. Estes isolados foram anteriormente caracterizados como produtores de endoglucanases (Ferreira, 2006).

### **2.2. Meios de cultura**

O meio utilizado para a manutenção das linhagens foi o ISP-2, o qual apresenta a seguinte composição: extrato de levedura (4,0 g/L); extrato de malte (10,0 g/L); glicose (4,0 g/L) e agar (15 g/L). O meio para inóculo foi o ISP-1, contendo os seguintes nutrientes: triptona (5 g/L) e extrato de levedura (3 g/L). Para a produção de celulasas foi utilizado um meio contendo: nitrato de sódio (1,2 g/L); fosfato monobásico de potássio (3,0 g/L); fosfato dibásico de potássio (6,0 g/L); sulfato de magnésio heptahidratado (0,2 g/L); cloreto de cálcio dihidratado (0,05 g/L); sulfato de manganês heptahidratado (0,01 g/L); sulfato de zinco (0,001 g/L) e extrato de levedura (3 g/L). A concentração de bagaço de cana-de-açúcar utilizada 10 g/L. O bagaço, pré-tratado por explosão a vapor, foi cedido pela Faculdade de Engenharia Química da Escola de Engenharia de Lorena (USP).

### **2.3. Condições de cultivo**

As três linhagens de *Streptomyces* foram inoculadas em tubos de ensaio contendo o meio ISP-2, os quais foram mantidos em estufa a 30°C. Após um período de 5-7 dias, as linhagens foram inoculadas em frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 30 mL de meio ISP-1, os quais foram acondicionados a 200 rpm e a 30°C. Após 24 horas, 5 mL dos inóculos foram transferidos para frascos Erlenmeyer de 500 mL, contendo 45 mL dos meios de produção de celulasas, sendo mantidos também a 200 rpm e a 30°C. Após 96 horas, as amostras dos cultivos foram retiradas e então filtradas em membrana de 0,45 µm.

### **2.4. Atividade endoglucanásica**

A atividade endoglucanásica (CMCase) foi medida segundo a metodologia proposta por Ghose (1987), utilizando carboximetilcelulose (CMC) como substrato. Na reação enzimática, utilizou-se 0,5 mL da amostra filtrada e 0,5 mL de uma solução de CMC a 2% P/V, preparada em tampão citrato de sódio a 50 mM e pH 4,8. A reação foi realizada em um banho termostático (Fisaton) e interrompidas pela a adição de 3,0 mL do reagente ácido dinitrossalicílico (Miller, 1959). Para a reação com o ácido dinitrossalicílico, os tubos foram colocados em banho de água fervente, e, após 5 minutos, foram resfriados até a temperatura ambiente. As amostras foram então diluídas para a determinação das absorvâncias em espectrofotômetro da Agilent 8453, a 540 nm.

A quantidade de glicose produzida pelas enzimas foi estimada através de coeficientes angulares obtidos a partir de uma curva de calibração de glicose.

## **2.5. Determinação da temperatura e do pH ótimos**

As amostras com 96 horas de cultivo foram utilizadas para a determinação da temperatura e do pH ótimo. Inicialmente, para cada temperatura, a reação enzimática foi realizada durante doze minutos. Durante esse período, foram retiradas amostras a cada dois minutos para a avaliação da cinética enzimática. As temperaturas avaliadas foram: 30, 40, 50, 60 e 70<sup>0</sup> C, com o pH igual a 4,8. Após a determinação da melhor temperatura, foram realizados experimentos na temperatura ótima e variando o pH. Para os valores de pH de 4,0; 4,8 e 5,0 foi utilizado o tampão citrato-fosfato (50mM), e, para os valores de 6,0; 7,0 e 8,0 foi utilizado o tampão fosfato (50 mM).

## **2.6. Avaliação da termoestabilidade**

Na avaliação da termoestabilidade das enzimas, os ensaios foram realizados na temperatura e pH ótimos, previamente determinados. Durante 4 horas, em intervalos pré-definidos a reação foi interrompida a reação com a adição de DNSA e procedido como no item 2.4.

