

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

LUANA MARIA CAVALCANTI TEIXEIRA

**ESTUDO DE ENDOGLUCANASE TERMOESTÁVEL EXCRETADA DE
*Streptomyces capoamus***

**Recife
2018**

LUANA MARIA CAVALCANTI TEIXEIRA

**ESTUDO DE ENDOGLUCANASE TERMOESTÁVEL EXCRETADA DE
*Streptomyces capoamus***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração Biotecnologia, da Universidade Federal de Pernambuco como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Leonor Alves de Oliveira da Silva

**Recife
2018**

Catálogo na fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia - CRB-4/1788

Teixeira, Luana Maria Cavalcanti

Estudo de endonuclease termoestável excretada de *Streptomyces capoamus* / Luana Maria Cavalcanti Teixeira. – 2018.

64 f. : il.

Orientadora: Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho.

Coorientadora: Leonor Alves de Oliveira da Silva.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Recife, 2018.

Inclui referências e anexos.

1. Enzimas 2. Bactérias I. Coelho, Luana Cassandra Breitenbach Barroso (orientadora) II. Silva, Leonor Alves de Oliveira da (coorientadora) III. Título.

572.6

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2018 - 113

Luana Maria Cavalcanti Teixeira

**ESTUDO DE ENDOGLUCANASE TERMOESTÁVEL EXCRETADA DE
*STREPTOMYCES CAPOAMUS***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração Biotecnologia, da Universidade Federal de Pernambuco como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 26/02/2018

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof^ª. Dr^ª. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho (Departamento de Bioquímica– UFPE)

Prof^ª. Dr^ª. Patricia Maria Guedes Paiva (Departamento de Bioquímica – UFPE)

Prof^ª. Dr^ª. Norma Gusmão (Departamento de Antibióticos – UFPE)

*As oportunidades aproveitadas são
consequência das mentes brilhantes.*

Autor: desconhecido

AGRADECIMENTOS

A **Deus** nosso pai que tem me acompanhado sempre e me guiado em todas as conquistas e realizações.

À **minha família** que contribuiu com toda minha formação e estrutura.

A **Thiago Lins**, pelo seu amor, carinho, atenção e dedicação. Meu amor obrigado por ter me acompanhado e estado sempre presente com paciência e compreensão nesses últimos meses que precederam essa etapa final de defesa de dissertação.

Á **Prof.^a. Dr.^a. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho** pela orientação neste trabalho e pela oportunidade de poder realizar meu mestrado e participar de um grupo de pesquisa tão unido.

À **Prof.^a. Dr.^a. Leonor Alves de Oliveira da Silva** pela dedicada coorientadora que tem sido, sempre zelosa buscando soluções e planejando metas a serem atingidas para que o trabalho de todos dê certo.

Á **Prof.^a. Dr.^a. Norma Gusmão** por também fazer parte da parceria junto da Prof.^a Luana e Leonor. Obrigado por contribuir na minha caminhada ao mesmo tempo com muita doçura e colo maternal.

Á **Prof.^a Dr.^a Ranilson de Souza Bezerra** e à **Prof.^a. Dr.^a Maria Teresa dos Santos Correa**, coordenador e vice-coordenadora, respectivamente do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas pela atenção prestada a seus alunos de pós-graduação.

À **Adenilda Eugênia de Lima**, secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas por ser prestativa, atenciosa e eficaz sempre que solicitada.

Aos **meus colegas de trabalho do LAMAI** pela contribuição, companheirismo e atenção em nosso dia-a-dia repleto de afazeres.

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE)
pela
concessão da bolsa de estudos e auxílio financeiro.

RESUMO

As actinobactérias são um dos grupos de bactérias mais diversificados na natureza apresentando características anaeróbicas, aeróbicas, filamentosas e linhagens geradoras de esporos que possui alta importância biomédica e industrial. Dentre elas, o gênero *Streptomyces* se destaca pela produção de uma gama de celulases como exoglucanase, endoglucanase, β -glucosidase e celobiohidrolase. A partir da atividade dos seus constituintes, a celulase promove a hidrolisação da biomassa lignocelulósica produzindo moléculas menores de açúcares que são utilizados para processos bioquímicos como fabricação de biodiesel, produção de laticínios, cerveja, xaropes, entre outros, obtendo-se produtos de degradação de elevado interesse industrial. Nesse contexto, este trabalho objetivou a obtenção de um complexo enzimático produzido por *Streptomyces capoamus* capaz de degradar a celulose de maneira eficaz para posterior purificação e elucidação de suas propriedades físico-químicas a fim encontrar uma aplicação industrial relevante. Para tal, foram utilizadas da actino da actinobactéria, obtidas da coleção de culturas do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (DANTI-UFPE) incubadas a 37°C, por 7 dias sob agitação de 150 rpm obtendo-se assim o extrato bruto enzimático que foi liofilizado por processo de *freeze-drying*. Sua atividade enzimática foi avaliada utilizando como substrato carboximetilcelulose 1% (p/v) em pH 5,6 a 50 mM a 60 °C e as proteínas foram quantificadas pelo método de Bradford obtendo-se um rendimento de 0,03376 mg/mL. A fim de purificar o extrato bruto foram realizadas cromatografia de troca iônica verificando-se um pico principal com atividade de 50,6309 U/mL e purificação de 1,65 vezes e cromatografia de exclusão molecular obtendo-se um pool de 12 amostras no mesmo pico demonstrando que são de mesma massa molecular. Foi realizada eletroforese em gel de poliacrilamida – sulfato sódico de dodecila (SDS-PAGE) a fim estimar a massa molecular da enzima estando próxima de 97,4 kDa. Em seguida, a temperatura e valores de pH ótimos foram determinados mostrando que a enzima apresenta atividade maior que 50% nas faixas de pH entre 3 e 4 e entre 6 e 7. A temperatura ótima foi de 65 °C demonstrando atividade maior que 50% entre 30 e 60 °C. Os parâmetros cinéticos foram calculados e a enzima mostra atividade de acordo com a constante de Michaelis-Menten. Visando uma aplicação industrial, a sua compatibilidade com detergentes foi avaliada

incubando-se a enzima com 4 marcas diferentes e mensurando-se sua atividade que demonstrou ser totalmente compatível e ativa nas marcas testadas: Ala (100%), Guarani (91,4 %), Class (57,2%) e Omo (48,2%) todas em relação ao controle sem detergentes (68,2 %). Sendo assim, os resultados mostram que as celulases obtidas de *S. capoamus* mostraram-se muito promissoras pois apresentaram termoestabilidade notável e versatilidade de valores de pH. Além disso apresentaram constante estabilidade em sua atividade mantendo-se ativa mesmo em condições desnaturantes. Esses achados fazem a enzima ganhar importância para futuras aplicações industriais.

Palavras-chave: Actinobactérias. Enzimas. Celulase. Atividade Celulolítica.

ABSTRACT

Actinobacteria are one of the most diversified bacteria groups in the wild with anaerobic, aerobic, filamentous and spore-forming lineages with highlighted biomedical and industrial importance. Among them, the genus *Streptomyces* stands out for the production of a range of cellulases like exoglucanase, endoglucanase, β -glucosidase and cellobiohidrolase. From the activity of its constituents, cellulase promotes the ligninocellulosic biomass hydrolysis producing smaller sugar molecules used for biochemical processes like biodiesel production, dairy production, beer, syrups, among others, obtaining degradation products of high industrial interest. In this context, this work aimed to obtain an enzymatic complex produced by *Streptomyces capoamus* capable of degrading the cellulose in an efficient manner for further purification and elucidation of its physicochemical properties in order to find a relevant industrial application. For this purpose, actinobacteria samples were obtained from the Antibiotics Department culture collection of the Federal University of Pernambuco (DANTI-UFPE) and incubated at 37 ° C for 7 days under 150 rpm agitation, obtaining crude enzymatic extract which was freeze-dried liophilized. Its enzymatic activity was evaluated using 1% (w/v) carboxymethylcellulose at pH 5.6 to 50 mM at 60 °C and the proteins were quantified by the Bradford method resulting in a 0.03376 mg / ml yield. In order to purify the crude extract, ion exchange chromatography was performed, with a main peak with activity of 50.6309 U / mL and purification of 1.65 folds and molecular exclusion chromatography obtaining a pool of 12 samples in the same peak showing that they presented the same molecular mass. Polyacrylamide gel electrophoresis containing sodium dodecyl sulfate (SDS-PAGE) was performed to estimate the enzyme molecular mass being approximately 97.4 kDa. Then, the optimum pH and temperature were determined showing enzyme activity greater than 50% in the pH ranges between 3 and 4 and between 6 and 7. The optimum temperature was 65 °C, showing activity greater than 50% between 30 and 60 °C. The kinetic parameters were calculated and the enzyme showed activity according to the Michaelis-Menten constant. Aiming for an industrial application, its compatibility with detergents was evaluated by incubating the enzyme with four different brands and measuring its activity, which was fully compatible and active in the tested brands: Ala (100%), Guarani (91.4%), Class (57.2%) and Omo

(48.2%) all compared to the control without detergents (68.2%). Thus, the results show that the cellulases obtained from *S. capoamus* were very promising since they presented remarkable thermostability and pH versatility. In addition, they showed constant stability in their activity, remaining active even in denaturing conditions. These findings make the enzyme gain importance for future industrial applications.

Keywords: Actinobacteria. Enzymes. Cellulase. Cellulolytic Activity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Referencial Teórico

Figura 1 – Morfologias características do gênero <i>Streptomyces</i> . A: Forma filamento espiralizado ;B: filamentosos ; C: forma cocóide espiralizado e D: forma cocoide filamentado . Microscopia eletrônica de varredura.....	20
Figura 2 – Micromorfologia de <i>Nocardia</i> spp. As hifas de emaranham em finos filamentos se fragmentando e formas filamentosa, bacilares ou cocobacilares.....	21
Figura 3 – Micromorfologia de <i>Streptomyces</i> spp. As hifas são retas e onduladas com fragmentos ou não de formas cocoide e cocobacilares.	21
Figura 4 – Estrutura química da celulose.....	25
Figura 5 – Sistema enzimático envolvido na degradação da celulose.....	26
Figura 6 – Tipos de atividade enzimática característicos das celulases.	27
Figura 7 – Exemplo de coluna cromatográfica.	30

Resultados: ARTIGO 1

Figura 1 – Ion exchange chromatography of <i>S. capoamus</i> cellulases.	40
Figura 2 – Sephadex G-75 gel filtration of <i>S. capoamus</i> cellulases.	41
Figura 3 – SDS-PAGE (12% w/v) of <i>S. capoamus</i> purified cellulases A and B.....	42
Figura 4 – Influence of pH values on <i>S. capoamus</i> cellulases activity.....	43
Figura 5 - Thermal stability of <i>S. capoamus</i> cellulases.	43
Figura 6 – Thermal stability of <i>S. capoamus</i> purified cellulases.....	44
Figura 7 – Determination of K_m and V_{max} for <i>S. capoamus</i> purified cellulases through Michaelis-Menten kinetics.	45
Figura 8 – Detergent compatibility of purified <i>S. capoamus</i> cellulases.	46

LISTA DE TABELAS

Referencial Teórico

Tabela 1 – Principais substâncias usados na medicina produzidas por espécies de <i>Streptomyces</i>	22
Tabela 2 – Principais usos das celulasas na indústria e seus respectivos microrganismos produtores.....	29

Resultados: ARTIGO 1

Tabela 1 – Purificação das celulasas de <i>S. capoamus</i>	40
--	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
1.1	JUSTIFICATIVAS	16
1.2	OBJETIVOS	18
1.2.1	Objetivo Geral.....	18
1.2.2	Objetivos Específicos	18
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	19
2.1	MICROORGANISMOS PRODUTORES DE CELULASE.....	19
2.2	ACTINOBACTÉRIAS E GÊNERO STREPTOMYCES	20
2.3	ESPÉCIE STREPTOMYCES CAPOAMUS	23
2.4	ENZIMAS.....	23
2.4.1	Hidrolases	24
2.4.2	Celulases.....	25
2.4.2.1	Importância Industrial das Celulases	28
2.5	MÉTODOS DE PURIFICAÇÃO DE ENZIMAS	30
2.6	FATORES QUE INFLUENCIAM NA VELOCIDADE DAS REAÇÕES	30
2.6.1	pH e Temperatura.....	30
2.6.2	Inibição Enzimática	31
3	RESULTADOS	33
3.1	ARTIGO 1	33
4	CONCLUSÃO.....	50
	REFERÊNCIAS	51
	ANEXO A – COMPROVANTES DE SUBMISSÃO DO ARTIGO NA REVISTA ELECTRONIC JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY (ISSN: 0717-3458).....	56
	ANEXO B – REGRAS DE SUBMISSÃO DA REVISTA ELECTRONIC JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY (ISSN: 0717- 3458)	58

1 INTRODUÇÃO

Actinomicetos são bactérias filamentosas gram positivas, pertencentes ao filo Actinobacteria, com um DNA rico em guanina e citosina, capazes de formar hifas em alguns estágios de seu desenvolvimento (CARVALHO et al., 2012). Caracterizam-se pela sua diversidade morfológica e de metabólitos. Conhecidas por sua capacidade de produzir antibióticos, também produzem pigmentos, compostos terpenóides e enzimas extracelulares, por exemplo, as celulases, que hidrolisam celulose e hemicelulose. A produção de celulases também pode ser conhecida quando falamos do gênero *Streptomyces* a qual é citada em trabalhos que evidenciam a produção de metabólitos com atividade enzimática (LI; GAO, 1997; SARATALE, G. D.; SARATALE, R. G.; OH, 2012).

