

Anais do Simpósio Microrganismos em Agroenergia: da Prospecção aos Bioprocessos



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Agroenergia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Documentos 15

Anais do Simpósio Microrganismos em Agroenergia: da Prospecção aos Bioprocessos

João Ricardo Moreira de Almeida
Editor Técnico

Embrapa Agroenergia
Brasília, DF
2013

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Agroenergia

Parque Estação Biológica, PqEB s/n, Brasília, DF

Fone: (61) 3448-4246

Fax: (61) 3448-1589

www.cnpae.embrapa.br

sac@cnpae.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: *José Manuel Cabral de Sousa Dias*

Secretária-Executiva: *Lorena Costa Garcia*

Membros: *Eduardo Fernandes Formighieri, João Ricardo Moreira de Almeida, Larissa Andreani, Leonardo Fonseca Valadares, Maria Iara Pereira Machado.*

Supervisão editorial: *José Manuel Cabral de Sousa Dias*

Revisão de texto: *José Manuel Cabral de Sousa Dias*

Normalização bibliográfica: *Maria Iara Pereira Machado*

Editoração eletrônica: *Maria Goreti Braga dos Santos*

Ilustração da capa: *Maria Goreti Braga dos Santos*

1ª edição

1ª impressão (2013): 500 exemplares

Todos os direitos reservados

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Agroenergia

S 612 Simpósio Microrganismos em Agroenergia: da Prospecção aos Bioprocessos (2012 : Brasília, DF).

Anais / Simpósio Microrganismos em Agroenergia: da Prospecção aos Bioprocessos ; editor, João Ricardo Moreira de Almeida. Brasília, DF: Embrapa Agroenergia, 2013.

161 p. – (Documentos / Embrapa Agroenergia, ISSN 2177- 4439 ; 15)

1. Microrganismos - engenharia genética – bioprocessos. 2. Coleções microbianas - fungos filamentosos - leveduras – bactérias. 3. Bioprocessos – fermentação – bioetanol. 4. Bioprocessos - fermentação – biocombustíveis. 5. Enzimas - enzimas hidrolíticas - engenharia de enzimas - regulação da expressão gênica. 6. Seleção de microrganismos - seleção de enzimas. I. Almeida, João Ricardo Moreira de.

O papel dos fungos e dos actinomicetos na produção de etanol de biomassa lignocelulósica

Leda Maria Fortes Gottschalk

Rosalie Reed Rodrigues Coelho

Elba Pinto da Silva Bon

A biomassa lignocelulósica, a maior fonte de energia renovável disponível no planeta, é o principal constituinte da parede vegetal das células vegetais. Os principais componentes desse material são as macromoléculas celulose (38-50%), que é um polissacarídeo linear, a hemicelulose (23-32%), um polissacarídeo ramificado, e a lignina (15-30%), uma macromolécula aromática com estrutura tridimensional. Estes três componentes, organizados em estruturas supramoleculares bem definidas conferem à parede celular as características de alta resistência à biodegradação (SIERRA et al., 2008). A complexidade e recalcitrância da estrutura da biomassa são aumentadas pela presença de derivados do ácido cinâmico, como os ácidos ferúlico e cumárico, que são covalentemente ligados aos polissacarídeos (THIBAUT et al., 1998). O ácido ferúlico também é responsável pelas ligações covalentes entre a hemicelulose e a lignina influenciando as propriedades de extensibilidade, plasticidade e digestibilidade da biomassa (LYND et al., 2002). A completa degradação da biomassa requer um conjunto de enzimas com diferentes atividades, tais como celulases, hemicelulases, ligninases,

esterases e outras (BEG et al., 2001). Portanto, a produção de etanol a partir da biomassa lignocelulósica, que requer a desestruturação da mesma, depende de microrganismos capazes de produzir enzimas celulolíticas, hemicelulolíticas e acessórias com altos rendimentos.

