

Bagaço de cana-de-açúcar e bagaço de sisal como substratos indutores para a produção de endoglucanase por actinobactéria isolada de solo de cultura de sisal

¹Dayse Batista dos Santos, ¹Aline Simões da Rocha Bispo, ²Rodrigo Pires do Nascimento, ¹Márcia Luciana Cazetta

¹ Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas. Rua Rui Barbosa, 710-Campus Universitário, Centro, CEP: 44380-000. Cruz das Almas, BA, Brasil. E-mails: daysebatista@yahoo.com.br, alinesimoesbispo@gmail.com, malulz@yahoo.com.br

² Universidade Federal do Rio de Janeiro, Departamento de Engenharia Química, Escola de Química, Centro de Tecnologia, Avenida Athos da Silveira Ramos, 149, Bloco E, sala E-203, CEP: 21941-909. Rio de Janeiro, RJ, Brasil. E-mail: rpn1978@gmail.com

Resumo: Uma linhagem de actinobactéria, isolada de solo de cultura de sisal (*Agave sisalana* Perrine) no semiárido baiano, denominada ARA-01, foi selecionada como uma linhagem promissora para a produção de endoglucanase em substratos agroindustriais. Bagaço de cana-de-açúcar e bagaço de sisal foram empregados como fonte de carbono e água de maceração de milho como fonte de nitrogênio, em fermentação submersa do tipo batelada. Os resultados mostraram que o meio contendo 2,4 % de bagaço de cana-de-açúcar e 1,3 % de água de maceração de milho levaram a uma produção de 230 U.L⁻¹ de endoglucanase, no segundo dia de fermentação. Com o bagaço de sisal foi obtida produção de 630 U.L⁻¹ de endoglucanase na condição de 1,6 % de bagaço de sisal e 1,5 % de água de maceração de milho, após 3 dias de fermentação. Estes resultados mostraram que a actinobactéria ARA-01 e os substratos agroindustriais utilizados apresentaram bom potencial para produção de endoglucanase.

Palavras chave: Enzimas microbianas, Substratos agroindustriais, Bactéria.

Sugar cane and sisal bagasse as inducers substrates for endoglucanase production by actinobacteria isolated from soil cultivation of sisal

Abstract: An strain of actinobacteria, isolated from soil cultivation of sisal (*Agave sisalana*) in semiarid region from Brazilian Northern, coded ARA-01, was selected as a promising strain for endoglucanase production using agroindustrial products as substrates. Sugarcane and sisal bagasse were used as carbon sources and corn steep liquor as nitrogen source in submerged fermentation. The results showed that the medium containing 2,4 % of sugar cane bagasse and 1,3 % of corn steep liquor led to 230U.L⁻¹ of endoglucanase production, on the second day of fermentation. With sisal bagasse was obtained production of 630 U. L⁻¹ of endoglucanase in the condition of 1,6 % of sisal bagasse and 1.5 % of corn steep liquor, after three days of fermentation. These results showed that the actinobacteria ARA-1 and substrates used in this work showed good potential for endoglucanase production.

Key words: Microbial enzymes, Agroindustrial substrates, Bacteria.

Introdução

Actinobactérias constituem um grupo de bactérias Gram-positivas filamentosas abundantemente encontradas no solo, responsáveis pela produção de uma variada gama de substâncias com atividades biológicas, entre elas várias enzimas de interesse industrial e biotecnológico (Sharma, 2014). O gênero *Streptomyces* é um dos mais importantes do grupo das actinobactérias e, há décadas, vêm sendo realizadas pesquisas voltadas para produção de uma grande variedade de enzimas, incluindo aquelas envolvidas na degradação da celulose, hemicelulose e lignina. A microbiota dos solos tropicais é ainda pouco conhecida, oferecendo uma excelente fonte inexplorada para a bioprospecção de novas espécies pertencentes a este promissor grupo de micro-organismos (Jang, Chen 2003, Grigorevski-Lima et al. 2005, Nascimento et al. 2009 & Da Vinha et al. 2011).

As celulasas compõem o terceiro maior grupo de enzimas industriais, devido à sua grande aplicação na indústria têxtil, no processamento do algodão, reciclagem de papel, detergentes, extração e clareamento de sucos de frutas, bem como na produção de ração animal. Entretanto, a tendência é que estas enzimas ocupem brevemente o primeiro lugar, seja na produção de etanol, butanol ou outros produtos derivados da fermentação dos açúcares provenientes da biomassa (Wilson, 2009), devido ao crescente número de pesquisas com estas enzimas na produção de etanol de segunda geração (Maeda et al., 2013, Macedo et al., 2013 & Fischer et al. 2014).