## **2.7. Testes de conversão da celulose do bagaço de cana-de-açúcar**

Amostras de bagaço pesando aproximadamente 0,1 g e 10 mL das amostras dos cultivos, previamente filtradas, e medindo 0,5 U/ml, foram incubadas à temperatura ambiente e 200 rpm. Após 5 dias, a suspensão foi filtrada e analisada quanto aos teores de celobiose e de glicose. Experimentos controle substituindo o bagaço por papel de filtro, também foram realizados.

## **2.8. Determinação de celobiose e de glicose**

As concentrações de celobiose e de glicose foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência utilizando um cromatógrafo líquido da Agilent 1100. As condições cromatográficas, foram: coluna Phenomenex Rezex CEOS-Organic Acid H + (8%); fase móvel: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 mM; vazão 0,6 mL/min, temperatura 45° C e detector por índice de refração.

### 3. Resultados e Discussão

As Figuras 1 (UFPEDA SC08) e 2 (UFPEDA SC21) apresentam as concentrações de glicose obtidas para cada temperatura testada durante 12 minutos de reação, com o pH igual a 4,8.

Figura 1 – Formação de glicose durante as reações para cada temperatura – UFPEDA SC08

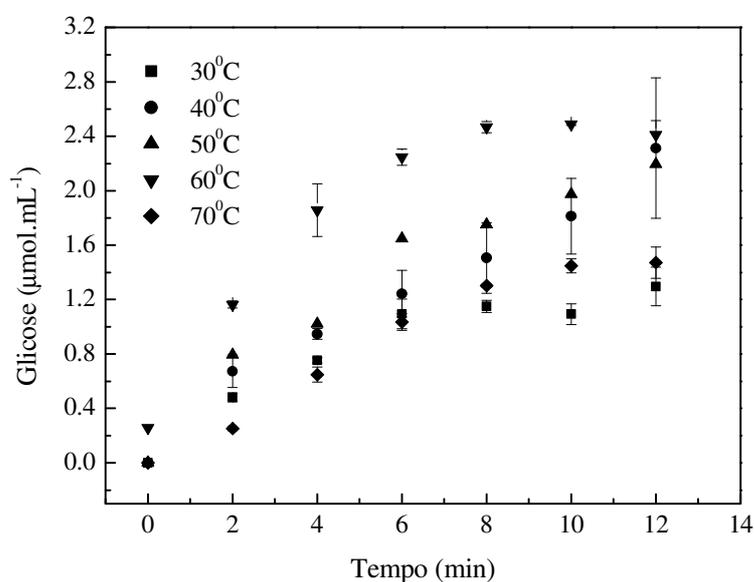
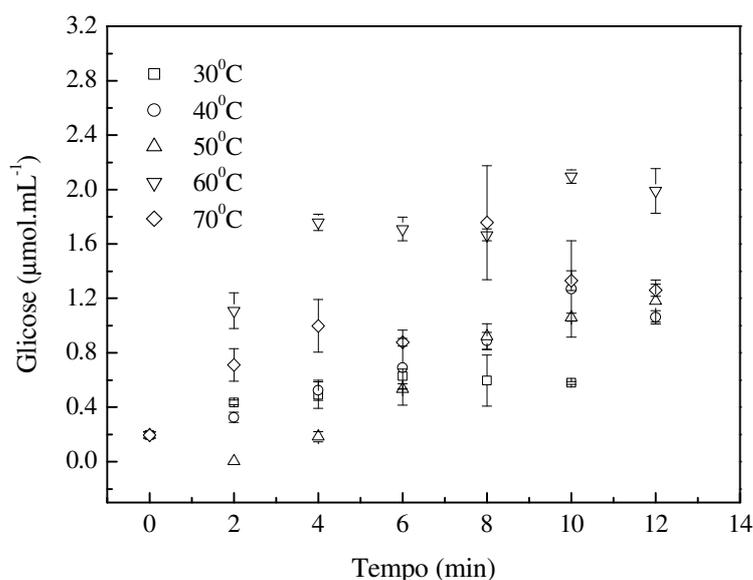


Figura 2 – Formação de glicose durante as reações para cada temperatura – UFPEDA SC21



Nas Figuras 1 e 2 é observada a cinética durante 12 minutos, com os coeficientes de variação (< 20%). Estes resultados foram utilizados para calcular a atividade endoglucanásica por regressão linear. Nas Tabelas 1 e 2 são apresentadas essas atividades para cada temperatura e linhagem testada. De acordo com estas tabelas, pode-se observar que, em todas as temperaturas, foi possível calcular a atividade, com coeficientes de correlação maiores que 0,91.