As celulasas, conjunto de enzimas que degradam a celulose, são classificadas em três grupos: as endoglucanases (EG) (EC 3.2.1.4) que clivam internamente ligações glicosídicas β , 1-4 na fibra celulósica; as exoglucanases (CBH) (EC 3.2.1.91) que atuam progressivamente nas extremidades redutoras e não-redutoras da celulose liberando pequenos oligossacarídeos de celulose e principalmente celobiose; e as β -glucosidases (EC 3.2.1.21) que degradam a celobiose (dímero de glicose) até a glicose (LYND et al, 2002). Individualmente, uma única enzima do complexo celulolítico não é capaz de hidrolisar completamente a celulose a glicose, sendo necessária a ação sinérgica do complexo celulolítico (BÉGUIN & AUBERT, 1994). Na natureza os fungos desempenham papel central na degradação da biomassa vegetal (BRINK; DE VRIES, 2012).

Os fungos e a degradação da biomassa lignocelulósica

Os fungos filamentosos são considerados grandes degradadores de biomassa. Entre esses microrganismos destacam-se os fungos do gênero *Trichoderma* (MANDELS; STERNBERG, 1976; MARGEOT et al., 2009) que são os principais produtores comerciais das celulasas. O fungo *T. viride* (renomeado de *T. reesei*) foi isolado durante a Segunda Guerra Mundial (EVELEIGH et al., 1998), e a partir de então vários estudos de melhoramento genético resultaram na seleção de mutantes hipercelulolíticos. O mutante *Trichoderma reesei* RUT C30 é considerado um dos mais poderosos e melhor caracterizado, sendo referência entre os grandes produtores de celulase (LE CROM et al., 2009). Já foram identificadas dez celulasas no genoma do *T. reesei*,

sendo oito endoglucanases e duas celobiohidrolases (KUBICEK et al., 2009; FOREMAN et al., 2003), das quais as principais, CBHI, CBHII, EGI e EG II, são normalmente secretadas em quantidades notáveis por este fungo (FOREMAN et al., 2003; MARKOV et al., 2005). Quase todas as celulases têm uma estrutura de dois módulos, ou seja, consistem de um módulo catalítico e um módulo de ligação à celulose (CBM). As celulases que possuem CBM apresentam atividade muito maior em celulose cristalina do que aquelas que não possuem este módulo (GUSAKOV et al., 2007). Também já foram identificadas 12 β -glucosidases no genoma *T. reesei*, sendo a maioria intracelular (FOREMAN et al., 2003). As estirpes mutantes deste fungo têm sido geralmente caracterizadas por baixa secreção de β -glucosidase (NIEVES et al., 1998). Assim, as preparações enzimáticas de *T. reesei* devem ser complementadas com a adição de β -glucosidase para sacarificação mais eficiente dos substratos celulósicos (MERINO; CHERRY, 2007; NIEVES et al., 1998). Atualmente, preparações comerciais de celulase das principais empresas produtoras de enzimas, com estirpes geneticamente modificadas de *T. reesei*, têm apresentado elevada atividade de β -glucosidase, além de maior atividade específica e termoestabilidade (WILSON, 2009; NAKAMURA et al., 2008)

Além do *Trichoderma*, outros fungos têm demonstrado a capacidade de produzir complexos celulolíticos completos e em grandes quantidades sendo considerados promissores para produção de biocombustíveis de segunda geração (GUSAKOV, 2011).

Outro fungo muito estudado para a produção industrial de enzimas pertence ao gênero *Aspergillus*. Apesar deste fungo apresentar no genoma uma grande variedade de genes que codificam para endoglucanases e celobiohidrolases, o mesmo não foi considerado um substituto para o *T. reesei*. A maioria das pesquisas com *Aspergillus* tem avaliado o potencial para a produção de enzimas hemicelulolíticas, pectinolíticas e também de β -glucosidase e outras enzimas acessórias, tais como xilanases, xiloglucanases, feruloil esterases e α -L-arabinofuranosidases importantes para a completa

degradação da biomassa (GODFREY; WEST, 1996; BERLIN et al., 2005; DE VRIES; VISSER, 2001; GOTTSCHALK et al., 2010).

Várias espécies de fungos do gênero *Penicillium* tem também merecido atenção, pelo bom desempenho de preparações de celulases por ele produzidas (SKOMAROVSKY et al., 2005; MARTINS et al., 2007; SINGH et al., 2009; DE CASTRO et al., 2010), sendo a alta atividade de β -glicosidase uma das principais vantagens das espécies *Penicillium* em relação ao *T. reesei*. Além disso, outra razão para o desempenho superior desses fungos parece ser a elevada atividade específica das celobiohidrolases (CBHI). Adicionalmente, a CBHI de *Penicillium* é menos inibida pela celobiose quando comparada com a CBHI de *Trichoderma*. A razão para a insensibilidade relativa de CBHI ao produto de inibição parece dever-se à configuração mais aberta do seu sítio ativo (BHIRI et al., 2010).