Entretanto, os custos do processo ainda são elevados e, por isso, a busca por substratos de baixo custo é constante como forma de tornar o processo economicamente viável e ambientalmente correto. A utilização de subprodutos agroindustriais, e outros compostos naturais, podem representar redução dos custos na produção de enzimas, especialmente em países onde os resíduos agroindustriais são abundantes, como o Brasil (Nascimento et al., 2009 & Hideo et al. 2011). O bagaço de cana-de-açúcar é uma das maiores fontes de celulose no Brasil e contém, aproximadamente, 50% de celulose e 25% de hemicelulose e lignina (Pandey et al. 2000). Os resíduos do beneficiamento da cana-de-açúcar vêm sendo estudados como principal fonte de carbono para produção de

várias enzimas, especialmente as celulasas (Sukumaran et al., 2009, Barros et al., 2010, Maeda et al., 2010, Da Vinha et al., 2011 & Delabona et al., 2013). Da mesma forma, a água de maceração de milho, também conhecida como milhocina, o principal subproduto da indústria de milho, é também um substrato de baixo custo disponível em larga escala, e tem se mostrado muito eficiente na substituição do extrato de levedura como uma rica fonte de nitrogênio e vitaminas para meios de cultivo (Parekh et al., 1999). Este resíduo barato tem sido empregado com sucesso desde os anos 70 em uma variedade de processos fermentativos na produção de solventes, antibióticos e enzimas, entre elas as celulasas (Chen et al., 1979, De Azeredo et al., 2006, Nascimento et al., 2009 & Da Vinha et al., 2011).

O bagaço de sisal, por outro lado, ainda é muito pouco explorado como substrato para processos fermentativos, a despeito de sua composição rica em celulose (entre 65,0% e 85,0%, em média) e hemicelulose (cerca de 10,0 % a 18,0 %) (Joseph et al., 1999, Megiatto Jr. et al., 2006 & Martin et al., 2009). A produção do sisal é destinada principalmente para a extração da fibra, utilizada na manufatura de cordas, fios, barbantes, tapetes, sacos e bolsas, entre outros. Também pode ser utilizada na fabricação de pasta celulósica, empregada na confecção do papel Kraft e de outros tipos de papéis finos. Além dessas aplicações, a fibra de sisal pode ser empregada na indústria automotiva, de móveis e eletrodomésticos, na mistura com polipropileno e na construção civil (Embrapa Algodão, 2004). Durante o processamento da fibra, são gerados resíduos sólidos e líquidos que, atualmente, não recebem um destino adequado (Salazar & Leão, 2006). De acordo com o Sindicato das Indústrias de Fibras Vegetais do Estado da Bahia [SINDIFIBRAS], (2007), no setor sisaleiro nordestino cerca de apenas 4 % da folha é aproveitado para a retirada da fibra. O restante constitui os denominados resíduos do desfibramento, compostos pela mucilagem (15 %), suco (80 %) e bucha (1 %), que são utilizados como ração animal, adubo orgânico e pela indústria farmacêutica (Martin et al., 1999 & Faria et al., 2008).

Estudos recentes com produção de celulase por actinobactérias usando subprodutos de baixo custo são escassos na literatura. Nosso grupo de pesquisa isolou linhagens celulolíticas

de actinobactérias de vários tipos de solo no Brasil com resultados promissores. Neste trabalho, foi investigada a produção de endoglucanase pela actinobactéria ARA-01 isolada do solo de culturas do sisal (*Agave sisalana*, Perrine) da região semiárida do Nordeste Brasileiro, usando bagaço de cana-de-açúcar (BCA) e bagaço de sisal (BS), como fontes de carbono, e água de maceração de milho (AMM) como fonte de nitrogênio.

Material e métodos

Isolamento dos microrganismos

Os microrganismos utilizados neste estudo foram isolados de resíduos de sisal e solo coletados em fazendas produtoras de sisal, localizadas nos municípios de Tiquara, Ourolândia, Laje do Batata, Araci, Jacobina e Campo Formoso, reconhecidas como grandes produtoras de sisal. Para o isolamento das actinobactérias, 10 gramas de solo ou 5 gramas de resíduos do sisal (raízes, bagaço e mucilagem) foram adicionados a 90 e 95 mL de solução salina estéril em frascos erlenmeyer de 250 mL, respectivamente. A suspensão foi homogeneizada em agitador rotativo, a 150 rpm por 30 minutos. Foram preparadas diluições seriadas, de 10^{-1} a 10^{-6} , a partir da suspensão original. Os meios de cultura utilizados (agar glicerol-peptona e agar amido caseína, seletivos para actinobactérias) foram esterilizados e, em seguida, adicionado 150 mg/L de fluconazol (antifúngico). Alíquotas de 0,1 mL de cada diluição foram espalhadas na superfície do meio utilizando alça de Drigalsky, em triplicata. Após o período de incubação, colônias morfológicamente distintas foram selecionadas e repicadas no mesmo meio de cultura para obtenção de colônias puras, empregando-se a técnica de esgotamento. As colônias purificadas foram transferidas para microtubos contendo solução de glicerol a 20 % e armazenado em freezer a -20 °C. Após a purificação, os isolados foram mantidos em meio de cultura contendo (g.L^{-1}): extrato de levedura, 4,0; extrato de malte, 10,0; glicose, 4,0 e agar 15,0 (Shirling & Gottlieb, 1966). As suspensões de esporos foram preparadas de acordo com Hopwood et al. (1985), após cultivo (28 °C/ 15 dias) no mesmo meio. Os esporos foram mantidos em glicerol a 20 % (v/v) a -20 °C.