As celulases são enzimas que clivam as ligações glicosídicas $\beta 1 \rightarrow 4$ doS polímeros da celulose. Elas podem ser produzidas por plantas, participando da formação e remodelamento da parede celular, e por bactérias, leveduras e fungos filamentosos, com intuito de despolimerizar a cadeia de celulose, afim de obter a ciclagem da matéria orgânica ou produtos com alto valor agregados para serem usados na indústria. As celulases são de vários tipos e elas atuam sinergicamente para a hidrólise da celulose. As endoglucanases clivam regiões internas da cadeia, liberando cadeias menores (GOMEZ; STEELE-KING; MCQUEEN-MASON, 2008). Ao longo dos anos, um grande número de microrganismos incluindo bactérias, leveduras e fungos filamentosos têm sido usados para produção de celulase. Essas enzimas constituem um complexo capaz de atuar sobre materiais celulósicos, promovendo sua hidrólise, são biocatalisadores altamente específicos que atuam em sinergia para a liberação de açúcares, dos quais glicose é o que desperta maior interesse industrial, devido à possibilidade de sua conversão em etanol (LYND *et al.*, 2002).

As celulases têm uma gama de aplicações industriais, como na indústria alimentícia para produção de sucos de fruta, vinho e café; na indústria têxtil para processamento das fibras de algodão, finalização do produto e em detergentes para lavagem; na indústria de papel e polpa para descoloração e modificação das fibras; na indústria de ração animal para melhorar a digestibilidade de produtos derivados de plantas, entre outros (JUTURU; WU, 2014; SINGH, R. *et al.*, 2016).

A tecnologia enzimática é, atualmente, um dos campos mais promissores dentro das tecnologias para a síntese de compostos de alto valor agregado. O elevado custo de celulase é o principal obstáculo à utilização de biomassa celulósica. Portanto, pesquisas estão sendo desenvolvidas visando à produção de celulases com elevada atividade enzimática e estabilidade (SINGHANIA *et al.*, 2010). A aplicação das enzimas depende do seu grau de pureza; portanto, a purificação é uma etapa importante para o estudo das propriedades biológicas e moleculares desses biocatalisadores. Atualmente, o processo de separação e purificação de bioprodutos é um segmento muito importante na indústria, pois pode chegar a representar de 80 a 90% do custo de produção; o desenvolvimento de um processo eficiente e de baixo custo é de extrema relevância (BASSANI *et al.*, 2010).

1.1 JUSTIFICATIVAS

Por sua alta especificidade e promover reações rápidas e eficientes, além de ter uma alta aplicabilidade no mercado econômico industrial, as enzimas são amplamente estudadas para descobrir novas aplicações. Os microrganismos vem demonstrado serem eficientes produtores de uma ampla gama de enzimas naturais e eficientes, abrindo mercado para o melhoramento biotecnológico pesquisas são aplicadas, visando descobrir as aplicabilidades dessas enzimas e demonstrando um valor comercial para serem utilizadas nas diversas vertentes do mercado industrial. Pela facilidade de seu cultivo e também por mudar informações genéticas para otimização de produção de enzimas é necessário saber qual o conjunto específico de condições para uma função eficiente. Essas condições incluem temperatura ideal, pH, concentração de substrato etc. (SILVA, J. C. D. A., 2011). A celulase é uma das moléculas mais abundantes no planeta e atuam na degradação da celulose que é um dos constituintes da parede celular das plantas, e por atuar nesse material facilitando sua degradação torna-se uma molécula de alta relevância econômica, ambiental e industrial. As celulasas que trabalham na degradação desse material são uma fonte de grande importância industrial, visto que, a maioria dos produtos são constituídos primariamente de materiais lignocelulósicos precisando de celulasas eficientes que atuem no processo de degradação. São vários os âmbitos da indústria que utilizam as celulasas para degradação da matéria orgânica assim como no melhoramento de alguns produtos visando a garantia de qualidade. Elas estão inseridas na indústria alimentar humana e animal, na indústria têxtil, na remoção de biofilme bacteriano assim como na produção de detergente como outros produtos conhecidos no mercado (JUTURU; WU, 2014; SINGH, R. *et al.*, 2016).

Desse modo, é essencial ensaios enzimáticos para estudo e principalmente para conhecer com especificidade as enzimas estudadas. Esse conhecimento é necessário para padronizar as técnicas de utilização das enzimas, assim também obter enzimas mais eficientes, produtivas e com um maior grau de especificidade. Saber as condições definidas como temperatura, o pH entre outras características facilita a aplicação dessas enzimas no setor industrial de modo confiável (BISSWANGER, 2014).

O desenvolvimento desta pesquisa visa estudar uma celulase: a endoglucanase que participa de uma cadeia de processos de alta escala industrial para desenvolvimento de

novas tecnologias objetivando caracterizar e oferecer informações de enzimas a qual possa ser usada na produção industrial e que tenha baixo custo de manutenção, a partir do isolamento de microrganismos produtores. Isso é de grande interesse econômico e com alta aplicabilidade no mercado, vindo a contribuir positivamente no desenvolvimento de técnicas de purificação, caracterização, produção e aplicação prática dessas enzimas.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

- Purificar e caracterizar parcialmente a endoglucanase termoestável produzida por *Streptomyces capoamus*.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Aplicar diferentes métodos de pré-purificação.
- Purificar parcialmente endoglucanase termoestável.
- Caracterizar físico-quimicamente a enzima parcialmente purificada.
- Determinar os parâmetros cinéticos K_m e V_{max}
- Avaliar a estabilidade para a indústria de detergentes

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 MICRORGANISMOS PRODUTORES DE CELULASE

Diversos microrganismos como bactérias actinomicetos e fungos são frequentemente documentados como novas fontes de produção de celulases e hemicelulases (RAI; KAUR; CHADHA, 2016).

Tanto bactérias quanto fungos podem produzir celulases que hidrolisam materiais lignocelulósicos. Estes microrganismos podem ser aeróbicos ou anaeróbicos, mesofílicos ou termofílicos. Bactérias pertencentes aos gêneros *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Bacillus*, *Thermomonospora*, *Ruminococcus*, *Bacteriodes*, *Erwinia*, *Acetovibrio*, *Microbispora*, e *Streptomyces* podem produzir celulases. *Cellulomonas fimi* e *Thermomonospora fusca* tem sido extensivamente estudadas pela sua capacidade em produzir celulases. Embora muitas bactérias celulolíticas, particularmente as aneróbicas, como o *Clostridium thermocellum* e *Bacteroides cellulosvens* produzam celulases com alta atividade específica, porém, elas não produzem grande quantidade de enzimas. Por causa do crescimento lento dos aneróbios e por requererem condições de crescimentos especiais, muitas pesquisas para produção de celulases comerciais tem focado em fungos como *Sclerotium rolfii*, *Phanerochaete chysporium* e espécies de *Trichoderma*, *Aspergillus Schizophyllum* e *Penicilium* (JUTURU; WU, 2014; SUN; CHENG, 2002) . De todos esses gêneros de fungos, *Trichoderma* principalmente o *Trichoderma reesei* tem sido mais extensivamente estudado (SUN; CHENG, 2002) além do *Aspergillus niger* (XUE *et al.*, 2017).

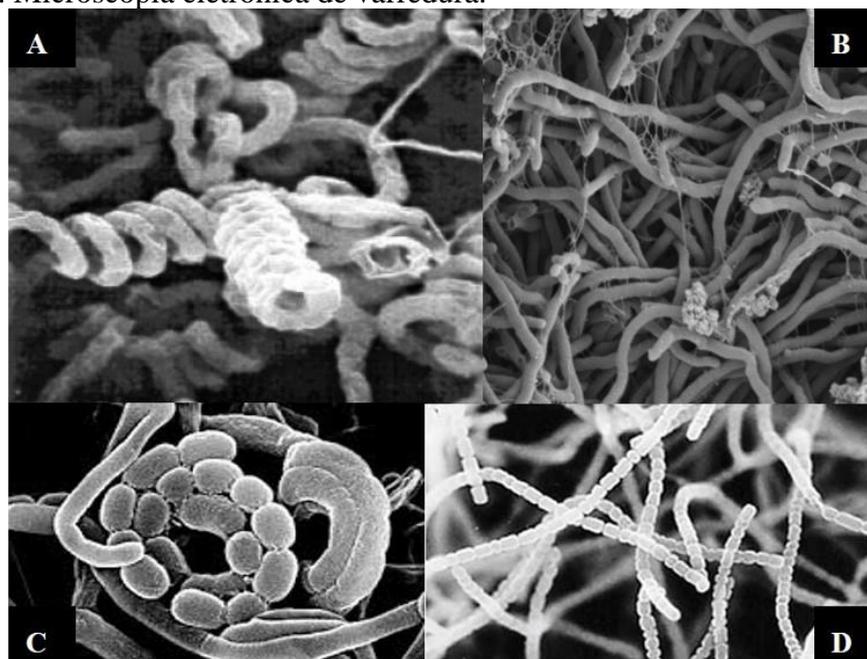
É conhecida uma grande gama de descobertas ligada aos compostos produzidos por actinobacterias (SEIPKE; KALTENPOTH; HUTCHINGS, 2012). Desde a fabricação de antibióticos até enzimas com valor ambiental para degradação da matéria orgânica podendo ser isoladas de diferentes locais como ambientes marinhos (BULL; STACH, 2007) e ambientes áridos (LOPES E OLIVEIRA *et al.*, 2016). Estudos demonstram que há várias décadas seus metabolitos secundários bioativos tem grande importância biotecnológica (BALLAV; DASTAGER; KERKAR, 2012).

2.2 ACTINOBACTÉRIAS E GÊNERO STREPTOMYCES

Dentre as bactérias, mais de 500 espécies de *Streptomyces* têm sido descritas na literatura. Dentre elas as *Streptomyces sp.* são amplamente reconhecidas por sua importância industrial principalmente pela sua habilidade de elaborar diferentes tipos de novos metabólitos secundários sendo considerados a mais abundante fonte natural de antibióticos e outros metabólitos secundários bioativos sendo de grande interesse também na medicina (ATTA, 2015; VENTURA *et al.*, 2007).

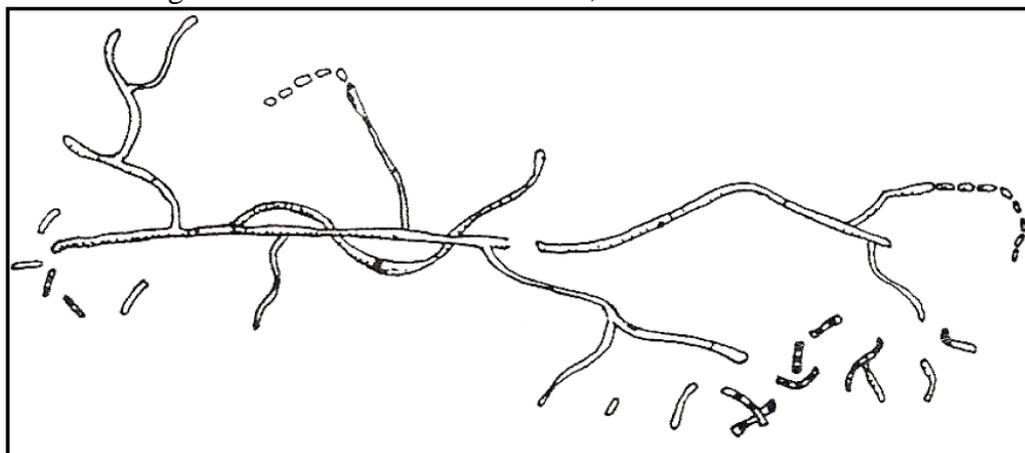
As actinobactérias exibem uma vasta variedade de morfologias indo de cocóides (*Micrococcus*) ou coco-bacilares (*Arthrobacter*) até formas hifais fragmentadas (*Nocardia spp.*) ou de micélio permanente e altamente diferenciado (*Streptomyces spp.*) (Figura 1). Além disso, diversos comportamentos são encontrados entre as actinobactérias incluindo patógenos (*Mycobacterium spp.*, *Nocardia spp.*, *Tropheryma spp.*, *Corynebacterium spp.* e *Propionibacterium spp.*), habitantes do solo (*Streptomyces spp.*), comensais de plantas (*Leifsonia spp.*), simbioses fixadores de nitrogênio (*Frankia*) e habitantes do trato gastrointestinal (*Bifidobacterium spp.*) (VENTURA *et al.*, 2007).

Figura 1 – Morfologias características do gênero *Streptomyces*. A: Forma filamento espiralizado; B: filamentosos ; C: forma cocóide espiralizado e D: forma cocoide filamentado . Microscopia eletrônica de varredura.