A lignina é um dos constituintes majoritários da biomassa vegetal e desempenha papel negativo na hidrólise enzimática da madeira e resíduos agrícolas pela barreira natural que ela representa, encobrendo as fibras de celulose, e também à ligação das enzimas celulolíticas a essa macromolécula (BERLIN et al., 2005). Na hidrólise de materiais lignocelulósicos, as celulases de *Penicillium* têm a vantagem adicional de apresentarem afinidade reduzida pela lignina, sendo também menos suscetíveis à inibição por compostos derivados de lignina (BERLIN et al., 2006).

O fungo *Acremonium cellulolyticus* pode tornar-se uma alternativa potencial para o *T. reesei*. Estudos sugerem que o primeiro produz celulases com altos rendimentos e que as enzimas do *A. cellulolyticus* são também menos sensíveis a inibidores, tais como a lignina (IKEDA et al., 2007; FUJII et al., 2009).

Outro fungo, o *Chrysosporium lucknowense*, também vem demonstrado desempenho hidrolítico da celulose comparável com preparações de linhagens geneticamente modificadas de *T. reesei*. Aparentemente o genoma de *C. lucknowense* é mais rico em um

número total de celulasas e hemicelulasas do que é o genoma de *T. reesei* (GUSAKOV et al., 2007; HINZ et al., 2009).

O fungo *Humicola insolens* é também um produtor industrial de celulasas porém as suas enzimas celulolíticas têm sido utilizadas para outras aplicações, tais como na indústria têxtil, de detergentes e na fabricação de papel, com um rendimento de 50% na degradação da celulose cristalina (SCHÜLEIN, 1997; CAPARROS et al., 2012).

Os esforços para encontrar novos microrganismos produtores de celulasas e também de novas enzimas vêm resultando em misturas enzimáticas cada vez mais completas, mais ativas e com maior estabilidade para a produção de bioetanol. Muitos estudos tem foco na enzima chave para a degradação da celulose cristalina. Ao estimar o potencial do fungo produtor é necessário levar em conta não só a eficiência dos sistemas multienzimáticos secretados na sacarificação de substratos lignocelulósicos (por unidade de atividade de celulase ou por mg de proteína), mas também outros parâmetros importantes, tais como produtividade da cepa, concentração de proteína no final da fermentação e o custo de produção (GUSAKOV, 2011; BRINK; De VRIES, 2012).

Os actinomicetos e a degradação da biomassa lignocelulósica

Os actinomicetos, que são bactérias filamentosas Gram positivas, também são produtores de enzimas degradadoras de lignocelulose. Apesar de não serem tão eficientes quanto os fungos, podem ser promissores quando se pensa nas características das enzimas por eles produzidas, incluindo valores de pH e temperatura, na possibilidade de otimização de produção, na facilidade de produção em substratos de baixo custo, bem como, também, na possibilidade de clonagem dos genes de interesse.

Existem poucos trabalhos na literatura relatando a produção de celulasas e xilanases por actinomicetos, principalmente quando se trata do aproveitamento de resíduos agro-industriais. Assim sendo, surgiu o interesse de nosso grupo de pesquisa no isolamento de actinomicetos de solos e ambientes brasileiros, capazes de produzir enzimas lignocelulolíticas a partir de resíduos de baixo custo, visando à produção de etanol de segunda geração. A utilização de solos tropicais brasileiros apresenta uma vantagem adicional, visto serem solos pouco explorados, com chances de descoberta de novas espécies, e com possibilidade de novas características.