Seleção

Atividades de celulasas foram medidas por meio de testes qualitativos em meio sólido contendo (g.L^{-1}): carboximetilcelulose (CMC) de baixa viscosidade 10,0; extrato de levedura 1,0; agar 15,0 suplementado com sais (NaNO_3 1,2; KH_2PO_4 3,0; K_2HPO_4 6,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,05; $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,001), pH 7,0, foram inoculadas, em duplicata. Após incubação (10 dias / 30 °C), as zonas de degradação da CMC foram reveladas por meio da adição de solução de vermelho congo 0,1% (p/v), de acordo com Sazci et al. (1986).

Fermentação submersa

A atividade de endoglucanase foi medida após cultivo em frascos erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio de sais minerais (Breccia et al., 1995), (g.L^{-1}): 3,0 KH_2PO_4 ; 6,0 K_2HPO_4 ; 0,2 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,02 CaCl_2 ; 2,0 NaCl ; 2,6 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ suplementado com 1,0 mL de solução de elementos-traço (em g.L^{-1}): 0,064 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 0,015 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,011 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,079 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$). Bagaço de cana-de-açúcar e de sisal, *in natura*, foram adicionados, como fontes de carbono, e água de maceração de milho (AMM) como principal fonte de nitrogênio, em diferentes combinações como descrito na Tabela 1. O pH inicial do meio foi ajustado para 7,0. O meio de cultura foi inoculado com 50 μL de solução de esporos ($7,0 \times 10^8$ esporos. mL^{-1}), incubados a 30 °C, sob agitação de 180 rpm durante 6 dias. Amostras foram coletadas diariamente, filtradas em filtros de vidro com membrana (Millipore) de 1,5 μm e o sobrenadante foi utilizado para determinar a atividade de endoglucanase.

Atividade Enzimática

A atividade de carboximetilcelulase (endoglucanase) foi determinada por meio da liberação de açúcares redutores na mistura reacional de 1 mL de sobrenadante bruto e 1 mL da solução de 2 % (p/v) de carboximetilcelulose (CMC) em tampão citrato a 0,05 mol.L^{-1} (pH 4,8), incubada a 50 °C por 30 min. Os açúcares redutores foram determinados por meio do método do ácido dinitrosalicílico (DNS), segundo Miller (1959). Uma unidade (U) da atividade de endoglucanase corresponde à liberação de 1 μmol de glicose por minuto sob as condições do ensaio (Ghose, 1987).

Tabela 1 – Composição do meio utilizado nas fermentações submersas e resultados das atividades de endoglucanase após 3 dias para o Bagaço de Sisal (BS) e 2 dias para o Bagaço de Cana-de-Açúcar (BCA)

Ensaio	Fontes de Carbono	Fonte de Nitrogênio	Bagaço de Sisal (BS)	Bagaço de Cana-de-Açúcar (BCA)
	BS ou BCA (%)	Água de Maceração de Milho (%)	Atividade de Endoglucanase (U L ⁻¹)	Atividade de Endoglucanase (U L ⁻¹)
1	0,8	0,3	20,0	0,0
2	2,4	0,3	20,0	100,0
3	0,8	1,3	40,0	160,0
4	2,4	1,3	30,0	230,0
5	0,5	0,8	30,0	80,0
6	2,7	0,8	10,0	110,0
7	1,6	0,1	10,0	10,0
8	1,6	1,5	630,0	60,0
9	1,6	0,8	20,0	107,0

Resultados e discussão

Os resultados da seleção das actinobactérias produtoras de endoglucanase estão descritos na Tabela 2. Dentre os 86 isolados que exibiram zona de hidrólise, 17 linhagens se destacaram na produção de endoglucanase, apresentando halos maiores

de 4,1 cm de diâmetro. Entretanto, a linhagem ARA-01, isolada de solo de região semiárida, coletado em uma fazenda de sisal no município de Araci, foi a que apresentou melhor crescimento e esporulação. Assim, este isolado foi escolhido para os ensaios fermentativos.

Tabela 2 - Seleção de actinobactérias produtoras de endoglucanase em meio sólido contendo carboximetilcelulase por meio de zonas de hidrólise.

Região de Coleta do Solo	Nº de diferentes morfotipos	Zona de Hidrólise			
		-	+	++	+++
Campo Formoso	22	4	1	13	4
Araci	18	6	3	7	2
Laje do Batata	55	33	12	8	2
Ourolândia	27	17	4	5	1
Tiquara	26	12	1	9	4
Jacobina	18	6	3	5	4

Zona de hidrólise: (-) negativo; (+) fraco (< 1.9 cm de diâmetro); (++) médio (2.0 – 4.0 cm de diâmetro); (+++) forte (> 4.1 cm de diâmetro).