A Figura 3 apresenta os perfis de atividade relativa em relação a cada temperatura, para ambas linhagens. Uma temperatura ótima de 60°C foi observada. Também é possível notar que a 70°C as enzimas ainda apresentavam uma atividade residual de aproximadamente 30% (UFPEDA SC08) e 50% (UFPEDA SC21).

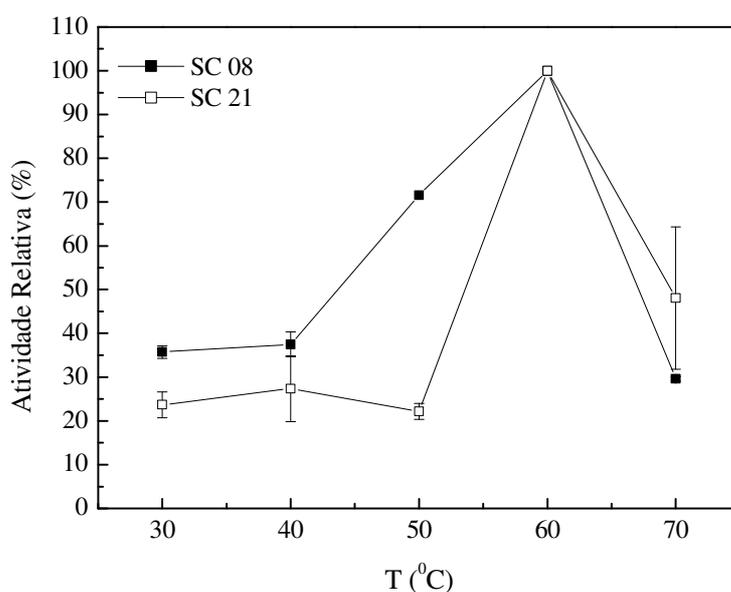
Tabela 1 – Atividade endoglucanásica para cada temperatura – UFPEDA SC08

<b>T (°C)</b>	<b>SC 08 (1)</b>	<b>R</b>	<b>SC 08 (2)</b>	<b>R</b>
30	0,202	0,98	0,160	0,96
40	0,226	0,99	0,155	0,99
50	0,375	0,95	-	-
60	0,524	0,99	0,487	0,97
70	0,150	0,98	0,149	0,95

Tabela 2 – Atividade endoglucanásica para cada temperatura – UFPEDA SC21

T (°C)	SC 21 (1)	R	SC 21 (2)	R
30	0,123	0,96	0,096	0,99
40	0,161	1,00	0,092	0,96
50	0,094	0,97	0,111	0,97
60	0,462	0,99	0,463	0,92
70	0,297	1,00	0,147	0,95

Figura 3 – Atividade relativa para cada temperatura

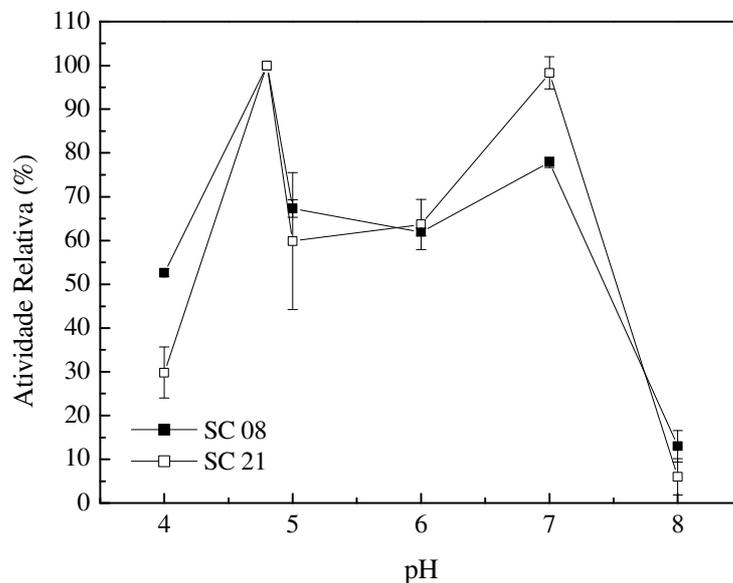


Os resultados obtidos neste trabalho com relação à temperatura ótima de endoglucanases das linhagens de *Streptomyces* estão de acordo com aqueles encontrados na literatura para outros *Streptomyces*. Jan & Chen (2003) descreveram uma endoglucanase produzida por uma linhagem termofílica (*Streptomyces* T3-1), com temperatura ótima a 50°C, enquanto que Schrempf & Walter (1995) citaram uma endoglucanase de *Streptomyces reticuli* com temperatura ótima a 55°C. Lima et