As primeiras estirpes promissoras foram isoladas de um solo da mata atlântica, o *Streptomyces* sp M7A e o M23 (SEMÊDO et al., 2001). As atividades de endocelulase e exocelulase foram determinadas utilizando-se um meio de cultura contendo celulose microcristalina juntamente com outros nutrientes ricos tais como extrato de levedura e proteose-peptona (SEMÊDO et al., 2000). A estirpe M7A foi identificada como uma espécie nova, *Streptomyces drozdowiczii*, (SEMÊDO et al., 2004), e posteriormente a produção de celulase também foi testada utilizando-se diversas fontes de carbono (C) e nitrogênio (N). Carboximetilcelulose (CMC), um produto comercial barato, obtido de cana de açúcar, e outros resíduos de baixo custo tais como farelo de trigo e DDG, foram testados como fonte de C, enquanto o extrato de levedura e a milhocina foram testados como fonte de N (LIMA et al., 2005). A milhocina é um subproduto do processamento do milho, e corresponde a água de embebedimento e lavagem dos grãos durante o fracionamento para a obtenção de amido e óleo. O sobrenadante obtido com o meio contendo extrato de levedura e CMC resultou nas maiores atividades de CMCase, porém, os outros meios testados usando os resíduos mais baratos, especialmente aqueles com milhocina como principal fonte de N foram promissores. Esse resultado foi bastante interessante sob o ponto de vista econômico, já que a milhocina foi capaz de substituir o extrato de levedura eficientemente.

Em outro procedimento, foi isolada de um solo sob vegetação de cerrado a estirpe AMT-3, identificada como *Streptomyces malaysiensis*. Essa estirpe se mostrou promissora inicialmente para a produção de endoxilânase em meio contendo xilana larchwood, extrato de levedura e triptona (NASCIMENTO et al., 2003). Mais tarde essa mesma estirpe foi testada em meio mineral contendo farelo de trigo, germe de trigo, dreche cervejeiro e sabugo de milho. Neste caso a atividade de endoxilânase foi bem mais baixa, porém ainda assim expressiva, considerando-se a natureza dos substratos utilizados (NASCIMENTO et al., 2002). A mesma estirpe também se mostrou excelente produtora de celulase quando crescida em solução mineral contendo o dreche e a milhocina como únicos nutrientes orgânicos (NASCIMENTO et al., 2009).

Ainda visando à produção de celulases utilizando substratos de baixo custo, foi feito um isolamento em solo de canavial, no nordeste brasileiro, com a seleção da estirpe *Streptomyces viridobrunneus SCPE-0* (DA VINHA et al., 2011). Por meio de um planejamento fatorial foi verificado que o meio contendo farelo de trigo 2% e milhocina 0,19% conduziu à melhor produção de CMCase, porém o uso de bagaço de cana como substrato também foi vantajoso. Quando se pensa em aplicações biotecnológicas para as celulases, a caracterização das mesmas deve ser considerada, especialmente o perfil de pH e temperatura, a termoestabilidade e a influência de íons metálicos. Em geral, as celulases e xilânases produzidas pelas actinobactérias isoladas de solos brasileiros aqui descritas apresentam atividade máxima entre 40 e 60°C, porém ainda são parcialmente ativas mesmo a 70°C (NASCIMENTO et al., 2002; LIMA et al., 2005; NASCIMENTO et al., 2009; DA VINHA et al., 2011), podendo suportar estas temperaturas por um certo período de tempo. As endoglucanases de *S. drozdowiczii*, por exemplo, são 100% ativas por 1 hora a 50°C, mantendo 40% de atividade mesmo após 2 horas nessa temperatura (LIMA et al., 2005). Estas enzimas também são relativamente ativas numa ampla faixa de pH, que varia de 2 a 10, com ótimos na faixa ácida (pH de 4, 5 ou 6). Elas também toleram

vários íons metálicos, porém o Fe, o Mn e o Cu são geralmente inibitórios para a atividade celulolítica, assim como o são para várias outras enzimas produzidas por diferentes microrganismos. Porém alguns outros íons podem ser muito úteis, aumentando a atividade enzimática em até duas ou mais vezes, como é o caso do Ba⁺² e Na⁺¹ para a endoglucanases de *S. drozdowiczii* (LIMA et al., 2005).

Em conclusão, os solos tropicais brasileiros são um ambiente rico para a procura de novas estirpes de actinomicetos com atividade enzimática de importância biotecnológica. Em especial a produção de enzimas degradadoras de lignocelulose, que podem ser úteis na produção de bioetanol. Apesar dos fungos serem considerados melhores produtores de celulasas do que as bactérias, os resultados aqui obtidos com essas bactérias tropicais mostraram a importância das mesmas. As estirpes foram capazes de produzir enzimas degradadoras de lignocelulose quando crescidas em substratos de baixo custo, com características que atingem os requisitos necessários para aplicações biotecnológicas, incluindo a produção de bioetanol de segunda geração.