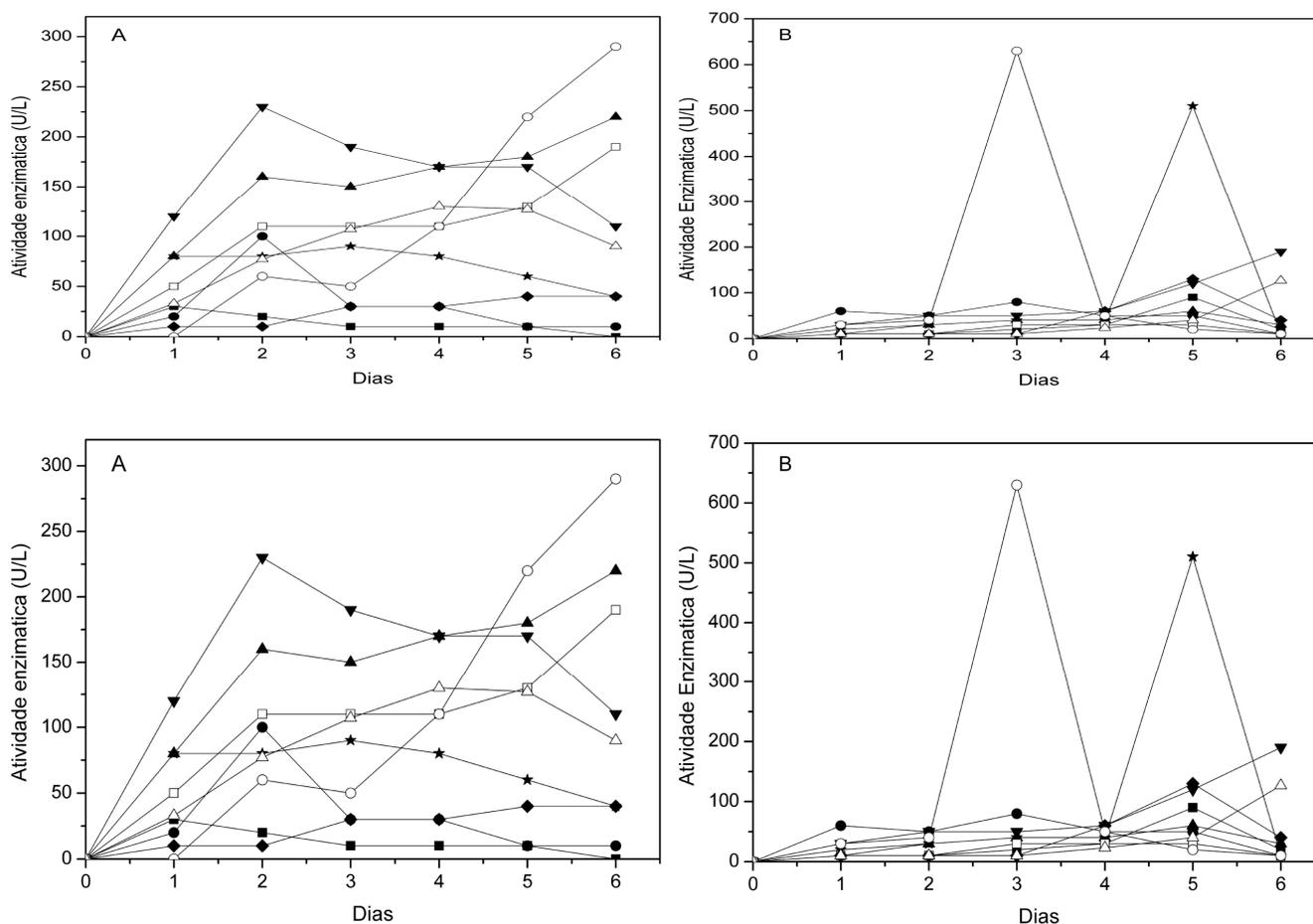
Produção de endoglucanase por fermentação submersa utilizando Bagaço de Cana-de-Açúcar (BCA) e Bagaço de Sisal (BS), como fontes de carbono, e água de maceração de milho (AMM) como fonte de nitrogênio.

A atividade enzimática mais elevada com BCA foi de 290,0 U.L⁻¹, após 6 dias de fermentação, no ensaio 8 (1,6 % BCA e 1,5 % AMM), seguida de 230 U.L⁻¹ no ensaio 4 (2,4 % BCA e 1,3 % AMM), após 2 dias de fermentação. Dessa forma, a produtividade

enzimática do ensaio 8 foi de $48,0 \text{ U.L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$, enquanto no ensaio 4 foi de $115 \text{ U.L}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$, mostrando que esta última condição foi a mais eficiente (Figura 1A e Tabela 1). Estes resultados mostram que o isolado ARA-01 apresenta bom potencial para produção destas enzimas. Além disso, as actinobactérias

apresentam uma vantagem em relação aos fungos filamentosos, que podem formar "pellets" durante o crescimento em meio líquido, como resultado do contato insuficiente das células fúngicas com o meio (Cunha et al., 2012), ao contrário das actinobactérias, onde este fenômeno não ocorre.