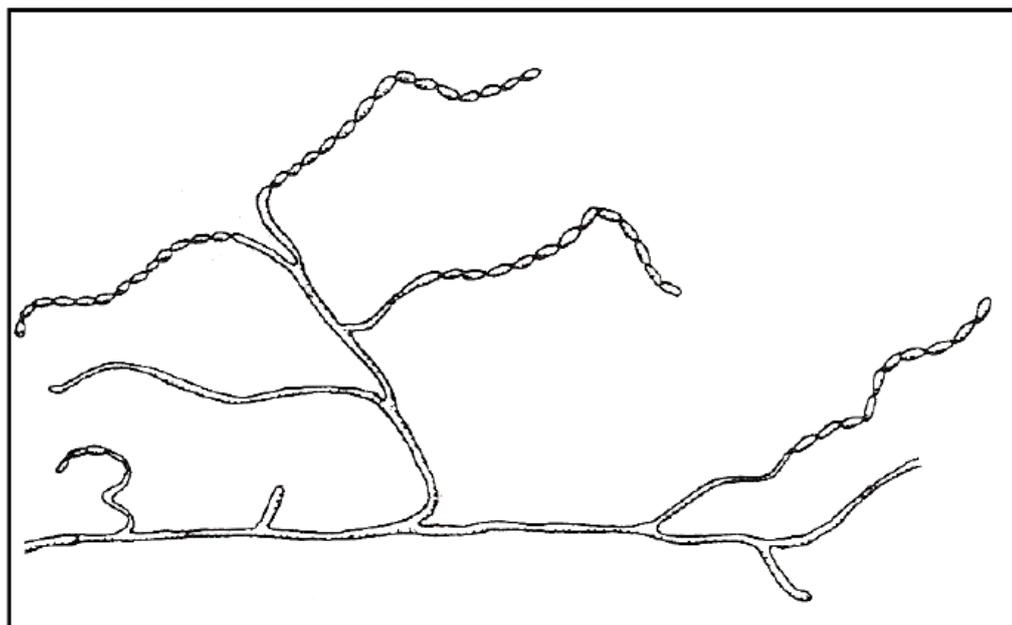
Fonte: Google Imagens.

Figura 2 – Micromorfologia de *Nocardia* spp. As hifas de emaranham em finos filamentos se fragmentando e formas filamentosa, bacilares ou cocobacilares.



Fonte: LARONE, 1993

Figura 3 – Micromorfologia de *Streptomyces* spp. As hifas são retas e onduladas com fragmentos ou não de formas cocoide e cocobacilares.



Fonte: LARONE, 1993.

As actinobactérias são amplamente distribuídas em ecossistemas terrestres e aquáticos (incluindo marinho) especialmente no solo, onde eles desempenham um papel crucial na reciclagem de biomateriais refratários pela decomposição e formação de húmus sendo responsáveis pelo ciclo do carbono em restos orgânicos insolúveis, especialmente de plantas e fungos através da produção de diversas exoenzimas hidrolíticas.(VENTURA *et al.*, 2007).

Essas actinobactérias secretarem enzimas que quebram os polímeros orgânicos insolúveis, incluindo a quitina e a celulose, em açúcares substituintes para ligação e absorção por múltiplos transportadores. Os compostos bioativos produzidos por *Streptomyces spp.* são classificados como metabólitos secundários, que podem ser utilizados como agente biológicos para o controle de doenças em plantas e sementes. (PRIYADHARSINI; DHANASEKARAN, 2015)

Várias substâncias antimicrobianas produzidas por *Streptomyces sp.* tem sido isoladas e caracterizadas como aminoglicosídeos, antraciclina, glicopeptídeos, β -lactamases, macrolídeos, nucleosídeos, peptídeos, polienos, poliésteres, policetideos, actinoeicinas e tetraciclina (FOLASADE, 2016) (Tabela 1).

Tabela 1 – Principais substâncias usados na medicina produzidas por espécies de *Streptomyces*.

Antifúngicos	Inmunosupresores	Antibacterianos
Nistatina (<i>S. noursei</i>) Anfotericina (<i>S. nodosus</i>) Pimaricina (<i>S. natalensis</i>)	Tacrolimus (<i>S. tsukubaensis</i>) Sirolimus (<i>S. hygrosopicus</i>)	Eritromicina (<i>S. erythreus</i>) Espiramicina (<i>S. ambofacies</i>) Neomicina (<i>S. fradiae</i>) Estreptomicina (<i>S. griseus</i>) Tetraciclina (<i>S. rimosus</i>) Vancomicina (<i>S. orientalis</i>) Rifamicina (<i>S. mediterranei</i>) Cloranfenicol (<i>S. venezuelae</i>) Daptomicina (<i>S. roseosporus</i>)

Fonte: Disponível em: <https://pt.scribd.com/doc/31341023/Streptomyces-sp>. Acesso em: 19 de fev. 2018.

Além disso muitas actinobactérias são usadas como ingredientes bioativos em uma variedade de alimentos funcionais a fim de promover propriedades probióticas e saudáveis como a proteção contra patógenos mediada pelo processo de exclusão competitiva, atividade de hidrólise de sais biliares, modulação imune e a habilidade de aderir à mucosa ou epitélio intestinal (VENTURA *et al.*, 2007) e até mesmo secretarem enzimas que quebram os polímeros orgânicos insolúveis, incluindo a quitina e a celulose, em açúcares substituintes para ligação e absorção por múltiplos transportadores (SEIPKE; KALTENPOTH; HUTCHINGS, 2012).

2.3 ESPÉCIE *STREPTOMYCES CAPOAMUS*

Streptomyces capoamus insere-se nas características gerais das espécies de *Streptomyces spp.*. Apresentam características comuns de desenvolvimento que são demonstradas por muitos gêneros de actinobactérias, como a maioria das *Streptomyces* apresentando formação de micélio aéreo esporulante, persistente ou não-replicativo exibido por algumas micobactérias. (VENTURA *et al.*, 2007).

Há relatos que uma espécie de *S. capoamus*, a MTCC 8123 produziu um metabólito secundário intracelularmente que após extração e purificação por métodos cromatográficos, foi testado contra vários organismos multirresistente à drogas demonstrando forte atividade antifúngica e antibacteriana (SINGH, V.; TRIPATHI; BIHARI, 2008).

A produção de metabólitos antibacterianos como ciclamicina também pôde ser observada em crescente atividade antibiótica tanto intra como extracelularmente durante o crescimento do microrganismo nas condições de cultura utilizadas (MARTINS; SOUTO-MAIOR, 2003).

Além de antibacterianos, outros metabólitos bioativos também podem ser produzidos. É o caso das endoglucanases. Em condições de cultura ótimas a produção é otimizada sendo obtida uma endoglucanase termoestável, com uma larga faixa de variação de pH, estável à variações de temperatura e que possui alta especificidade a partir da utilização do meio complementado com CMC, com um positivo potencial de liberação de glicose (LOPES E OLIVEIRA *et al.*, 2016).

2.4 ENZIMAS

As enzimas são catalisadores biológicos que aceleram as reações, tendo como o principal papel o controle metabólico (COELHO *et al.*, 2008). Elas atuam no meio interno ou externo dependendo da sua especificidade sendo conhecidas como endoenzimas ou exoenzimas (DAVID L. NELSON; MICHAEL M. COX, 2014).

Por conta de sua versatilidade, realizam diversos tipos de reações podendo ser classificadas pela segundo as reações que catalisam, em oxido-redutases, transferases,

hidrolases, liases, isomerases e ligases, polimerases e oxidorreduções (VOET, D.; VOET, J. G., 2013).

Funcionam como máquinas moleculares complexas atuando por diversos mecanismos. Algumas agem sobre apenas um só substrato. Outras sobre dois ou mais. A especificidade pelo substrato e a especificidade em promover reações bioquímicas com seu substrato é uma das características notáveis comparadas com catalisadores químicos. As enzimas são comparadas como catalisadores por atuarem em pequena quantidade e podem ser recuperadas, dependendo das condições de tratamento utilizadas (SANTOS, 2007; VOET, D.; VOET, J. G., 2013).

2.4.1 Hidrolases

As hidrolases são nomeadas pelos tipos de reações que executam, como: Amilase – (hidrólise do amido), protease (hidrólise de proteína), celulase (hidrólise da celulose), lipase (hidrólise de lipídeo). As hidrolases utilizam a água como receptor de grupos funcionais de outras moléculas sendo muito importante para o meio industrial, visto que, estão altamente inseridas em indústrias biotecnológicas conferindo uma qualidade melhor a produtos como, por exemplo, aos alimentos: sabor, textura, aroma para que sejam comercializados (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2011)

As hidrolases quebram as macromoléculas de celulose ou hemicelulose, por meio da adição de ácido sulfúrico aos resíduos, no caso da hidrólise ácida, ou pela ação de enzimas, no caso da hidrólise enzimática. Essa última reproduz o processo existente na natureza, em que a quebra das longas cadeias das moléculas de celulose em açúcares é feita por enzimas (chamadas celulasas, secretadas por fungos ou bactérias, microrganismos que se alimentam da matéria orgânica, alterando-a e formando substâncias químicas (DEMIRBAS, 2007; PASCUAL SERRANO; VERA PASAMONTES; GIRÓN MORENO, 2016).

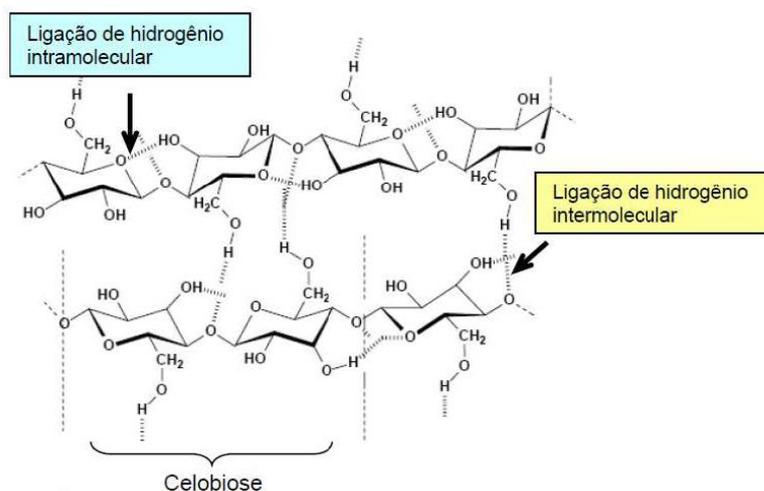
Os microrganismos, plantas e animais por sua vez podem produzir reações capazes de produzir enzimas hidrolíticas com alta importância industrial biotecnológica. Uma dessas enzimas com forte interesse industrial são as celulasas que participam do processo de despolimerização do material celulolítico.

2.4.2 Celulases

A celulose é conhecida como um polissacarídeo formado por várias unidades de glicose unidas através de ligações químicas glicosídicas do tipo β (1-4), atuando como integrante da lignocelulose, o principal composto das células vegetais na bioconversão de açúcares formados para utilização de produtos de alto interesse industrial. Realizando a quebra das ligações químicas existentes entre as unidades de glicose que formam a celulose (CASTRO, 2010)

Para formar as fibrilas, cadeias de celulose se agregam formando pontes de hidrogênio entre os grupamentos hidroxila intra e intercadeias, o que resulta na cristalinidade da celulose. Essas regiões cristalinas, nas quais as cadeias estão ordenadas paralelamente, são separadas por regiões menos ordenadas, conhecidas como amorfas (Figura 4) (RODRIGUES, 2014; VÁSQUEZ *et al.*, 2007).

Figura 4 – Estrutura química da celulose.

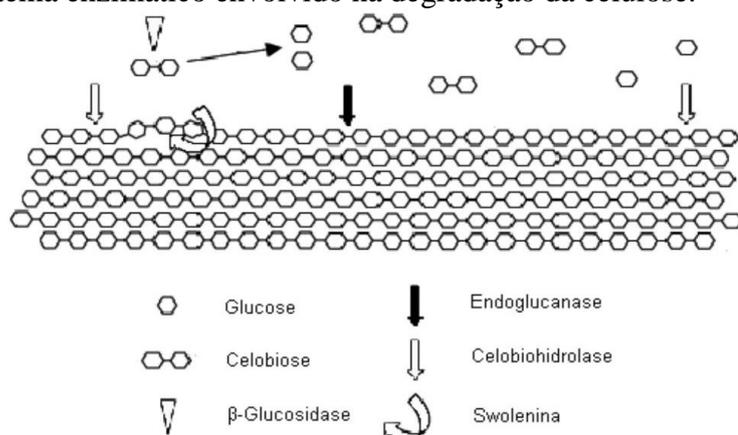


Fonte: Adaptada de CARVALHO *et al.*, 2009

A uma grande necessidade de descobrir enzimas capazes de atuar sobre a parede celular de plantas e vegetais que são constituídos por uma composição química de celulose. Essa composição química de celulose é composta por hemicelulose e lignina que estão unidas por ligações covalentes proporcionando uma flexibilidade e alta resistência química, assim a necessidade de descobrir e conhecer enzimas específicas para a degradação desse material celulolítico de alta resistência (CASTRO, 2010).

Celulases são compostas de exoglucanase, endoglucanase e β -glucosidade (Figura 5). Um mecanismo de ação amplamente aceito para a hidrólise da biomassa ligninocelulósica é a ação sinérgica dessas três enzimas, sendo que a endoglucanase e a exoglucanase possui a função principal de despolimerizar a celulose. A β -glucosidade transforma os substratos despolimerizados em glicose (XUE *et al.*, 2017).