Referências

BEG, Q. K.; KAPOOR, M.; MAHAJAN, L.; HOONDAL, G. S. Microbial xylanases and their industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 56, n. 3-4, p. 326-38., 2001.

BÉGUIN, P. E; AUBERT, J. P. The biological degradation of cellulose. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 13, n. 1, p. 25-58., 1994.

BERLIN, A.; GILKES, N.; KILBURN, D.; BURA, R.; MARKOV, A.; SKOMAROVSKY, A.; OKUNEV, O.; GUSAKOV, A.; MAXIMENKO, V.; GREGG, V.; SINITSYN, A.; SADDLER, J. Evaluation of novel fungal cellulase preparations for ability to hydrolyze softwood substrates – evidence for the role of accessory enzymes. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 37, n. 2, p. 175-184, 2005.

BERLIN, A.; BALAKSHIN, M.; GILKES, N.; KADLA, J.; MAXIMENKO, V.; KUBO, S.; SADDLER, J. Inhibition of cellulase, xylanase and b-glucosidase activities by softwood lignin preparations. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 125, n. 2, p. 198-209, 2006.

BHIRI, F.; GARGOURI, A.; BEN ALI, M.; BELGHITH, H.; BLIBECH, M.; CHAABOUNI, S. E. Molecular cloning, gene expression analysis and structural modeling of the cellobiohydrolase I from *Penicillium occitanis*. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 46, n. 2, p. 74–81, 2010.

BRINK, J. V. D.; DE VRIES, R. P. Fungal enzyme sets for plant polysaccharide degradation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 91, n. 6, p. 1477-1492, 2011.

CAPARROS, C.; LANT, N.; SMETS, J.; CAVACO-PAULO, A. Effects of adsorption properties and mechanical agitation of two detergent cellulases towards cotton cellulose. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 30, n. 2, p. 260-271, 2012.

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. Cellulase production by *Streptomyces viridobrunneus* SCPE-09 using lignocellulosic biomass as inducer substrate. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 164, n. 3, p. 256-267, 2011.

DE CASTRO, A. M.; DE CARVALHO, M. L. D.; LEITE, S. G. F.; PEREIRA, N. Cellulases from *Penicillium funiculosum*: production, properties and application to cellulose hydrolysis. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Houndmills, v. 37, n. 2, p. 151-158, 2010.

DE VRIES, R. P.; VISSER, J. *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. **Microb. Mol. Biol. Rev.**, v. 65, p. 497–522, 2001.

EVELEIGH, D.; MANDELS, M.; REESE, E. T. Structure, biochemistry, genetics and applications. In: CLAEYSSSENS, M.; NERINCKX, W.; PIENS, K., (Ed.). **Carbohydrates from *Trichoderma reesei* and other microorganisms**. [S.l.]: The Royal Society of Chemistry, 1998. p. xi–xiii.

FOREMAN, P. K.; BROWN, D.; DANKMEYER, L.; DEAN, R.; DIENER, S.; DUNN-COLEMAN, N. S.; GOEDEGEBUUR, F.; HOUFEK, T. D.; ENGLAND, G. J.; KELLEY, A. S.; MEERMAN, H. J.; MITCHELL, T.; MITCHINSON, C.; OLIVARES, H. A.; TEUNISSEN, P. J.; YAO, J.; WARD, M. Transcriptional regulation of biomassdegrading enzymes in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 278, n. 34, p. 31988-31997, 2003.

FUJII, T.; FANG, X.; INOUE, H.; MURAKAMI, K.; SAWAYAMA, S. Enzymatic hydrolyzing performance of *Acremonium cellulolyticus* and *Trichoderma reesei* against three lignocellulosic materials. **Biotechnology for Biofuels**, London, v. 2, n. 1, p. 24, 2009.

GODFREY, T.; WEST, S. (Ed.) **Industrial enzymology**. 2nd ed. [London]: Macmillan Press, 1996.