Figura 1 - Cinética enzimática para produção de endoglucanase pela actinobactéria ARA01 a 30°C durante 6 dias em meio de cultura contendo, em %: A) BCA + AMM e B) BS + AMM, respectivamente: -■- 0.8-0.3, -●- 2.4-0.3, -▲- 0.8-1.3, -▼- 2.4-1.3, -★- 0.5-0.8, -□- 2.7-0.8, -◆- 1.6-0.1, -○- 1.6-1.5, -△- 1.6-0.8



A Tabela 1 mostra que, de acordo com as diferentes concentrações das fontes de carbono e nitrogênio, a produção de endoglucanase variou de $0,0 \text{ U L}^{-1}$ (ensaio 1) a $230,0 \text{ U L}^{-1}$ (ensaio 4) para o BCA, sendo que a maior produção ocorreu nas concentrações de 2,4 % de BCA e 1,3 % de AMM (Figura 1A). Comparando os ensaios 2 e 4 é possível observar o efeito positivo da AMM na produção de endoglucanase, a qual aumentou em 56 %

quando a concentração foi elevada de 0,3 % para 1,3 %. O mesmo ocorreu nos ensaios 7 e 8, onde o aumento da AMM de 0,1 % para 1,5 % elevou a atividade enzimática em 6 vezes ($10,0 \text{ U.L}^{-1}$ para $60,0 \text{ U.L}^{-1}$), em uma concentração fixa de BCA. Aparentemente, isto não ocorre com todas as fontes de nitrogênio, pois Jang e Chen (2003) não observaram nenhum efeito do aumento da concentração de diferentes fontes de

nitrogênio (sulfato de amônia, uréia e peptona) na produção de celulase por *Streptomyces* T3-1.

De forma similar, com a fonte de carbono, os ensaios 3 e 4 mostraram efeito positivo na produção de endoglucanase quando a concentração de BCA foi elevada de 0,8 % para 2,4 %, de 160 U.L⁻¹ para 230,0 U.L⁻¹. Os ensaios 5 e 6 confirmam estes resultados, uma vez que o aumento na concentração de BCA de 0,5 % para 2,75 % elevou a atividade de endoglucanase de 80 U.L⁻¹ para 110,0 U.L⁻¹ (Tabela 1). Franco-Cigliano et al. (2013) também obtiveram resultados expressivos de produção de celulases utilizando BCA e AMM como substrato para *Streptomyces misionensis*, Cercos et al. PESB-25, e afirmaram que a interação entre estes dois substratos proporcionou uma relação C:N adequada para suprir o crescimento microbiano e, conseqüentemente, melhorar a produção da enzima.

No caso do bagaço de sisal (BS) o melhor resultado obtido foi 630,0 U.L⁻¹ após 3 dias de fermentação, na condição de 1,6 % de BS e 1,5 % de AMM (ensaio 8), seguida do ensaio 5 com 510,0 U.L⁻¹, após 5 dias de fermentação na condição de 0,5 % de BS e 0,3 % de AMM (Figura 1B). Assim, foram obtidas produtividades de 210,0 U.L⁻¹.dia⁻¹ e 102,0 U.L⁻¹.dia⁻¹, respectivamente. Podemos observar, pela Tabela 1, que a variação na concentração do bagaço de sisal não influenciou na produção enzimática. Ao contrário, o aumento da fonte de nitrogênio elevou a produção de endoglucanase, como pode ser observado nos ensaios 1 e 3 e ensaios 2 e 4. No ensaio 8, onde se encontra a concentração mais elevada de AMM (1,5 %), foi atingida a máxima produção da enzima.

De acordo com vários estudos descritos na literatura, boas produções de celulases são obtidas utilizando AMM como fonte de nitrogênio. Grigorevski-Lima et al. (2005) obtiveram produções mais elevadas de celulase por *Streptomyces drozdowiczii*, Semêdo et al., utilizando AMM do que com extrato de levedura, sob as mesmas condições de cultivo. O mesmo foi observado por Nascimento et al. (2009) com *Streptomyces malaysiensis*, sp. nov. Elevadas produções de celulases também foram descritas por

Kalogeris et al. (2003) empregando AMM e resíduos agroindustriais como fontes de carbono pelo fungo filamentoso *Thermoascus aurantiacus*. Da Vinha et al. (2011) obtiveram 110 U.L⁻¹ de atividade de endoglucanase com um combinação de AMM + BCA por *Streptomyces viridobrunneus*, Terekhova. Isto representa uma grande vantagem, porque a AMM apresenta custo menor quando comparado com fontes de nitrogênio tradicionais, como peptona e extrato de levedura. Além disso, apresenta uma composição rica em nutrientes, especialmente aminoácidos e polipeptídeos, que são excelentes fontes de nitrogênio, bem como vitaminas do complexo B e vários sais minerais como cálcio, ferro, magnésio, manganês, fósforo, potássio, enxofre, zinco, entre outros (Mirza & Mushtaq, 2006, Xiao et al., 2012; Pharazyn & Nortey, 2013). Outra vantagem da AMM é que, aparentemente, não causa alterações no pH da cultura, provavelmente devido à presença de aminoácidos que apresentam efeito tamponante, ao contrário de outras fontes de nitrogênio, como uréia, que torna o pH alcalino (Jang & Chen 2003), o que pode afetar negativamente a produção das enzimas.