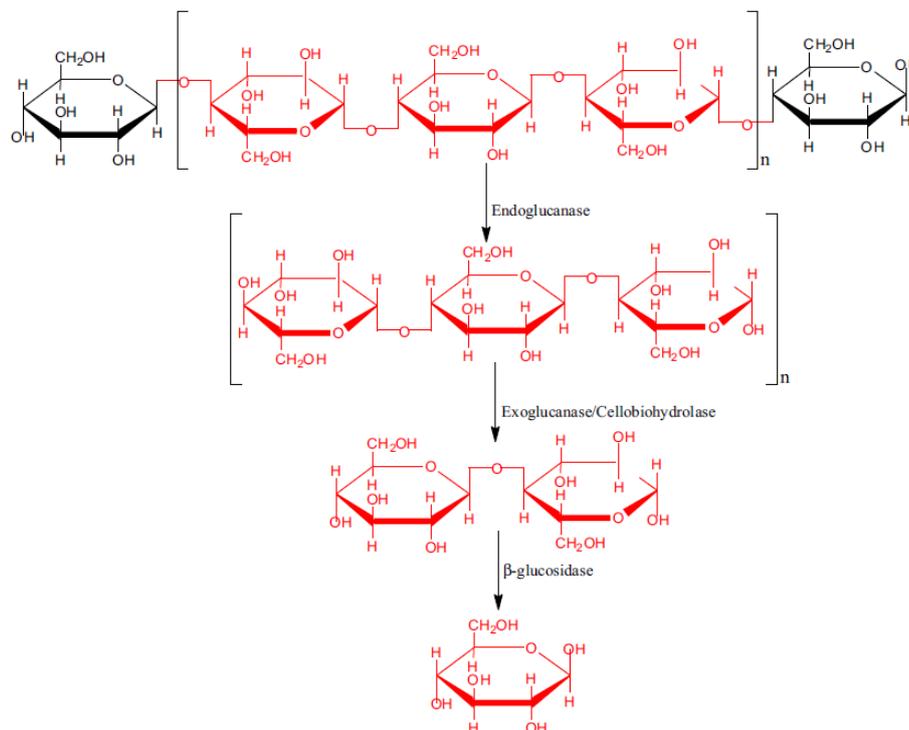
Figura 5 – Sistema enzimático envolvido na degradação da celulose.



Fonte: Adaptada de CARVALHO *et al.*, 2009.

Os componentes do sistema de celulase foram primeiro classificados baseado no seu modo de ação catalítica e tem sido mais recentemente classificado baseado nas propriedades estruturais. Três principais tipos de atividade enzimática são encontradas: (1) endoglucanases ou 1,4- β -D-glucan-4-glucanohidrolases, (2) exoglucanases incluindo as 1,4- β -D-glucan glucanohidrolases (também conhecidas como celodextrinases) e 1,4- β -D- glucan celobiohidrolases (celobiohidrolases) e (3) β -glucosidades ou β -glucoside glicohidrolases. Endoglucanases cortam randomicamente em sítios amorfos internos na cadeia de polissacarídeos de celulose, gerando oligossacarídeos de vários tamanhos e conseqüentemente novas cadeias terminais. Exoglucanases agem de uma maneira processando terminais reduzidas e não-reduzidas de cadeias polissacarídicas de celulose, liberando glicose (glicanohidrolases) ou celobiose (celobiohidrolase) como produtos principal. Exoglucanases podem também agir na celulose microcristalina, quebrando cadeias de celulose da estrutura microcristalina. Glicosidades hidrolizam celodextrinas solúveis e celobiose em glicose. Celulases são distinguidas de outras hidrolases glicosídicas pela sua habilidade em hidrolizar ligações β -1,4-glicosídicas (Figura 6) (LYND *et al.*, 2002).

Figura 6 – Tipos de atividade enzimática característicos das celulases.



Fonte: JUTURU; WU, 2014.

A hidrólise enzimática da celulose é realizada por celulases as quais são altamente específicas. Os produtos da hidrólise são normalmente açúcares reduzidos como a glicose. O custo útil da hidrólise enzimática é baixo comparado à hidrólise alcalina ou ácida porque a hidrólise enzimática é conduzida em condições amenas (pH 4,8 e temperatura 45-50 °C) e não há problemas de corrosão (SUN; CHENG, 2002).

Pesquisas extensivas têm sido realizadas a fim de converter materiais ligninocelulósicos em etanol nas últimas duas décadas. Assim como a descobertas contínuas de microorganismos como as *Streptomyces* sp. capazes de secretar enzimas com poder de degradar materiais ligninocelulolíticas com atividade confirmada (SARATALE, G. D.; SARATALE, R. G.; OH, 2012). Essa conversão para a biodegradação desses materiais inclui dois processos: (1) hidrólise da celulose em materiais ligninocelulósicos em açúcares reduzidos fermentáveis e (2) fermentação de açúcares à etanol. A hidrólise é normalmente catalisada por celulases e a fermentação é realizada por leveduras ou bactérias. Os fatores identificados que afetam a hidrólise da celulose incluem porosidade (acesso à superfície de contato) de materiais desprezados, cristalinidade da fibra de celulose e conteúdo de hemicelulose e lignina. A presença de

lignina e hemicelulose torna o acesso da celulase à celulose mais difícil reduzindo a eficiência da hidrólise. A redução da cristalinidade da celulose e o aumento da porosidade no processo de pré-tratamento pode aumentar significativamente a hidrólise (SUN; CHENG, 2002)

2.4.2.1 Importância Industrial das Celulases

Algumas celulases apresentam atividade significativa na hidrólise de materiais ligninocelulósicos. Sabendo disso, algumas indústrias têm demonstrado interesse em aplicar essas enzimas a fim de otimizar seus processos industriais. Para isso, alguns microrganismos têm sido estudados, e a partir do avanço biotecnológico gerado, são melhorados geneticamente visando um rendimento melhor e mais eficaz. Na Tabela 2 são listadas algumas das principais finalidades e os respectivos microrganismos que produzem celulases de interesse industrial (JUTURU; WU, 2014).

Tabela 2 – Principais usos das celulases na indústria e a diversidade de microrganismos produtores nas respectivas aplicabilidades industriais.

Indústria	Importância dos microrganismos em alguns processos	Exemplos de microrganismo que participam do processo.
Têxtil	Acabamento e processamento têxtil.	<i>T. reesei</i> <i>H. insolens</i> <i>Thermonospora fusca</i> <i>Chrysosporium lucknowense</i>
Detergente	Ajudar na remoção de manchas de panela proporcionando brilho e limpeza. E em tecidos oferecendo limpeza brilho suavidade, tração, amaciando e fixando a cor.	<i>Bacillus sps 669.63</i> <i>Bacillus sps 670.93</i> <i>Trichoderma longibrachia</i> <i>Trichoderma sps</i>
Alimentos	Combinadas com outras enzimas ou não. Na clarificação de sucos, melhorando a estabilidade e propriedades. Na panificação adicionada a farinha para melhorar a qualidade. Como fonte de açúcar para produção de xaropes para utilizar como ingrediente e conferir um melhor sabor adocicado. .	<i>A. niger</i>
Alimentação animal	Melhorar a emulsificação dos alimentos para ser digerido com maior rapidez e proporcionar aos animais uma melhor digestão de nutrientes e conseqüentemente um maior crescimento. Melhorando a estabilidade e validade no tempo de armazenamento e dos materiais utilizados.	<i>T. reesei</i> <i>A. niger</i>
Remoção de biofilme bacteriano	As enzimas ajudam na remoção de biofilme bacteriano. Na parede de torres, no tratamento de águas residuais e indústria de papel. Aplicado em ambientes industriais ou residências para manter ou eliminar a produção de biofilmes bacterianos.	<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Biorrefinaria	Na produção de açúcares fermentáveis para produção de biocombustível e outros produtos químicos de valor agregado.	<i>Streptomyces cerevisiae</i> <i>Aspergillus aculeatus</i> <i>T. reesei</i> <i>Penicillium janthinellum</i> <i>Lactobacilluslactis</i>

Fonte: JUTURU; WU, 2014

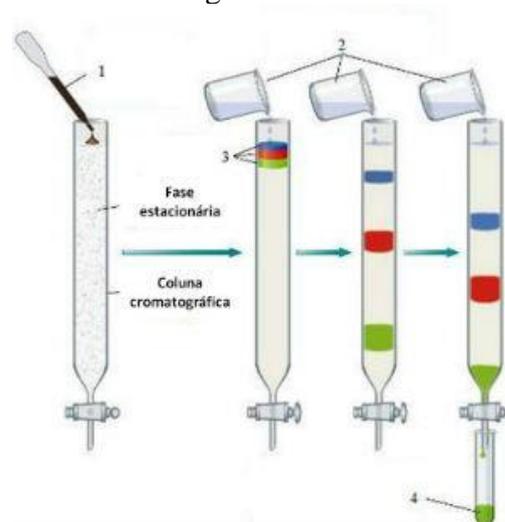
2.5 MÉTODOS DE PURIFICAÇÃO DE ENZIMAS

Para estudar as proteínas são necessários utilizar técnicas para separá-las e purificá-las com base nas diferenças de suas propriedades. Essas técnicas estão citadas abaixo:

Dialise: processo de separação que considera o tamanho das proteínas, podendo separar as de tamanho maior das de menor. Esse método é bastante usado quando é necessário remover o sulfato de amônio de soluções proteicas (NELSON; COX, 2014).

Cromatografia em coluna: Se utiliza dos diferenciais nas cargas das proteínas, tamanho, afinidade de ligação. Podem ser classificadas como de troca iônica, catiônica, exclusão molecular, afinidade e HPLC (NELSON; COX, 2014) (Figura 7).

Figura 7 – Exemplo de coluna cromatográfica.



Fonte: Toda Matéria – Cromatografia. Disponível em: <https://www.todamateria.com.br/cromatografia/>. Acesso em 10 fev. 2018.

2.6 FATORES QUE INFLUENCIAM NA VELOCIDADE DAS REAÇÕES

2.6.1 pH e Temperatura

A velocidade das reações enzimáticas não é apenas influenciada pela quantidade de substrato presentes para realizar a atividade, sabe-se que outros fatores também influencia a realização das reações enzimáticas. Entre eles podemos destacar o pH e a temperatura. Esses fatores podem vir a atuar em sinergia de maneira a tornar a reação mais rápida, prolongando-a ou até mesmo inibindo-a (VOET, D.; VOET, J. G., 2013) .

O pH e a temperatura influenciam de modo relevante para a realização da atividade enzimática e o seu monitoramento se torna algo importante para o controle satisfatório nos efeitos das reações. O papel do monitoramento e consequentemente o controle do pH e a temperatura é importante para amenizar o efeito de alguma reação brusca que venha acontecer durante o processo. Para ajudar nesse monitoramento do pH é necessário utilizar substratos de boa referência e de alta capacidade e tampões conhecidos para as etapas de umidificação (CUNHA, 2012; DAVID L. NELSON; MICHAEL M. COX, 2014).

Também podemos encontrar a temperatura como um fator crítico no papel da atividade da reação enzimática devido ao acúmulo de calor que é gerado na atividade enzimática (PINTO, 2003). As enzimas são estáveis em temperaturas menores e podem perder sua atividade caso aconteça um aumento brusco na quantidade de temperatura, além de muitas enzimas perderem totalmente sua atividade com o aumento da temperatura. Alguns dos sítios ativos das enzimas podem protonar e desprotonar ao mudar o pH e a temperatura da reação enzimática. Por isso a grande importância de encontrar e determinar o pH e a temperatura ótima das reações (SOUZA, F. Da R. De, 2010).

2.6.2 Inibição Enzimática

Ao ligar moléculas específicas ou determinados íons às enzimas, pode haver a inibição de sua atividade causando influência direta sobre a ligação enzima-substrato servindo como mecanismo de regulação enzimático. Alguns desses inibidores são semelhantes ao substrato das enzimas porém não reagem com elas, causando inibição ou retardam as reações (VOET, D.; VOET, J. G., 2013). Essas substâncias são chamadas de inibidores e podem ser classificados em competitivos e não competitivos.

Quando são competitivos, competem com o substrato pelo sítio de ligação da enzima e por serem muito semelhantes ao substrato mimetizam a ligação específica esperada pela enzima, porém não produzem efeito, ou seja, não são reativos. Dessa maneira, o inibidor competitivo tem a capacidade de diminuir a velocidade da reação através da quantidade de moléculas inibitórias ligadas à enzima. Isso quer dizer que ao

aumentar a quantidade de substrato específico para a enzima, a inibição pode ser removida (BERG; TYMOCZKO; STRYER, 2014; VOET, D.; VOET, J. G., 2013).

Quando a inibição é do tipo incompetitiva, o inibidor causa alterações na atividade catalítica mas sem afetar na ligação enzima-substrato. É o caso de inibidores com prótons ou íons metálicos que afetam geralmente enzimas com mais de um substrato (VOET, D.; VOET, J. G., 2013). Nesse tipo de inibição o inibidor e o substrato ligam-se de maneira simultânea à enzima, mas em sítios de ligação diferentes (BERG; TYMOCZKO; STRYER, 2014).

Existe ainda um tipo de inibição não-competitiva. É chamada de inibição mista, onde o inibidor liga-se tanto ao sítio de ligação do substrato quanto ao sítio que participa da catálise (VOET, D.; VOET, J. G., 2013). Nesse tipo de inibição, o inibidor tem a capacidade de dificultar a ligação do substrato e ao mesmo tempo dificultar a renovação da enzima inibindo que ela esteja pronta para se ligar a um novo substrato.

3 RESULTADOS

3.1 ARTIGO 1

Artigo em processo de submissão na revista *Electronic Journal of Biotechnology*
(ISSN: 0717-3458)

Fator de Impacto Thomson Reuters: 1,527

Classificação dos Periódicos no Quadriênio 2013 – 2016 no Qualis CAPES na área
de avaliação de Biotecnologia: B2

Elsevier Editorial System(tm) for Electronic
Journal of Biotechnology
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Partial Purification and Characterization of *Streptomyces capoamus* Endoglucanases

Article Type: Original Research Article

Keywords: microorganism; actinobacteria; enzymes; cellulases

Corresponding Author: Dr. Thiago Ubiratan Lins e Lins, Ph. D.

Corresponding Author's Institution: UFPE

First Author: Luana M Cavalcanti Teixeira, Licentiate

Order of Authors: Luana M Cavalcanti Teixeira, Licentiate; Thiago Ubiratan Lins e Lins, Ph. D.; Rafael L Oliveira, Ph. D.; Camila Beatriz A Borba, M.S.; Wellma O Silva, M.S.; Leila V Araújo Coelho, Bachelor; Raphael C Ferrer de Santana, M.S.; Patricia M Albuquerque, Ph. D.; Norma B Gusmão, Ph. D.; Leonor A Oliveira da Silva, Ph. D.; Luana C Breitenbach Barroso Coelho, Ph. D.