al. (2005) encontraram uma temperatura ótima variando entre 50 e 60°C para endoglucanase produzida por *S. drozdowiczii*.

Com a definição da cinética enzimática e da melhor temperatura de reação, foi avaliado o melhor pH, efetuando-se a reação enzimática a 60°C e parando-se com 2 minutos pela adição do ácido dinitrossalicílico. O pH ótimo ocorreu a pH 4,8 (Figura 4) para ambas linhagens. Entretanto, a pH 7,0 também apareceu um pico. Semêdo et al. (2000) encontraram pH ótimo igual a 7,0 para endoglucanase produzida por *S. drozdowiczii*, com um pico extra em pH 11,0. Por outro lado, Lima et al. (2005), encontraram endoglucanases com pH ótimo igual a 5,0 e a 10,0. Jan and Chen (2003) obtiveram endoglucanase de *Streptomyces* T3-1 com pH ótimo igual a 7,0.

Figura 4 – Atividade relativa para cada pH



Valores de meia vida de 7 horas a 60°C, ou 3 h a 70°C foram encontrados na literatura para algumas espécies de actinomicetos (George *et. al.*, 2001). Uma atividade residual de 8% após 30 minutos de incubação a 45°C foi encontrada para endoglucanase de uma espécie de *Streptomyces* (Hoshino et al., 1999). No presente trabalho, as linhagens de *Streptomyces*, UFPEDA SC 08 (Figura 5) e UFPEDA SC 21 (Figura 6) foram capazes de reter aproximadamente 60% e 36% de atividade residual a 60°C, durante 60 minutos, respectivamente. Entretanto, após 60 minutos, a diminuição da atividade residual foi mais acentuada para endoglucanase da linhagem UFPEDA SC 08.

Figura 5 – Termoestabilidade de endoglucanases de UFPEDA SC 08

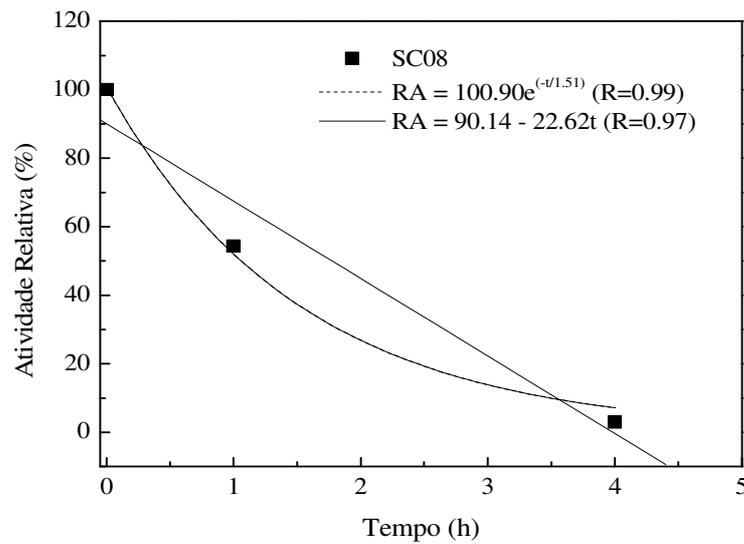
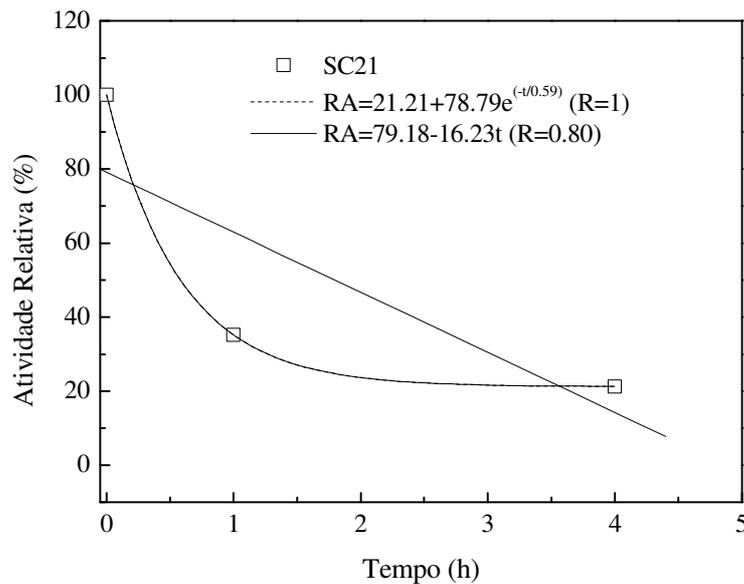