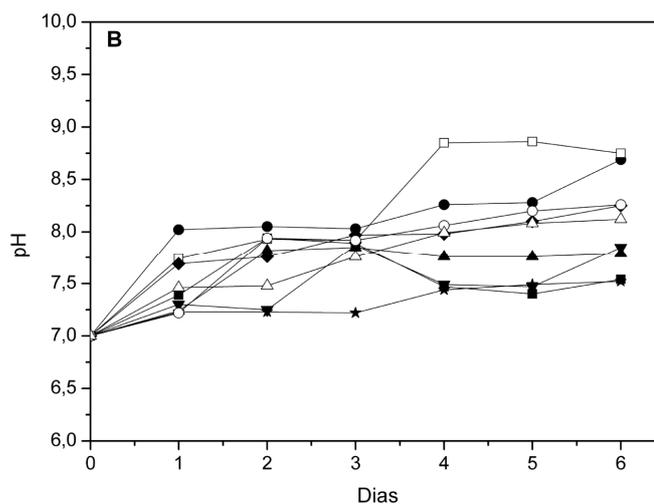
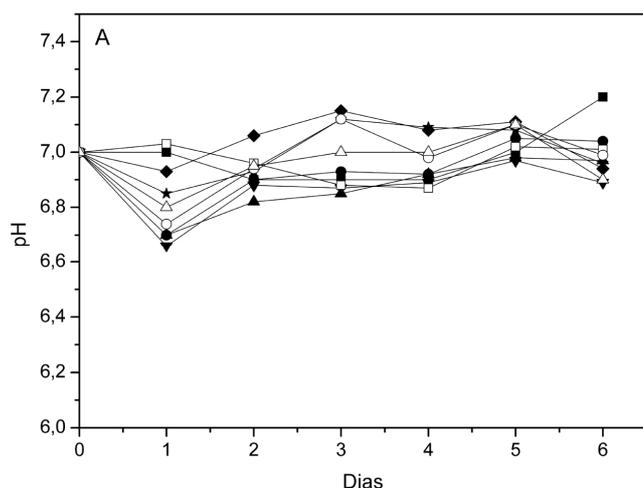
Com relação à evolução do pH ao longo da fermentação, no meio com BCA o pH variou na faixa de 6,7-7,2 após 6 dias (Figura 2A). Embora a maioria dos relatos na literatura descreva que atividades de endoglucanase ocorrem em pH alcalino (George et al., 2001), são descritas boas produções em pH em torno da neutralidade para muitas linhagens (Semêdo et al., 2000; Jang & Chen 2003; Gomathi et al., 2012). É importante que o meio de cultura não apresente variação de pH ao longo do processo, de modo que não interfira na produção da enzima e evite a necessidade de adição de substâncias para seu controle.

Entretanto, quando foi utilizado BS como substrato ocorreu aumento significativo do pH no final da fermentação, especialmente nas maiores concentrações. O bagaço de sisal é um resíduo bastante alcalino e, mesmo tendo sido neutralizado antes do início das fermentações, o pH não se manteve constante ao longo do tempo. Assim, nos ensaios que continham as maiores concentrações de BS (ensaios 2, 4, 6, 7, 8, 9, 10 e 11) foram atingidos os pHs mais elevados no final da

fermentação, entre 8,2 e 8,7. Os ensaios 1, 3 e 5, que continham de 0,5 % a 0,8 % de BS, apresentaram pH relativamente constante (Figura 2B). Ainda assim, a maior atividade enzimática foi atingida em um ensaio com concentração elevada de BS, o que indica que

a celulase produzida pelo isolado ARA-01 é tolerante a pHs alcalinos. Isto é bastante vantajoso do ponto de vista industrial, pois evita a contaminação por fungos e outras bactérias, que se desenvolvem melhor em pH ácido e neutro, respectivamente.

Figura 2 - Cinética do pH utilizando o isolado ARA-01 durante processo fermentativo a 30° C, 6 dias, em meios de cultura contendo, em %: A) BCA + AMM e B) BS + AMM, respectivamente : -■- 0.8-0.3, -●- 2.4-0.3, -▲- 0.8-1.3, -▼- 2.4-1.3, -★- 0.5-0.8, -□- 2.7-0.8, -◆- 1.6-0.1, -○- 1.6-1.5, -△- 1.6-0.8.



Conclusões

A actinobactéria ARA-01, utilizada neste estudo, foi capaz de crescer e apresentar boas produções de endoglucanase nos substratos bagaço de cana-de-açúcar e bagaço de sisal como fontes de carbono. Embora bastante alcalino, o bagaço de sisal apresentou-se como o melhor substrato para a produção de endoglucanase. A água de maceração de milho, utilizada como fonte de nitrogênio, foi o fator que mostrou maior influência na produção da enzima, apresentando efeito positivo, caracterizando-se como uma boa fonte de nitrogênio. Considerando o baixo custo dos substratos estudados, e os resultados obtidos para a produção de endoglucanase, pode-se afirmar que o isolado ARA-01 apresenta um bom potencial para o uso em processos biotecnológicos para a produção de enzimas de interesse industrial.