Abstract: Background: The actinobacteria genus *Streptomyces* stand out by the cellulase productions like exoglucanase, endoglucanase, β -glucosidase and cellobiohidrolase promoting ligninocellulosic biomass hydrolysis. In the context, this work aimed to produce cellulases from *Streptomyces capoamus* able to degrade cellulose in an efficient way. Results: Actinobacteria samples were incubated at 37 °C, during 7 days under 150 rpm agitation. The crude enzyme extract obtained was lyophilized by a freeze-drying process. To evaluate the enzymatic activity 1% (w/v) carboxymethyl cellulose was used as substrate (50 mM) under pH 5.6 at 60 °C; the Bradford method was used to quantify proteins (yield = 0.034 mg/ml). The ion exchange chromatography (50.631 U.mg prot-1 activity and 1.65 fold purification), molecular exclusion chromatography (12 samples) and polyacrylamide gel electrophoresis containing sodium dodecyl sulfate (SDS-PAGE) purification methods were performed. The estimated enzyme molecular weight was 97.4 kDa; optimum pH was determined showing activity greater than 50% (pH 3-4 and 6-7). The optimum temperature was 65 °C with activity greater than 50% between 30 and 60 °C. The enzyme showed activity according to the Michaelis-Menten constant ($K_m = 1.06$ mg/mL; $V_{max} = 1.82$ U/mL). The detergent compatibility test was evaluated demonstrating total compatibility and activity in commercial formulations tested: A (100%), B (91.4%), C (57.2%) and D (48.2%) compared to control without detergents (68.2%). Conclusion: The results showed *S. capoamus* cellulases with thermostability, wide pH range, and remaining active even under denaturing conditions contributing to evidence that cellulases can be used for different purposes in commercial and industrial areas.

Suggested Reviewers: Marcia Vanusa V Silva
marciavanusa@hotmail.com

Antônia Souza
antoniaqlsouza@yahoo.com.br

Title Page

Title: Partial Purification and characterization of *Streptomyces capoamus* endoglucanases

Short title: *Streptomyces capoamus* endoglucanases purification

Author names and affiliations:

Luana Maria Cavalcanti Teixeira^a, Thiago Ubiratan Lins e Lins^a, Rafael Lopes e Oliveira^b, Camila Beatriz Atanásio Borba^c, Wellma de Oliveira Silva^c, Leila Viviany Araújo Coelho^c, Raphael Carlos Ferrer de Santana^c, Patricia Melchionna Albuquerque^b, Norma Buarque de Gusmão^c, Leonor Alves de Oliveira da Silva^c, Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho^a.

^aLaboratório de Bioquímica de Proteínas, Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências, CB, Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, PE, Brasil

^bLaboratório de Química Aplicada à Tecnologia, Escola Superior de Tecnologia, Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, AM, Brasil

^cLaboratório de Microbiologia Ambiental e Industrial – LAMAI, Departamento de Antibióticos, CB, UFPE, Cidade Universitária, Recife, PE, Brasil

Corresponding Author:

thiago.ubiratan.lins@gmail.com (T.U.L. LINS)

Present/permanent address:

Laboratório de Bioquímica de Proteínas, Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências, CB, Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, PE, Brasil

Manuscript

Abstract:

Background: The actinobacteria genus *Streptomyces* stand out by the cellulase productions like exoglucanase, endoglucanase, β -glucosidase and cellobiohidrolase promoting ligninocellulosic biomass hydrolysis. In the context, this work aimed to produce cellulases from *Streptomyces capoamus* able to degrade cellulose in an efficient way. **Results:** Actinobacteria samples were incubated at 37 °C, during 7 days under 150 rpm agitation. The crude enzyme extract obtained was lyophilized by a freeze-drying process. To evaluate the enzymatic activity 1% (w/v) carboxymethyl cellulose was used as substrate (50 mM) under pH 5.6 at 60 °C; the Bradford method was used to quantify proteins (yield = 0.034 mg/ml). The ion exchange chromatography (50.631 U.mg prot⁻¹ activity and 1.65 fold purification), molecular exclusion chromatography (12 samples) and polyacrylamide gel electrophoresis containing sodium dodecyl sulfate (SDS-PAGE) purification methods were performed. The estimated enzyme molecular weight was 97.4 kDa; optimum pH was determined showing activity greater than 50% (pH 3-4 and 6-7). The optimum temperature was 65 °C with activity greater than 50% between 30 and 60 °C. The enzyme showed activity according to the Michaelis-Menten constant ($K_m = 1.06$ mg/mL; $V_{max} = 1.82$ U/mL). The detergent compatibility test was evaluated demonstrating total compatibility and activity in commercial formulations tested: A (100%), B (91.4%), C (57.2%) and D (48.2%) compared to control without detergents (68.2%). **Conclusion:** The results showed *S. capoamus* cellulases with thermostability, wide pH range, and remaining active even under denaturing conditions contributing to evidence that cellulases can be used for different purposes in commercial and industrial areas.

Keywords: microorganism; actinobacteria; enzymes; cellulases

1. Introduction

Actinobacteria are one of the most diverse bacteria groups in nature having anaerobic, aerobic, filamentous and spore-generating lineages. Given the wide species variety in this group, there are high biomedical and industrial importance being the target of several studies in genetics, molecular biology and biochemistry areas. Among the important members, some genera like *Streptomyces* are able to occupy diverse ecosystems and environments [1].

The culture in cellulose-containing medium induce these microorganisms to produce a wide range of cellulases such as exoglucanase, endoglucanase, β -glucosidase and cellobiohidrolase, as well as other polysaccharide hemicellulase subclasses, as esterases and other proteins [2].

The cellulase machinery promotes the hydrolysis of ligninocellulosic biomass [3], acting together in the cellulose depolymerization [4]. This biopolymer is considered the most abundant in nature and consists of cellulose, hemicellulose and lignin [3] and is found in plant cell wall, wood pulp, cotton and also in several tunicates and some bacteria [5]. The biomass deconstruction through efficient methods can produce smaller sugar molecules that are used for biochemical processes of high industrial interest such as biodiesel production, dairy production, beer, syrups, among others [3].

The production of enzymes with industrial interest is an important biotechnological goal [6] mainly in researches with microorganisms such as bacteria, actinomycetes and fungi. In this context, actinobacteria may produce enzymes that maintain catalytic properties at high temperatures to obtain degradation products covering the interests of biotechnology industry [7].

One of the main cellulase applicabilities is the detergent industry to produce more efficient detergent formulations since the added enzyme can potentiate detergent effects. Furthermore, the enzyme need to be compatible with other formula constituents, maintaining its thermostability and activity under alkaline conditions [7].

The main objective of this work was to purify and characterize one cellulolytic enzymatic complex consisting of cellulases produced by *Streptomyces capoamus* and demonstrate that this species can effectively contribute to bioactive enzyme production that can be applied for industrial and commercial purposes.

2. Materials and methods

2.1. Microorganism maintenance and culture conditions

Actinobacterium *S. capoamus* samples were obtained from the Departamento de Antibioticos culture collection of the Universidade Federal de Pernambuco (DANTI-UFPE). A pre-inoculum for fermentation containing ISP2 liquid medium (yeast extract 0.4 g; malt extract 1 g; dextrose / glucose 0.4 g; agar 1.5 g, distilled water, 100 ml) was inoculated with 10 discs of 0.9 cm diameter of the actinobacteria during 7 days for growth. The pre inoculum was incubated under 150 rpm agitation at 37 °C for 48 h. After the incubation period, a volume of 10% of culture solution was introduced into 250 ml of cellulase inducing liquid medium (KLC 0.95 g; K₂HPO₄ 0.5 g; MgSO₄ .7H₂O 0.025 g; (NH₄)₂.SO₄ 0.25 g carboxymethylcellulose 6.25 g, 5 g agar plus) with 1% (w/v) carbon source (carboxymethylcellulose). The flasks were incubated under 150 rpm shaking at 37 °C for 7 days. All assays were performed in triplicate.

2.2. Crude enzymatic extract

After the incubation period, the metabolic broth was recovered by centrifugation (10,000 rpm, 5 min). The supernatant containing the crude enzyme extract was stored at 4 °C for further cellulolytic enzyme activity and protein quantification. The crude extract obtained was lyophilized by the freeze-drying method [8] in order to increase stability and to optimize the enzyme storage.

2.3. Enzyme assay

Cellulolytic activity was determined by incubating the sample in 1% (w/v) carboxymethyl cellulose in 50 mM sodium acetate buffer, pH 5.6 at 60 °C. The reaction was interrupted by the addition of 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) reagent. Subsequently 1.0 mL of distilled water was added and the absorbance was measured at 540 nm wavelength. The determination of reducing sugars was performed using glucose as standard [9].

2.4. Protein quantification

The amount of protein was determined by the modified Bradford method [10] using bovine serum albumin as standard. During the chromatography steps, proteins were detected by spectrophotometer reading at 280 nm wavelength.

2.5. Chromatography purification

The lyophilized crude extract (1.42 g fraction) was resuspended in 3 mL of 0.05 M Tris-HCl buffer pH 7.0. The sample was subjected to ion exchange chromatography using a High Q Cartridge (Bio-Rad) column in the same Biologic LP, previously equilibrated in dilution buffer, at 50 mL/h flow rate. The adsorbed proteins were then eluted with a 0.0-0.5 M NaCl linear gradient in the same buffer. Protein was detected by absorbance at 280 nm and cellulase activity was measured in the collected fractions. The collected samples were subjected to Sephadex G-75 (33 x 1.4 cm) molecular exclusion chromatography eluted in 0.05 M Tris HCl buffer, pH 8.0, at 10 mL/h flow rate. Protein was detected by absorbance at 280 nm and cellulolytic activity was assayed in all fractions collected. The fractions with high cellulolytic activity were pooled and submitted to SDS-PAGE electrophoresis.

2.6. Partial characterization of purified cellulases

2.6.1. Electrophoresis

The protein profile and purity degree obtained during the previous purification steps were evaluated by 12% (w/v) polyacrylamide gel electrophoresis containing sodium dodecyl sulfate (SDS-PAGE) under denaturing conditions [11]. After the electrophoretic run, the gel was stained using the silver nitrate staining method [12]. The standard proteins myosin (212 kDa), β -galactosidase (116 kDa), phosphorylase B (97.4 kDa), bovine serum albumin (66.2 kDa), ovalbumin (45 kDa), carbonic anhydrase (31 kDa), soybean trypsin inhibitor (21.5 kDa) and lysozyme (14.4 kDa) (Protein MW Marker K494 - AMRESCO, USA) were used to estimate the molecular mass of the purified enzyme by linear regression.

2.6.2. Temperature stability and optimal pH

Temperature assays were performed in the range 25 °C to 75 °C, with 5.0 unit intervals, using sodium acetate buffer pH 5.0 maintaining the same standard enzyme activity assay conditions.

The pH influence on enzyme activity was evaluated in the 3.0 to 8.0 pH range, with 0.5 unit intervals, using McIlvaine buffers (0.1 mM citric acid / 0.2 mM sodium phosphate) plus 1% (w/v) CMC.

The samples for thermostability analysis were preincubated at 5, 30 and 60 min under temperatures of 40, 50, 60 and 70 °C. The enzyme thermal stability was evaluated by measuring the residual activity.

The best pH value for purified cellulase activities was determined by assaying enzymatic reactions in McIlvaine buffer adjusted to pH 3.0 to 8.0 range, with 0.5 unit intervals, at 50 °C. At the optimum temperature, enzymatic reactions were performed with the purified enzymes in 0.05 M sodium acetate buffer, pH 5.5, at temperatures of 20 to 60 °C, with 5 °C intervals.

All assays maintained the same standard enzyme activity assay conditions.

2.6.3. Kinetic parameters

In order to obtain the Michaelis-Menten constant (K_m) and the maximum velocity (V_{max}) the enzymes were incubated with 1% (w/v) carboxymethylcellulose concentration range according to standard enzymatic assay. Three experiments were performed for each substrate concentration in triplicate and the straight line plotted was calculated by linear regression (Microsoft Office Excel, version 1707) using mean values obtained from each experimental point.

2.6.4. Detergent compatibility of purified cellulases

After partial purification and characterization the enzyme preparation was incubated at 60 °C during 10 min with 4 local brands of laundry detergents (A, B, C and D) diluted according to manufacturers' recommendations in order to evaluate the compatibility of the enzyme with the detergents under normal conditions [13]. The evaluation was performed according to the standard enzyme activity assay.

3. Results and discussion

3.1. *Streptomyces capoamus*

S. capoamus stands out among many other species from the *Streptomyces* genus, being collected from a unique biome of the Brazilian northeast arid region known as Caatinga. Its most important characteristic is a dry tropical deciduous vegetation with many small trees species containing rhizospheres rich in microorganisms that produce enzymes [14]. These enzymes are very important to survival and maintenance of these microorganisms and among them are the cellulases and anthracycline antibiotics like daunorubicin, doxorubicin [15,16] and ciclamycin [17,18] very large used worldwide to treatment of a variety of neoplasias [19].

To achieve our results, we used the identified strain by Lopes e Oliveira [14] that selected microorganisms capable of producing cellulases from 87 actinomycetes assayed in a cellulase screening. Afterwards, the strain was properly cultured in a specific medium in order to check the colony purity [14].

3.2. Purification of Cellulases

The enzymatic cellulolytic complex was purified from the crude extract obtained from *S. capoamus* developed under culture conditions.