GOTTSCHALK, L. M. F.; OLIVEIRA, R. A.; BON, E. P. S. Cellulases, xylanases, β -glucosidase and ferulic acid esterase produced by *Trichoderma* and *Aspergillus* act synergistically in the hydrolysis of sugarcane bagasse. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 51, n. 1-2, p. 72-78, 2010.

GUSAKOV, A. V.; SALANOVICH, T. N.; ANTONOV, A. I.; USTINOV, B. B.; OKUNEV, O. N.; BURLINGAME, R.; EMALFARB, M.; BAEZ, M.; SINITSYN, A. P. Design of highly efficient cellulase mixtures for enzymatic hydrolysis of cellulose. **Biotechnology and bioengineering**, New York, v. 97, n. 5, p. 1028-1038, 2007.

GUSAKOV, A. V. Alternatives to *Trichoderma reesei* in biofuel production. **Trends in biotechnology**, London, v. 29, n. 9, p. 419-425, 2011.

HINZ, S. W. A.; POUVREAU, L.; JOOSTEN, R.; BARTELS, J.; JONATHAN, M. C.; WERY, J.; SCHOLS, H. A. Hemicellulase production in *Chrysosporium lucknowense* C1. **Journal of Cereal Science**, London, v. 50, n. 3, p. 318-323, 2009.

IKEDA, Y.; HAYASHI, H.; OKUDA, N.; PARK, E. Y. Efficient cellulase production by the filamentous fungus *Acremonium cellulolyticus*. **Biotechnology Progress**, New York, v. 23, n. 2, p. 333-338, 2007.

KUBICEK, C. P.; MIKUS, M.; SCHUSTER, A.; SCHMOLL, M.; SEIBOTH, B. Metabolic engineering strategies for the improvement of cellulase production by *Hypocrea jecorina*. **Biotechnology for biofuels**, London, v. 1, n. 2, p. 19, 2009.

LE CROM, S.; SCHACKWITZ, W.; PENNACCHIO, L.; MAGNUSON, J. K.; CULLEY, D. E.; COLLETT, J. R.; MARTIN, J.; DRUZHININA, I. S.; MATHIS, H.; MONOT, F.; SEIBOTH, B.; CHERRY, B.; REY, M.; BERKA, R.; KUBICEK, C. P.; BAKER, S. E.; MARGEOT, A. Tracking the roots of cellulase hyperproduction by the fungus *Trichoderma reesei* using massively parallel DNA sequencing. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, DC, v. 106, n. 38, p. 16151-16156, 2009.

LIMA, A. L. G.; NASCIMENTO, R. P.; BON, E. P. S.; COELHO, R. R. R. Cellulase activity produced by *Streptomyces drozdowiczii* using low cost agro-industrial by-products and tests for biotechnological application. **Enzyme and Microbial Technology**, Guildford, 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**, Washington, v. 66, p. 506-577, 2002.

MANDELS, M.; STERNBERG, D. Recent advances in cellulase technology. **Journal of fermentation technology**, Osaka, v. 54, n. 4, p. 267-286, 1976.

MARGEOT, A.; HAHN-HAGERDAL, B.; EDLUND, M.; SLADE, R.; MONOT, F. New improvements for lignocellulosic ethanol. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 20, n. 3, p. 372-380, 2009.

MARKOV, A.V.; KONDRATYEVA, E. G.; OKUNEV, O. N.; BEKKAREVICH, A. O.; SINITSYN, A. P. New effective method for analysis of the component composition of enzyme complexes from *Trichoderma reesei*. **Biochemistry (Moscow)**, v. 70, n. 6, p. 657-663, 2005.

MARTINS, L. F.; KOLLING, D.; CAMASSOLA, M.; DILLON, A. J. P.; RAMOS, L. P. Comparison of *Penicillium echinulatum* and *Trichoderma reesei* cellulases in relation to their activity against various cellulosic substrates. **Bioresource Technology**, Essex, v. 99, n. 5, p. 1417-1424, 2007.

MERINO, S. T.; CHERRY, J. Progress and challenges in enzyme development for biomass utilization. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, Berlin, v. 108, p. 95-120, 2007.

NAKAMURA, I.; MAKINO, A.; SUGIYAMA, J.; OHMAE, M.; KIMURA, S. Enzymatic activities of novel mutant endoglucanases carrying sequential active sites. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 43, n. 3, p. 226-231, 2008.