Agradecimentos

Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado da Bahia [FAPESB] e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico [MCT/CNPq], aos quais agradecemos.

Referências

- Barros, R.R.O., Oliveira, R.A., Gottschalk, L.M.F & Bom, P. S.(2010). Production of cellulolytic enzymes by fungi *Acrophialophora nainiana* and *Ceratocystis paradoxa* using different carbon sources. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 161, 448–454.
- Breccia JD, Castro, GR, Baigorl, MD & Sineriz F. (1995) Screening of xytanolytic bacteria using a colour plate method. *Journal of Applied Bacteriology*. 78 (5) 469–472.

- Chen W.P., Anderson, A.W. & Han, Y.W. (1979) Production of glucose isomerase by *Streptomyces flavogriseus*. *Applied Environmental Microbiology*. 37, 324–331.
- Cunha, F.M., Esperança, M.N., Zangirolami, T.C., Badino, A.C. & Farinas, C.S. (2012). Sequential solid-state and submerged cultivation of *Aspergillus niger* on sugarcane bagasse for the production of cellulose. *Bioresource Technology*. 112, 270–274.
- Da Vinha, F.N.M., Gravina-Oliveira, M.P., Franco, M.N., Macrae, A., Bon, E.P.S., Nascimento, R.P. & Coelho, R.R.R. (2011). Cellulase production by *Streptomyces viridobrunneus* SCPE-09 using lignocellulosic biomass as inducer substrate. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 164, 256-567.
- De Azeredo, L.A.I., De Lima, M.B., Coelho, R.R.R. & Freire, D.M.G. (2006). A low-cost fermentation medium for thermophilic protease production by *Streptomyces* sp 594 using feather meal and corn steep liquor. *Current Microbiology*. 53, 335–339.
- Delabona, P. S., Pirota, R. D. P. B., Codima, C. A., Tremacoldic, C. R., Rodrigues, A. & Farinas, C.S. (2013). Effect of initial moisture content on two Amazon rainforest *Aspergillus* strains cultivated on agro-industrial residues: biomass-degrading enzymes production and characterization. *Industrial Crops and Products*. 42, 236-242.
- Embrapa Algodão (2004). Embrapa apresenta sisal como suporte na alimentação de rebanho. Recuperado em julho de 2013 de <http://www.embrapa.br>.
- Faria, M.M.S., Jaeger, S.M.P.L., Oliveira, G.J.C., Ledo, C.A.S., Silva, A.M., Lopes, N.C.M. & Santana, F.S. (2008). Composição bromatológica do co-produto do desfibramento do sisal submetido à auto-fermentação. *Magistra*, 20 (1), 30-35.
- Fischer, J., Lopes, V.S., Queiroz, E.F.Q., Coutinho Filho, U. & Cardoso, V.L. (2014). Second generation ethanol production using crude enzyme complex produced by fungi collected in Brazilian Cerrado (Brazilian Savanna). *Chemical Engineering Transactions*, 38, 487-492.
- George, S.P., Ahmad, A. & Rao, M.B. (2001). Studies of carboxymethyl cellulose produced by alkalothermophilic actinobacteria. *Bioresource Technology*. 77, 171-175.
- Ghose, T.K. (1987). Measurements of cellulase activities. *Pure Applied Chemistry*, 59, 257-268.
- Grigorevski-Lima, A.L., Nascimento, R.P., Bom, E.P.S. & Coelho, R.R.R. (2005). *Streptomyces drozdowiczii* cellulase production using agro-industrial by-products and its potential use in the detergent and textile industries. *Enzyme and Microbial Technology*, 37, 272-277.
- Gomathi, D., Muthulakshmi, D., Guru Kumar, D., Ravikumar, G., Kalaiselvi M. (2012). Submerged fermentation of wheat bran by *Aspergillus flavus* for production and characterization of carboxyl methyl cellulase. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. S67-S73.
- Hideno, A., Inoue, H., Tsukahara, K., Yano, S., Fang, X., Endo, T. & Sawayama, S. (2011). Production and characterization of cellulases e hemicellulases by *Acremonium cellulolyticus* using rice straw subjected to various pretreatment as carbon source. *Enzyme and Microbial Technology*, .48, 162-168.
- Hopwood, D. A., Bibb, M. J., Chater, K. F., Kieser, T., Bruton, C.J., Kieser, H.M., Lydiate, D.J., Smith, C.P., Ward, J.M. & Schrempf, H. (1985). *Genetic Manipulation of Streptomyces: A Laboratory Manual*. Norwich, UK: The John Innes Institute.
- Jang, H.D. & Chen, K.S. (2003). Production and characterization of thermostable cellulases from *Streptomyces* transformant T3-1. *World Journal Microbiology and Biotechnology*, 19, 263-268.
- Kalogeris, E., Christakopoulos, P., Katapodis, P., Alexiou, A., Vlachou, S., Kekos, D. & Macris, B.J. (2003). Production and