After protein yield verification present in the crude extract (0.034 mg/mL), a major protein peak with specific cellulolytic activity was found in ion exchange chromatography with the NaCl gradient (**Figure 1**).

Figure 1 – Ion exchange chromatography of *S. capoamus* cellulases.

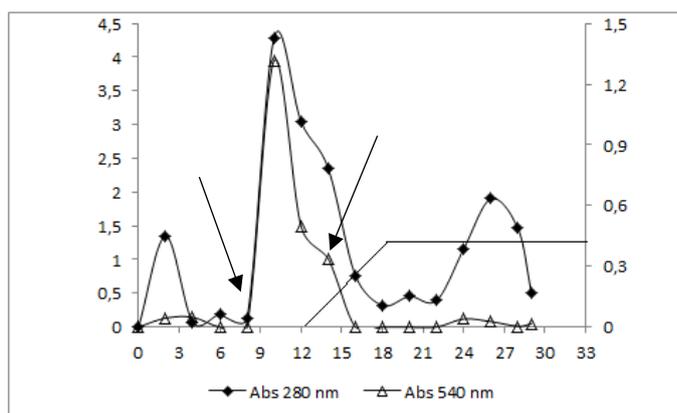


Figure 1: Ion exchange chromatography of *S. capoamus* cellulases. Conditions: 0.05 M Tris-HCl buffer pH 7.0. Elution with a 0.0-0.5 M NaCl linear gradient buffer; 50 mL/h flow rate. The arrows indicate the fractions collected (9-14).

The sample corresponds to *S. capoamus* specific cellulase activity (10.11%) with a main peak of 50.631 U.mg prot⁻¹ and purification of 1.65 folds (**Table 1**). In order to improve enzyme purification, exclusion chromatography was performed. Following elution, the presence of electrophoretic profile protein peaks (samples 16 to 28) was observed (**Figure 2**). The cellulases obtained approximately the same molecular mass estimated, unlike other cellulases produced by other microorganisms such as the genus *Bacillus sp.* which present more than one peak corresponding to the fractions of different cellulases produced but with same activity profile [3].

Tabela 1 – Purificação das celulases de *S. capoamus*

Step	Activity (U/mL)	Volume (mL)	Total activity (U)	Total protein (mg/mL)	Specific activity (U.mg prot ⁻¹)	Yield (%)	Purification (Fold)
Crude extract	1.038	40	41.514	0.034	30.742	100	1

Anion exchange chromatography High Q Cartridge	0.700	6	4.199	0.014	50.631	10.11	1.65
Molecular exclusion chromatography G-75	0.296	10	2.960	0.005	59.200	7.13	1.92

Figura 2 – Sephadex G-75 gel filtration of *S. capoamus* cellulases.

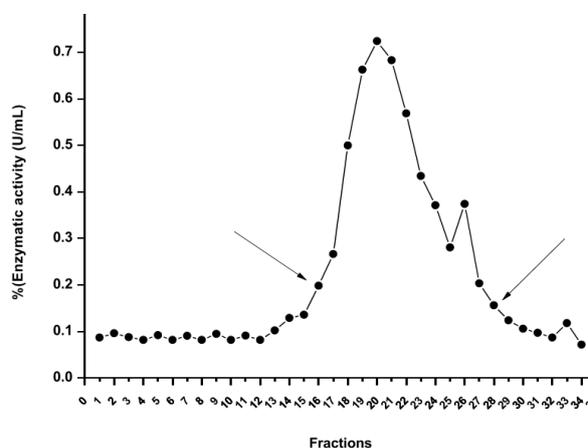


Figure 2: Sephadex G-75 gel filtration of *S. capoamus* cellulases. Conditions: 0.05 M Tris-HCl buffer; pH 8.0; flow rate 10 mL/h. The arrows indicate the fractions collected (16-28).

3.3. Characterization of *S. capoamus* cellulases

Electrophoresis (SDS-PAGE) under denatured conditions of the enzymatic complex revealed two conjugated bands (cellulases A and B) following the purification steps, with apparent molecular weights of 95.5 and 93.3 kDa (**Figure 3**). Other species such as *Artemia salina* also produced cellulases of apparent molecular weights near the result obtained [20]. In another study, two fractions of cellulases of apparent molecular weights 37 and 119 kDa produced by *S. misionensis* were obtained [21]. This result shows that there is considerable variation in apparent molecular weights even among species of the same genus.

Figura 3 – SDS-PAGE (12% w/v) of *S. capoamus* purified cellulases A and B.

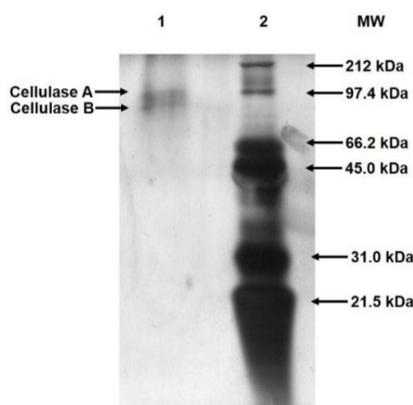


Figure 3: SDS-PAGE (12% w/v) of *S. capoamus* purified cellulases A e B. Lane 1: cellulases; Lane 2: standard proteins: myosin (212 kDa), β -galactosidase (116 kDa), phosphorylase B (97.4 kDa), bovine serum albumin (66.2 kDa), ovalbumin (45 kDa), carbonic anhydrase (31 kDa), soybean trypsin inhibitor (21.5 kDa) and lysozyme (14.4 kDa).

The enzyme activity varied from acidic to neutral pH values, of 4 to 7, with optimal activity at pH 7.0, maintaining relative activity above 96% (**Figure 4a**). Similarly, an endoglucanase obtained from *Streptomyces T3-1* had an optimum pH of 7.0 [22]. In addition, other microorganism species such as *Pseudomonas fluorescens* are also capable of producing cellulases with pH close to 7 [23]. The enzyme showed more than 50% activity in the pH range 3 to 4 and in pH 7 (**Figure 4b**). Species like *Trichoderma reesei* and *Trichoderma viride* produced cellulases active and stable in a wide pH range of 4 to 7 [24]. Some species of the genus *Streptomyces* such as M7a and M23 [25] revealed an extra peak in 5.6 to 11 pH range maintaining their activities. Furthermore, *S. rutgersensis* species produced one β -glucanase with pH range of 4 to 9 and mainly activity at pH 7 [26].

The temperature evaluation revealed an enzyme optimum activity at 65 °C (**Figure 5**) and activity greater than 50% between 30 and 60 °C (**Figure 6**) exhibiting stability in the same range. The *S. capoamus* species demonstrated the ability to produce thermostable cellulases at optimum temperature of 60 °C and thermostability at 50 to 80 °C range [14]. It has also been known that some varieties of *Streptomyces* exhibit heat-tolerant properties being able to maintain their activity at temperatures between 50 and 70 °C [27]. In addition, some cellulases produced by other microorganisms such as *Bacillus vallismortis* also exhibit similar stability at the same temperatures [28] and an endoglucanase produced by *Thermoascus aurantiacus* presented optimum temperature of 70 °C [29].

Figure 4 – Influence of pH values on *S. capoamus* cellulases activity.

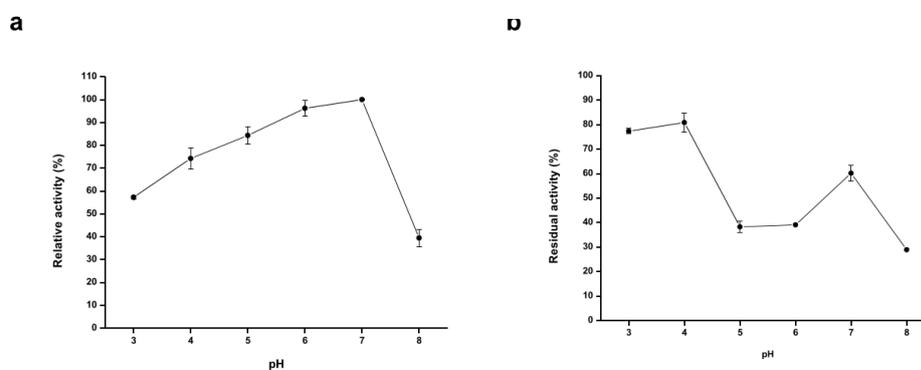


Figure 4: Influence of pH values on *S. capoamus* cellulases activity. (a) Relative activity of *S. capoamus*. (b) Residual activity of *S. capoamus* cellulases after 24h. Conditions (a and b): McIlvaine buffer pH 3.0-8.0, 50 °C; 1% CMC in 0.1 mM citric acid / 0.2 mM sodium phosphate buffer.

Figure 5 - Thermal stability of *S. capoamus* cellulases.

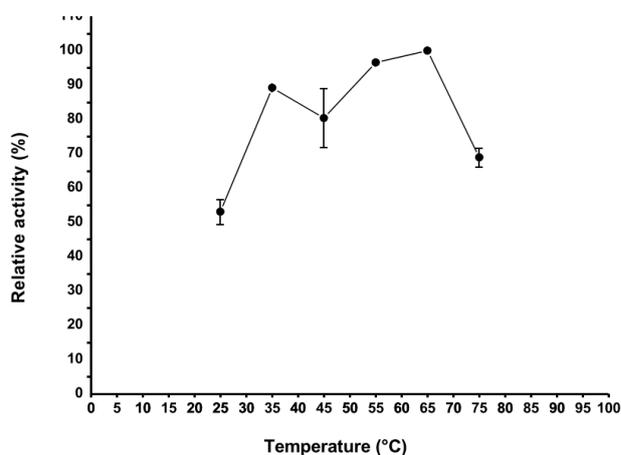


Figure 5: Thermal stability of *S. capoamus* cellulases. Conditions: purified enzyme incubation at 25-75 °C. The activity was evaluated with 1% (w/v) carboxymethylcellulose in 0.05 M sodium acetate buffer pH 5.5 at 50 °C.

Figura 6 – Thermal stability of *S. capoamus* purified cellulases.

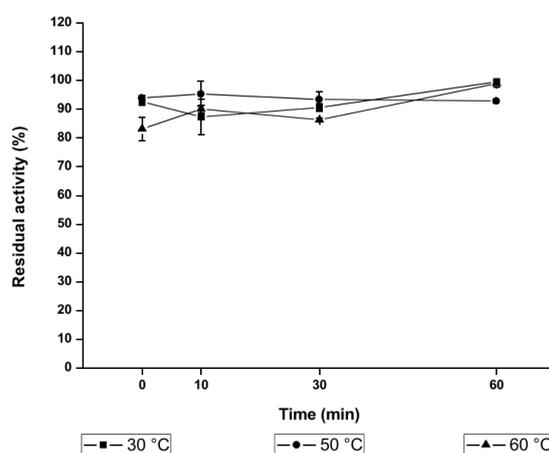


Figure 6: Thermal stability of *S. capoamus* purified cellulases. Conditions: purified enzyme incubation without substrate at 30, 50 and 60 °C. The activity was performed with 1% (w/v) carboxymethylcellulose in 0.05 M sodium acetate buffer pH 5.5 at 50 °C.

3.4. Kinetic parameters

The enzyme exhibited kinetic parameters according to Michaelis-Menten kinetics. The calculated values were: $V_{max} = 1.8275$ U / ml and $K_m = 1.0649$ (**Figure 7**) with a molar concentration of 4.4 M indicating that the enzyme had affinity for cellulose as substrate. Some enzymes such as exo 1,4- β -glucanase ($K_m = 76$ μ M; $V_{max} = 240$ U / mL) produced by *Trichoderma viridi* [30], α -amylase ($K_m = 2.407$ mg / mL, $V_{max} = 21853.0$ mol/min/mg) produced by *Streptomyces sp. MSC702* [31] and xylanase ($K_m = 3.9$ mg/ml) produced by *Streptomyces sp. CD3* [32] showed in common the ability to produce enzymes that have the fastest reaction rate per unit enzyme amount. This characteristic is very important for industrial applications and reflecting potential commercial importance. Furthermore, the difference presented in their kinetic parameters is mainly due to the genetic variability among the species that have their own characteristics and needs to produce their enzymes.

Figure 7 – Determination of K_m and V_{max} for *S. capoamus* purified cellulases through Michaelis-Menten kinetics.

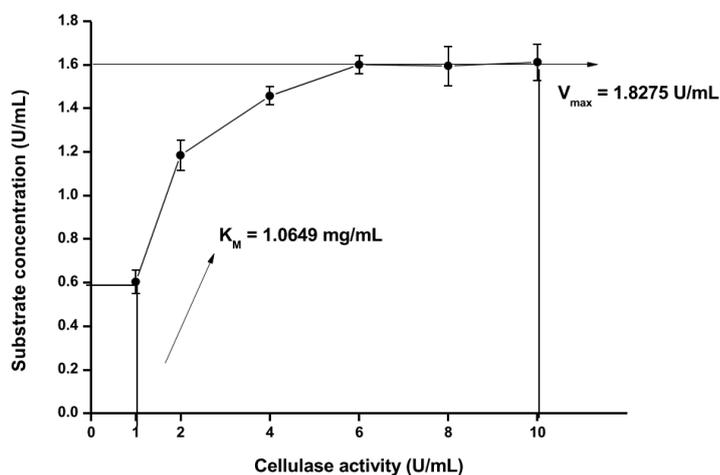


Figure 7: Determination of K_m and V_{max} for *S. capoamus* purified cellulases through Michaelis-Menten kinetics.