Figura 6 – Termoestabilidade de endoglucanases de UFPEDA SC 21



Por outro lado, a endoglucanase da linhagem UFPEDA SC 21 manteve uma atividade residual de aproximadamente 25% durante as próximas 3 horas. Foram utilizados ajustes lineares e exponenciais para os decaimentos das atividades de endoglucanases para ambas as linhagens. Em ambos os casos os ajustes exponenciais foram melhores, com  $R > 0,99$ . Isso indica que, inicialmente existe uma acentuada queda da estabilidade, e depois uma estabilização.

Com relação aos testes realizados no bagaço de cana-de-açúcar, foram encontrados valores de concentração de celobiose e de glicose, de, aproximadamente, 88 % e 62% daqueles encontrados

nos testes sobre o papel de filtro, para ambas as linhagens testadas. A menor quantidade de glicose formada em relação à quantidade de celobiose indica a necessidade de adicionar beta-glicosidase para aumentar a conversão de celobiose à glicose.

#### 4. Conclusões

As duas linhagens de *Streptomyces* (UFPEDA SC 08 e UFPEDA SC 21) utilizadas neste trabalho foram capazes de produzir celulases em meio à base de bagaço de cana-de-açúcar. Nos ensaios das reações enzimáticas foi possível acompanhar a cinética de reação e definir o melhor tempo de reação (2 minutos), bem como a temperatura e o pH ótimos. Celulases termoestáveis são consideradas ideais para aplicações biotecnológicas. Na conversão da celulose do bagaço, por exemplo, geralmente se utiliza temperaturas entre 45 e 70°C. No presente trabalho, as endoglucanases apresentaram rápido decaimento da atividade residual nos primeiros 60 minutos, entretanto, a linhagem UFPEDA SC 21 apresentou enzimas mais termoestáveis. Ainda, em futuros experimentos de hidrólise, faz-se necessário a utilização de beta-glicosidase para aumentar a conversão e, conseqüentemente evitar o acúmulo de celobiose e inibição das endoglucanases.

#### 5. Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de ITI (Iniciação Tecnológica Industrial) concedida e à Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) pelo apoio financeiro.

#### Abstract

In this work, some properties of endoglucanases produced by two strains of *Streptomyces* (UFPEDA SC08 e UFPEDA SC21) in medium based on sugar cane bagasse, were assessed. The optimum temperature and pH of reaction, the thermostability and testing of conversion of cellulose from bagasse in sugar were determined. The temperatures evaluated were: 30, 40, 50, 60 and 70°C with the pH equal at 4.8. At optimum temperature, was determined the optimum pH, ranging from 4-8. In assessing the thermostability, the tests were conducted at 60°C for 4 hours. The enzyme reactions were performed in optimum temperature and pH, previously determined. Samples of bagasse weighing approximately 0.1 g and 10 mL of samples of cultivation, previously filtered, and measuring 0.5 U / ml, were incubated at room temperature and 200 rpm. After 5 days, the suspension was filtered and determined the contents of cellobiose and glucose. The optimum temperature and pH were 60°C and 4.8, respectively. The strain UFPEDA SC 21 had enzymes more stability. Still, in future experiments hydrolysis, it is necessary to addition beta-glucosidase to increase the conversion and thus avoid the accumulation of cellobiose and inhibition of endoglucanases.