- characterization of cellulolytic enzymes from thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus* under solid state cultivation of agricultural wastes. *Process Biochemistry*, 38, 1099-1104.
- Joseph, K., Tolêdo Filho, R.D., Sabu, B.J., James, B., Thomas, S. & Carvalho, L.H. (1999). A review on sisal fiber reinforced polymer composites. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 3 (3), 367-379.
- Macedo, E.P., Cerqueira, C.L.O., Souza, D.A.J., Bispo, A.S.R., Coelho, R.R.R. & Nascimento, R.P. (2013). Production of cellulose degrading enzyme on sisal and other agro-industrial residues using a new brazilian actinobacteria strain *Streptomyces* sp. SLBA-08. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 30 (4), 729-735.
- Maeda, R.N., Da Silva, M.M.P., Santa Anna, L.M.M. & Pereira, J.R.N. (2010). Nitrogen source optimization for cellulase production by *Penicillium funiculosum*, using a sequential experimental design methodology and the desirability function. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 161, 411-422.
- Maeda, R.N., Barcelos, C.A., Santa Anna, L.M.M. & Pereira Jr., N. (2013). Cellulase production by *Penicillium funiculosum* and its application in the hydrolysis of sugar cane bagasse for second generation ethanol production by fed batch operation. *Journal of Biotechnology*, 163, 38-44.
- Martin, A.R., Martins, M.A., Mattoso, L.H.C. & Silva, O.R.R.F. (2009). Caracterização química e estrutural de fibra de sisal da variedade *Agave sisalana*. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, 19 (1), 40-46.
- Megiatto Jr., J.D. (2006). *Fibras de sisal: estudo das propriedades e modificações químicas visando a aplicação em compostos de matriz fenólica* (267f.). Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, Instituto de Química, São Carlos, SP, Brasil.
- Miller, G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Analytical Chemistry* 31, 426-429.
- Mirza, M.A. & Mushtaq, T. (2006). Effect of supplementing different levels of corn steep liquor on the post-weaning growth performance of pak-karakul lambs. *Pakistan Veterinarian Journal*, 26 (3), 135-137.
- Nascimento, R.P., Junior, N.A., Pereira Jr., N., Bom, E.P.S. & Coelho, R.R.R. (2009). Brewer's spent grain and corn steep liquor as substrates for cellulolytic enzymes production by *Streptomyces malaysiensis*. *Letters in Applied Microbiology*, 48, 529-535.
- Pandey, A., Soccol, C.R., Nigam, P. & Soccol, V.T. (2000). Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. A review. *Bioresource Technology*, 74, 69-80.
- Parekh, M., Formanek, J. & Blaschek, H.P. (1999). Pilot-scale production of butanol by *Clostridium beijerinckii* BA 101 using a low-cost fermentation medium based on corn steep water. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51, 152-157.
- Pharazyn, A. & Nortey, T. *Corn steepwater/ liquor as a feed ingredient for swine. Nutrifax: nutrition News and Information Update*. Shur-Gain, Nutreco Canada Inc. Recuperado em 24 de outubro de 2013 de <http://www.wrightsfeeds.ca>.
- Salazar, V. L. P. & Leão, A. L. (2006). Biodegradação das fibras de coco e de sisal aplicadas na indústria automotiva. *Energia e Agricultura*, 21 (2), 99-133.
- Sazci, A., Radford, A. & Erenler, K. (1986). Detection of cellulolytic fungi by using Congo red as an indicator : a comparative study with the dinitrosalicylic acid reagent method. *Journal of Applied Bacteriology*, 61, 559-562.
- Semêdo, L. T. A. S., Gomes, R. C., Bon, E. P. S., Soares, R. M. A., Linhares, L. F. & Coelho, R. R. R. (2000). Endocellulases and exocellulases activities of two *Streptomyces* spp. isolated from a forest soil. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 84-86, 267-276.

Sindicato das Indústrias de Fibras Vegetais da Bahia (2007). Recuperado em agosto de 2013 de www.brazilsisal.com.

Sharma, M (2014). Actinomycetes: source, identification, and their applications. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 3 (2), 801-832, 2014.

Shirling, E.B. & Gottlieb, D. (1966). Methods for characterization of *Streptomyces* species. *International Journal of Systematic Bacteriolog.* 16 (3), 313-340.

Sukumaran, R.K., Singhania, R.R., Mathew, G.M. & Pandey, A. (2009). Cellulase production using biomass feed stock and its application in lignocellulose saccharification for bio-ethanol production. *Renewable Energy*. 34, 421–424.

Wilson, D.B. (2009). Cellulases e biofuels. *Current Opinion of Biotechnology*, 20, 295-299.

Xiao, X., Hou, Y., Du, J., Liu, Y., Dong, L., Liang, Q., Wang, Y., Bai, G. & Luo, G.(2012). Determination of main categories of components in corn steep liquor by near-infrared spectroscopy and partial least square regression. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 7830-7835.

Recebido em: 31/10/2013
Aceito em: 19/02/2015