3.5. Detergent compatibility of purified cellulases

The enzyme showed maximal compatibility with the detergents A (100%) followed by B (91.4%) (**Figure 8**). The detergents C (57.2%) and D (48.2%) did not stand out considerably when compared to control without detergent (62.8%). Similarly to the result obtained, cellulase from *Streptomyces spp.* presented ability to maintain residual activity close to 100% under denaturant conditions [27]. Cellulases produced by other microorganisms such as *Thermoascus aurantiacus* showed maximum residual activity of only 62% under the same pH conditions in which *Streptomyces* cellulases were tested (pH 5.5) [29]. This result reveals that enzyme is compatible with all tested local brands of laundry detergents demonstrating a potential to be used in the industry as a formulation additive to potentiate the detergent action [13].

Figure 8 – Detergent compatibility of purified *S. capoamus* cellulases.

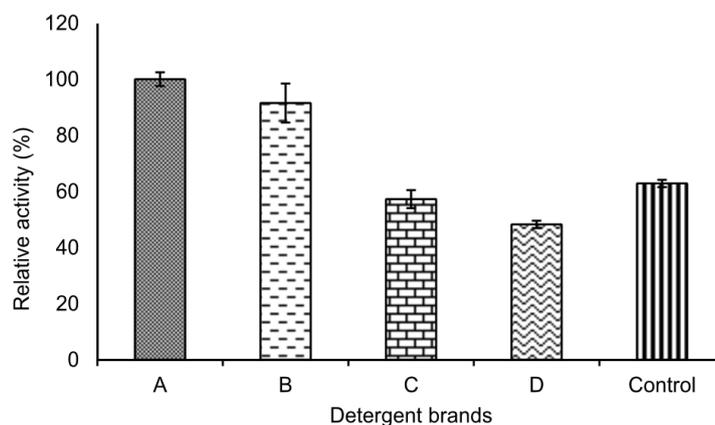


Figure 8: Detergent compatibility of purified *S. capoamus* cellulases. Laundry local detergent brands was assayed in cellulases presence obtaining the following activity percentages: A (100%), B (91.4%), C (57.2%), D (48.2%) and Control without detergents (62.8%).

4. Conclusions

The enzymatic complex obtained from *S. capoamus* with high specific activity demonstrated characteristics of thermostability, pH adaptability and highlighted activity under denaturant conditions. Then *S. capoamus* cellulases isolated from the Caatinga bioma rizosphere have a promising future to industrial applications.

5. Financial support

The authors acknowledge the Fundação de Amparo à Ciência do Estado de Pernambuco (FACEPE) and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for grants and fellowship (LCBBC).

6. Conflict of interest

The authors declare there is no conflict of interest in this article publication.

7. References

- [1] Lewin GR, Carlos C, Chevrette MG, Horn HA, McDonald BR, Stankey RJ, et al. Evolution and ecology of actinobacteria and their bioenergy applications. *Annu Rev Microbiol* 2016;70:235–54. doi:<http://dx.doi.org/doi:10.1146/annurev-micro-102215-095748>.
- [2] Rai R, Kaur B, Chadha BS. A method for rapid purification and evaluation of

- catalytically distinct lignocellulolytic glycosyl hydrolases from thermotolerant fungus *Acrophialophora* sp. *Renew Energy* 2016;98:254–63. doi:<http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.renene.2016.02.011>.
- [3] Sriariyanun M, Tantayotai P, Yasurin P, Pornwongthong P, Cheenkachorn K. Production, purification and characterization of an ionic liquid tolerant cellulase from *Bacillus* sp. isolated from rice paddy field soil. *Electron J Biotechnol* 2016;19:23–8. doi:<http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.ejbt.2015.11.002>.
- [4] Xue D, Lin D, Gong C, Peng C, Yao S. Expression of a bifunctional cellulase with exoglucanase and endoglucanase activities to enhance the hydrolysis ability of cellulase from a marine *Aspergillus niger*. *Process Biochem* 2017;52:115–22. doi:<http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.procbio.2016.09.030>.
- [5] Dumanli AG, Kamita G, Landman J, van der Kooij H, Glover BJ, Baumberg JJ, et al. Controlled, bio-inspired self-assembly of cellulose-based chiral reflectors. *Adv Opt Mater* 2014;2:646–50. doi:<http://dx.doi.org/doi:10.1002/adom.201400112>.
- [6] da Silva RR. Bacterial and fungal proteolytic enzymes: production, catalysis and potential applications. *Appl Biochem Biotechnol* 2017;183:1–19. doi:<http://dx.doi.org/doi:10.1007/s12010-017-2427-2>.
- [7] Cherry JR, Fidantsef AL. Directed evolution of industrial enzymes: an update. *Curr Opin Biotechnol* 2003;14:438–43. doi:[http://dx.doi.org/doi:10.1016/S0958-1669\(03\)00099-5](http://dx.doi.org/doi:10.1016/S0958-1669(03)00099-5).
- [8] Matejtschuk P. Lyophilization of Proteins. In: JG D, Stacey G, editors. *Methods Mol. Biol. Cryopreserv. Free. Protoc.*, vol. 368. Second Edi, New Jersey: Humana Press Inc.; 2007, p. 59–72. doi:http://dx.doi.org/doi:10.1007/978-1-59745-362-2_4.
- [9] Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem* 1959;31:426–8. doi:<http://dx.doi.org/doi:10.1021/ac60147a030>.
- [10] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248–54. doi:[http://dx.doi.org/doi:10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](http://dx.doi.org/doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3).
- [11] Laemli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680–5. doi:<http://dx.doi.org/doi:10.1038/227680a0>.
- [12] Blum H, Beier H, Gross HJ. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 1987;8:93–9. doi:<http://dx.doi.org/doi:10.1002/elps.1150080203>.
- [13] Iqbal HMN, Ahmed I, Zia MA, Irfan M. Purification and characterization of the kinetic parameters of cellulase produced from wheat straw by *Trichoderma viride* under SSF and its detergent compatibility. *Adv Biosci Biotechnol* 2011;2:149–56. doi:<http://dx.doi.org/doi:10.4236/abb.2011.23024>.
- [14] Oliveira RL, Camila Beatriz Atanásio B, Sergio DJ, Patricia Melchionna A, Norma Buarque de G, Edmar Vaz de A, et al. Production and characterization of endoglucanase secreted by *Streptomyces capoamus* isolated from Caatinga. *African J Biotechnol* 2016;15:2394–401. doi:<http://dx.doi.org/doi:10.5897/AJB2015.14610>.
- [15] McGuire JC, Hamilton BK, White RJ. Approaches to development of the daunorubicin fermentation. *Process Biochem* 1979;2–5.
- [16] White RJ, Stroshane RM. Daunorubicin and adriamycin: properties, biosynthesis, and fermentation. In: Vandamme EJ, Dekker M, editors. *Biothechnology Ind.*

- Antibiot., New York: 1984, p. 569–94.
- [17] Gonçalves de Lima VQ, Albert CA, Gonçalves de Lima OG. *Streptomyces capoamus* nov. sp., produtor da ciclamicina e das ciclacidinas A e B. An Acad Bras Cienc 1964;36:317–22.
- [18] Lyra FDA, Gonçalves de Lima O, Coelho JSB, Albuquerque MMF, Maciel GM, Oliveira LL, et al. Ciclamicina e ciclacidina, dois novos antibióticos corados, produzidos pelo *Streptomyces capoamus* nov. sp. An Acad Bras Cienc 1964;36:323–34.
- [19] Martins CS, Souto-Maior AM. Anthracycline production by *Streptomyces capoamus* in batch fermentation. Brazilian Arch Biol Technol 2003;46:483–8. doi:10.1590/S1516-89132003000300021.
- [20] Zin HW, Park K-H, Choi TJ. Purification and characterization of a carboxymethyl cellulase from *Artemia salina*. Biochem Biophys Res Commun 2014;443:194–9. doi:http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.bbrc.2013.11.085.
- [21] Franco-Cirigliano MN, Rezende RDC, Gravina-Oliveira MP, Pereira PHF, do Nascimento RP, Bon EPDS, et al. *Streptomyces misionensis* PESB-25 produces a thermoacidophilic endoglucanase using sugarcane bagasse and corn steep liquor as the sole organic substrates. Biomed Res Int 2013;2013:1–9. doi:http://dx.doi.org/doi:10.1155/2013/584207.
- [22] Jang H-D, Chen K-S. Production and characterization of thermostable cellulases from *Streptomyces* transformant T3-1. World J Microbiol Biotechnol 2003;19:263–8. doi:http://dx.doi.org/doi:10.1023/A:1023641806194.
- [23] Bakare MK, Adewale IO, Shonukan OO. Purification and characterization of cellulase from the wild-type and two improved mutants of *Pseudomonas fluorescens*. African J Biotechnol 2005;4:898–904.
- [24] Huang X, Li Q, Chen X, Fan J, Xu X, Sun X, et al. Expression and characteristics of an endoglucanase from *Trichoderma atroviride* (TaEGII) in *Saccharomyces cerevisiae*. Appl Biochem Biotechnol 2017;182:1158–70. doi:http://dx.doi.org/doi:10.1007/s12010-016-2389-9.
- [25] Semêdo LTAS, Gomes RC, Bon EPS, Soares RMA, Linhares LF, Coelho RRR. Endocellulase and exocellulase activities of two *Streptomyces* strains isolated from a forest soil. Appl Biochem Biotechnol 2000;84–86:267–76. doi:http://dx.doi.org/doi:10.1385/ABAB:84-86:1-9:267.
- [26] Javmen A, Grigiškis S, Rudenkov M, Mauricas M. Purification and partial characterization of a novel β -1,3-endoglucanase from *Streptomyces rutgersensis*. Protein J 2013;32:411–7. doi:http://dx.doi.org/doi:10.1007/s10930-013-9500-7.
- [27] Alani F, Anderson WA, Moo-Young M. New isolate of *Streptomyces* sp. with novel thermoalkalotolerant cellulases. Biotechnol Lett 2008;30:123–6. doi:https://doi.org/10.1007/s10529-007-9500-9.
- [28] Gaur R, Tiwari S. Isolation, production, purification and characterization of an organic-solvent-thermostable alkalophilic cellulase from *Bacillus vallismortis* RG-07. BMC Biotechnol 2015;15:1–12. doi:https://doi.org/10.1186/s12896-015-0129-9.
- [29] Dave BR, Sudhir AP, Subramanian RB. Purification and properties of an endoglucanase from *Thermoascus aurantiacus*. Biotechnol Reports 2015;6:85–90. doi:http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.btre.2014.11.004.
- [30] Irshad M, Anwar Z, Afroz A. Characterization of Exo 1, 4- β glucanase produced

- from *Trichoderma viride* through solid-state bio-processing of orange peel waste. *Adv Biosci Biotechnol* 2012;3:580–4. doi:<http://dx.doi.org/doi:10.4236/abb.2012.35075>.
- [31] Singh R, Kumar V, Kapoor V. Partial purification and characterization of a heat stable alpha-amylase from a thermophilic actinobacteria, *Streptomyces* sp. MSC702. *Enzyme Res* 2014;2014:8 pages. doi:<http://dx.doi.org/doi:10.1155/2014/106363>.
- [32] Sharma P, Bajaj BK. Production and partial characterization of alkali-tolerant xylanase from an alkalophilic *Streptomyces* sp. CD3. *J Sci Ind Res (India)* 2005;64:688–97.

4 CONCLUSÃO

- Foi obtido complexo celulolítico a partir de cultivo de *Streptomyces capoamus*
- Foram realizadas etapas de purificação do extrato bruto, obtendo-se frações com relevante atividade enzimática
- Foram verificadas as propriedades físico-químicas da enzima estudada onde constatou-se elevada resistência ao calor, termoestabilidade e estabilidade em faixa de pH de 3 a 7
- Foi estimada a massa molecular da enzima sendo atribuída uma massa molecular próxima de 97,4 kDa
- A enzima mostrou-se estável e com atividade acima de 60% em condições desnaturantes quando adicionada a marcas de detergentes disponíveis no mercado
- A enzima mostrou-se promissora como agente degradante de celulose mostrando sua atividade

REFERÊNCIAS

- ATTA, H. M. Biochemical studies on antibiotic production from streptomyces sp.: taxonomy, fermentation, isolation and biological properties. Cairo: **Journal of saudi chemical society**, jan. 2015. v. 19, n. 1, p. 12–22. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jscs.2011.12.011>>. Acesso em: 16 ago. 2017.
- BALLAV, S.; DASTAGER, S. G.; KERKAR, S. Biotechnological significance of actinobacterial research in india. Goa: **Recent research in science and technology**, 2012. v. 4, n. 4, p. 31–39. Disponível em: <<https://pdfs.semanticscholar.org/85e4/a1ef94d792f95cffe0587b34cbdcfee2b521.pdf>>. Acesso em: 16 ago. 2017.
- BASSANI, G. *et al.* Candida rugosa lipase lip1-polyethyleneglycol interaction and the relation with its partition in aqueous two-phase systems. Rosario: **Colloids and surfaces b: biointerfaces**, 2010. v. 75, n. 2, p. 532–537. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0927776509004640?via%3Dihub>>. Acesso em: 16 ago. 2017.
- BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. Enzimas: conceitos básicos e cinética. **Bioquímica**. 7ª ed. Rio de Janeiro - RJ: Guanabara-Koogan, 2014.
- BISSWANGER, H. Enzyme assays. Tübingen: **Perspectives in science**, 2014. v. 1, n. 1–6, p. 41–55. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2213020914000068>>. Acesso em: 16 ago. 2017.
- BULL, A. T.; STACH, J. E. M. Marine actinobacteria: new opportunities for natural product search and discovery. Canterbury: **Trends in microbiology**, 2007. v. 15, n. 11, p. 491–499. Disponível em: <[http://www.cell.com/trends/microbiology/abstract/S0966-842X\(07\)00180-1](http://www.cell.com/trends/microbiology/abstract/S0966-842X(07)00180-1)>. Acesso em: 16 ago. 2017.
- CARVALHO, W. *et al.* Uma visão sobre a estrutura, composição e biodegradação da madeira. Lorena: **Química nova**, 2009. v. 32, n. 8, p. 2191–2195. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422009000800033&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 16 ago. 2017.
- CASTRO, A. M. De. Produção, propriedades e aplicação de celulasas na hidrólise de resíduos agroindustriais. Rio de Janeiro: **Química nova**, 2010. v. 33, n. 1, p. 181–188. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/qn/v33n1/31.pdf>>. Acesso em: 16 ago. 2017.
- COELHO, M. A. Z. A. Z. *et al.* **Tecnologia enzimática**. Rio de Janeiro, Brasil: Editora EPUB FAPERJ, 2008.
- CUNHA, C. C. D. Q. B. **Caracterização de celulasas e xilanases produzidas por streptomyces sp. cultivados em resíduos lignocelulósicos**. Goiânia, Brasil: UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS, 2012. Disponível em: <<https://repositorio.bc.ufg.br/tede/bitstream/tede/3119/5/Carolina C. de Queiroz Brito>>

Cunha - 2012.pdf>. Acesso em: 16 ago. 2017.