NASCIMENTO, R. P.; JUNIOR, N. A.; PEREIRA, J. R. N.; BON, E. P. S.; COELHO, R. R. R. Brewer's spent grain and corn steep liquor as substrates for cellulolytic enzymes production by *Streptomyces malaysiensis*. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 48, n. 5, p. 529-535, 2009.

NASCIMENTO, R. P.; COELHO, R. R. R.; MARQUES, S.; ALVES, L.; GÍRIO, F. M.; BON, E. P. S.; AMARAL-COLLAÇO, M. T. Production and partial characterization of xylanase from *Streptomyces* sp strain AMT-3 isolated from Brazilian cerrado soil. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 31, n. 4, p. 549-555, 2002.

NASCIMENTO, R. P.; MARQUES, S.; ALVES, L.; GÍRIO, F. M.; BON, E. P. S.; AMARAL-COLLAÇO, M. T.; SACRAMENTO, D. R.; BON, E. P. S.; COELHO, R. R. R. A novel strain of *Streptomyces malyaisiensis* isolated from Brazilian soil produces high endo-beta-1,4-xylanase tirtres. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 19, n. 9, p. 879-881, 2003.

NIEVES, R. A.; EHRMAN, C. I.; ADNEY, W. S.; ELANDER, R. T.; HIMMEL, M. E. Technical communication: survey and analysis of commercial cellulase preparations suitable for biomass conversion to ethanol. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, 14, n. 2, p. 301-304, 1998.

SCHÜLEIN, M. Enzymatic properties of cellulases from *Humicola insolens*. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 57, n. 1-3, p. 71-81, 1997.

SEMÊDO, L. T. A. S.; LINHARES, A. A.; GOMES, R. C.; MANFIO, G. P.; ALVIANO, C. S.; LINHARES, L. F.; COELHO, R. R. R. Isolation and characterization of actinomycetes from Brazilian tropical soils. **Microbiological Research**, Jena, v. 155, n. 4, p. 291-299, 2001.

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 Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 84-86, p. 267-276, 2000.

SEMÊDO, L.T.; GOMES, R. C.; LINHARES, A. A.; DUARTE, G. F.; NASCIMENTO, R. P.; ROSADO, A. S.; MARGIS-PINHEIRO, M.; MARGIS, R.; SILVA, K. R.; ALVIANO, C. S.; MANFIO, G. P.; SOARES, R. M.; LINHARES, L. F.; COELHO, R. R. *Streptomyces drozdowiczii* sp. nov., a novel cellulolytic streptomycete from soil in Brazil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 54, pt 4, p. 1323-1328, 2004.

SIERRA, R.; SMITH, A.; GRANDA, C.; HOLTZAPPLE, M. T. Producing fuels and chemicals from lignocellulosic biomass. **SBE Special Section - Biofuels**, p. S10-S18, 2008.

SINGH, R.; VARMA, A. J.; LAXMAN, R. S.; RAO, M. Hydrolysis of cellulose derived from steam exploded bagasse by *Penicillium cellulases*: comparison with commercial cellulase. **Bioresource Technology**, Barking, v. 100, n. 24, p. 6679-6681, 2009.

SKOMAROVSKY, A. A.; GUSAKOV, A. V.; OKUNEV, O. N.; SOLOV'EVA, I. V.; BUBNOVA, T. V.; KONDRAT'EVA, E. G.; SINITSYN, A. P. Studies of hydrolytic activity of enzyme preparations of *Penicillium* and *Trichoderma* fungi. **Applied Biochemistry and Microbiology**, New York, v. 41, n. 2, p. 182-184, 2005.

THIBAUT, T.; MICARD, V.; RENARD, C.; ASTHER, M.; DELATTRE, M.; LESAGE-MEESSEN, L.; FAULDS, C.; KROON, P.; WILLIAMSON, G.; DUARTE, J.; DUARTE, J. C.; CECCALDI, B. C.; TUOHY, M.; COUTEAU, D.; VAN HULLE, S.; HELDT-HANSEN, H.-P. Fungal bioconversion of agricultural by products to vanillin. **LWT - Food Science and Technology**, Geneve, v. 31, p. 530-536, 1998.

WILSON, D. B. Cellulases and biofuels. **Current opinion in biotechnology**, London, v. 20, n. 3, p. 295-299. 2009.