**Key-words:** endoglucanases, bagasse, *Streptomyces*.

#### Referências bibliográficas

ADSUL, M.G.; GHULEB, J.E.; SINGHB, R.; SHAIKHB, H. Polysaccharides from bagasse: applications in cellulase and xylanase production. *Carbohydrate Polymers*, v.57., p.67-72, 2004.

- ADSUL, M.G.; GHULEB, J.E.; SINGHB, R.; SHAIKHB, H. Enzymatic hydrolysis of delignified bagasse polysaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v.62., p.6-10, 2005.
- DOMINGUES, F.C.; QUEIROZ, J.A.; CABRAL, J.M.S.; FONSECA, L. P. Production of cellulases in batch culture using a mutant strain of *Trichoderma reesei* growing on soluble carbon source. **Biotechnology Letters**, v.23., p.771-775, 2001.
- FERREIRA, A.A.; ARAÚJO, J.M. Trabalho de conclusão de curso de graduação: Avaliação da atividade antimicrobiana e enzimática de actinomicetos isolados de compostagem e de solo, 2006.
- FINGUERUT, J.; BAUDEL, H.M.; ROSSEL, C.E.V. *III Workshop Tecnológico sobre Hidrólise de Material Lignocelulósico. Projeto Programa de Pesquisa em Políticas Públicas – Etanol*, 2006.
- FLORES, M. E.; PÉREZ, R.; HUITRÓN, C. Beta-Xylosidase and xylanase characterization and production by *Streptomyces* sp. CH-M-1035. **Letters in Applied Microbiology**, v.24., p.410-416, 1997.
- GEORGE, S.P.; AHMAD, A.; RAO, M.B. Studies on carboxymethyl cellulose produced by an alkalothermophilic actinomycete. **Bioresource Technology**, v.77., p.171-175, 2001.
- GHOSE, T.K. Measurement of cellulase activities. **Pure Applied Chemistry**, v.59., p.257-268, 1987.
- HOSHINO, E.; WADA, Y.; NISHIZAWA, K. Improvements in the hygroscopic properties of cotton cellulose by treatment with an endotype cellulase from *Streptomyces* sp. KSM-26. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.88., p.519-525, 1999.
- JAN, H.D.; CHEN, K.S. Production and characterization of thermostable cellulases from *Streptomyces* transformant T3-1. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, v.19., p.263-268, 2003.
- LEE, R.L.; PAUL, J.W.; WILLEM, H.; VAN ZYL; ISAK, S.P. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.66., p.506-577, 2002.
- LIMA, A.L.G.; NASCIMENTO, R.P.; BOM, E.P.S.; COELHO, R.R.R. *Streptomyces drozdowiczii* cellulase production using agro-industrial by-products and its potential use in the detergent and textile industries. **Enzyme and Microbial Technology**, v.37., p.272-277, 2005.
- LYND, L.R.; WEIMER, P.J.; VAN ZYL, W.H.; PRETORIUS, I.S. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. Microbiology and molecular biology reviews. **American Society for Microbiology**., n.3, v.66., p.506-577, 2002.
- MILLER, L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v.31., p.426-428, 1959.
- RUEGGER, M.J.S.; TAU-K-TORNISIELO, S.M. Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins. **Revista Brasileira de Botânica**, n.2, v.27., p.205-211, 2004.
- SEMÊDO, L.T.A.S.; GOMES, R.C.; BON, E.P.S.; SOARES, R.M.A.; LINHARES, L.F.; COELHO, R.R.R. Endocellulase and exocellulase activities of two *Streptomyces* strain isolated from a forest soil. **Applied Biochemical and Biotechnology**, v.84., p.267-276, 2000.
- SCHREMPF, H.; WALTER, S. The cellulolytic system of *Streptomyces reticuli*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.17., p.353-355, 1995.
- Primeiro Autor: Joanna Cysneiros Silva  
Filiação institucional: Universidade Federal de Pernambuco  
Departamento: Antibióticos  
Função ou cargo ocupado: Bolsista de Iniciação Tecnológica Industrial  
Titulação: Estudante do Curso de Ciências Biológicas  
Endereço completo para correspondência: Imbiribeira, Recife, PE, Brasil, 51170200.  
Telefones para contato: (81) 21268347  
e-mail: [joannacysneiros@hotmail.com](mailto:joannacysneiros@hotmail.com)