DAVID L. NELSON; MICHAEL M. COX. **Princípios de bioquímica de lehninger**. 6^a Edição ed. Porto Alegre: ARTMED EDITORA LTDA, 2014.

DEMIRBAS, A. Products from lignocellulosic materials via degradation processes. Trabzon: **Energy sources, part a: recovery, utilization, and environmental effects**, 28 nov. 2007. v. 30, n. 1, p. 27–37. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/citedby/10.1080/00908310600626705?scroll=top&needAccess=true>>. Acesso em: 16 ago. 2017.

FOLASADE, B. Isolation , characterization and biological activities of antibacterial antibiotics produced by streptomyces albus dsm banji-onisile folasade. AkureOndo State: 2016. v. 11, n. 6, p. 19–22. Disponível em: <<http://www.iosrjournals.org/iosr-jpbs/papers/Vol11-issue6/Version-4/D1106041922.pdf>>. Acesso em: 16 ago. 2017.

FOOD INGREDIENTS BRASIL. Enzimas: natureza e ação nos alimentos. **Food ingredients brasil**, [S.l.], 2011. v. 16, p. 26–37. Disponível em: <www.revista-fi.com>.

GOMEZ, L. D.; STEELE-KING, C. G.; MCQUEEN-MASON, S. J. Sustainable liquid biofuels from biomass: the writing's on the walls. Heslington: **New phytologist**, maio. 2008. v. 178, n. 3, p. 473–485. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1469-8137.2008.02422.x>>. Acesso em: 16 ago. 2017.

JUTURU, V.; WU, J. C. Microbial cellulases: engineering, production and applications. Singapore: **Renewable and sustainable energy reviews**, maio. 2014. v. 33, p. 188–203. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1364032114000999?via%3Dihub>>. Acesso em: 16 ago. 2017.

LARONE, D. H. **Medically important fungi. a guide to identification**. Washington, D.C., United States of America: American Society for Microbiology, 1993.

LI, X.; GAO, P. Cmc-liquefying enzyme, a low molecular mass initial cellulose-decomposing cellulase responsible for fragmentation from streptomyces sp. lx. Jinan: **Journal of applied microbiology**, jun. 1997. v. 83, n. 1, p. 59–66. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9246771>>. Acesso em: 16 ago. 2017.

LOPES E OLIVEIRA, R. *et al.* Production and characterization of endoglucanase secreted by streptomyces capoamus isolated from caatinga. Manaus: **African journal of biotechnology**, 19 out. 2016. v. 15, n. 42, p. 2394–2401. Disponível em: <<http://academicjournals.org/journal/AJB/article-abstract/5D9291061182>>. Acesso em: 16 ago. 2017.

LYND, L. R. *et al.* Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. Hanover: **Microbiology and molecular biology reviews : mabr**, set. 2002. v. 66, n. 3, p. 506–77, table of contents. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pnsb2008/PNSB_

2008.pdf%5Cnhttp://www.sober.org.br/palestra/5/796.pdf>. Acesso em: 16 ago. 2017.

MARTINS, C. S.; SOUTO-MAIOR, A. M. Anthracycline production by streptomyces capoamus in batch fermentation. Recife: **Brazilian archives of biology and technology**, jun. 2003. v. 46, n. 3, p. 483–488. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-89132003000300021&lng=en&tlng=en>. Acesso em: 16 ago. 2017.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Aminoácidos, peptídeos e proteínas. **Princípios de bioquímica de lehniger**. 6ª ed. Porto Alegre - RS: Artmed, 2014, p. 75–114.

PASCUAL SERRANO, D.; VERA PASAMONTES, C.; GIRÓN MORENO, R. Modelos animales de dolor neuropático. Barcelona: **Dolor investigación, clínica & terapéutica**, 2016. v. 31, n. 2, p. 70–76. Disponível em: <<http://www.dolor.es/resumen.asp?id=1081&indice=2016312>>. Acesso em: 16 ago. 2017.

PINTO, G. A. S. **Produção de tanase por aspergillus niger**. Rio de Janeiro, Brasil: Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2003. Disponível em: <<http://www.bdpa.cnptia.embrapa.br/consulta/busca?b=ad&id=1053489&biblioteca=va zio&busca=autoria:%22PINTO, G. A. S.%22&qFacets=autoria:%22PINTO, G. A. S.%22&sort=&paginacao=t&paginaAtual=1>>. Acesso em: 16 ago. 2017.

PRIYADHARSINI, P.; DHANASEKARAN, D. Diversity of soil allelopathic actinobacteria in tiruchirappalli district, tamilnadu, india. Tiruchirappalli: **Journal of the saudi society of agricultural sciences**, jan. 2015. v. 14, n. 1, p. 54–60. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jssas.2013.07.001>>. Acesso em: 16 ago. 2017.

RAI, R.; KAUR, B.; CHADHA, B. S. A method for rapid purification and evaluation of catalytically distinct lignocellulolytic glycosyl hydrolases from thermotolerant fungus acrophialophora sp. Punjab: **Renewable energy**, dez. 2016. v. 98, p. 254–263. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960148116301124>>. Acesso em: 16 ago. 2017.

RODRIGUES, R. S. **Produção, purificação e caracterização de celulasas e hemicelulasas do fungo da podridão-branca pycnoporus sanguineus pf-2**. Viçosa, Brasil: Universidade Federal de Viçosa, 2014. Disponível em: <<http://www.locus.ufv.br/bitstream/handle/123456789/339/texto completo.pdf?sequence=1>>. Acesso em: 16 ago. 2017.

SANTOS, S. F. De M. **Estudo da produção de pectinases por fermentação em estado sólido utilizando pedúnculo de caju como substrato**. Natal, Brasil: Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2007. Disponível em: <<https://repositorio.ufrn.br/jspui/bitstream/123456789/15876/1/SHARLINEFMS.pdf>>. Acesso em: 16 ago. 2017.

SARATALE, G. D.; SARATALE, R. G.; OH, S. E. Production and characterization of multiple cellulolytic enzymes by isolated streptomyces sp. mds. Chuncheon: **Biomass**

and bioenergy, dez. 2012. v. 47, p. 302–315. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0961953412003704>>. Acesso em: 16 ago. 2017.

SEIPKE, R. F.; KALTENPOTH, M.; HUTCHINGS, M. I. Streptomyces as symbionts: an emerging and widespread theme? Norwich: **Fems microbiology reviews**, jul. 2012. v. 36, n. 4, p. 862–876. Disponível em: <<https://academic.oup.com/femsre/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6976.2011.00313.x>>. Acesso em: 16 ago. 2017.

SILVA, J. C. D. A. The importance of enzymes produced by microorganisms for the production of bioethanol. Instituto de microbiologia paulo de goés ufrj, [S.l.], 2011. Disponível em: <<http://www.microbiologia.ufrj.br/portal/index.php/en/destaques-2/news-about-microbiology/318-the-importance-of-enzymes-produced-by-microorganisms-for-the-production-of-bioethanol>>. Acesso em: 17 set. 2017.

SINGH, R. *et al.* Microbial cellulases in industrial applications. Jammu: **Annals of applied bio-sciences**, 2016. v. 3, n. 4, p. 23–29. Disponível em: <<https://www.pacificjournals.com/journal/index.php/aabs/article/view/aabs1130>>. Acesso em: 16 ago. 2017.

SINGH, V.; TRIPATHI, C. K. M.; BIHARI, V. Production, optimization and purification of an antifungal compound from streptomyces capoamus mtcc 8123. Lucknow: **Medicinal chemistry research**, 20 jun. 2008. v. 17, n. 2–7, p. 94–102. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00044-007-9040-9>>. Acesso em: 16 ago. 2017.

SINGHANIA, R. R. *et al.* Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. Trivandrum: **Enzyme and microbial technology**, jun. 2010. v. 46, n. 7, p. 541–549. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141022910000657>>. Acesso em: 16 ago. 2017.

SOUZA, F. Da R. De. **Aplicação de enzimas no processamento de couros: comparação entre processos químicos e enzimáticos**. Porto Alegre, Brasil: UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL, 2010. Disponível em: <<http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/25867/000753815.pdf?sequence=1>>. Acesso em: 16 ago. 2017.

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. Raleigh: **Bioresource technology**, maio. 2002. v. 83, n. 1, p. 1–11. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12058826>>. Acesso em: 16 ago. 2017.

VÁSQUEZ, M. P. *et al.* Enzymatic hydrolysis optimization to ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation. Rio de Janeiro: **Applied biochemistry and biotechnology**, abr. 2007. v. 137–140, n. 1–12, p. 141–153. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18478383>>. Acesso em: 16 ago. 2017.

VENTURA, M. *et al.* Genomics of actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. Parma: **Microbiology and molecular biology reviews**, 1 set. 2007. v. 71, n. 3, p. 495–548. Disponível em: <<http://mmbr.asm.org/cgi/doi/10.1128/MMBR.00005-07>>. Acesso em: 16 ago. 2017.

VOET, D.; VOET, J. G. Velocidade das reações enzimáticas. **Bioquímica [recurso eletrônico]**. 4^a ed. Porto Alegre - RS: Artmed, 2013.

XUE, D.-S. *et al.* Expression of *piromyces rhizinflata* cellulase in marine *aspergillus niger* to enhance halostable cellulase activity by adjusting enzyme-composition. Hangzhou: **Biochemical engineering journal**, jan. 2017. v. 117, p. 156–161. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369703X16302698>>. Acesso em: 16 ago. 2017.

ANEXO A – COMPROVANTES DE SUBMISSÃO DO ARTIGO NA REVISTA ELECTRONIC JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY (ISSN: 0717-3458)


Electronic Journal of Biotechnology
Contact us  Help ?

[home](#) | [main menu](#) | [submit paper](#) | [guide for authors](#) | [register](#) | [change details](#) | [log out](#)
Username: [\[email protected\]](#)
Switch To: Author Go to: [My EES Hub](#) Version: EES 2018.1

Submissions Being Processed for Author Thiago Ubiratan Lins e Lins, Ph. D.

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display 10 results per page.

Action 	Manuscript Number 	Title 	Initial Date Submitted 	Status Date 	Current Status 
View Submission Send E-mail		Partial Purification and Characterization of Streptomyces capoamus Endoglucanases	Feb 7 2018 3:27:47	Feb 7 2018 3:27:48	Submitted to Journal

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display 10 results per page.

[<< Author Main Menu](#)



Author's Decision

Thank you for approving "Partial Purification and Characterization of Streptomyces capoamus Endoglucanases". An email has been sent to you confirming that the journal has received this submission. Your Co-Author(s) may also receive this email, depending on the journal policy.



Mendeley

To keep track of how your article is performing
[get your Author stats on Mendeley](#)

[Main Menu](#)

ANEXO B – REGRAS DE SUBMISSÃO DA REVISTA ELECTRONIC JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY (ISSN: 0717-3458)

18/08/2017

Submissions



Electronic Journal of Biotechnology

- Log In
- New issue alert
- Submit a manuscript
- Register

HOME
ABOUT
EDITORIAL BOARD
SEARCH
ARCHIVES
CURRENT
FORTHCOMING

Home > About the Journal > **Submissions**

- » [Online Submissions](#)
- » [Guide for Authors](#)
- » [Copyright Notice](#)
- » [Privacy Statement](#)

Online Submissions

Already have a Username/Password for Electronic Journal of Biotechnology on **Elsevier Editorial System?**
[Go To Login](#)

Need a Username/Password?
[Go To Registration](#)

Registration and login are required to submit items online and to check the status of current submissions.

NOTICE: Electronic Journal of Biotechnology is being published through EES (Elsevier Editorial System) since the beginning of January 2014.

The Journal will continue being an Open Access publication and its articles will be additionally available - free for the readers-, through the ScienceDirect web site (www.sciencedirect.com).

Guide for Authors

Contributions falling into the following categories will be considered for publication: Original research papers, reviews and short communications.

For more information please see [Content Types](#)

All manuscripts should be prepared in English with Microsoft Word or WordPerfect and sent through [Online Submissions](#). [Figures](#), [graphs](#) and [tables](#) should be included in the manuscript file.

Receipt of each article is acknowledged by e-mail to the contacting author upon receipt. Preliminary articles will not be considered for publication. The manuscript is read and examined for conformity to the [Guide for Authors](#) by the editor. Failure to meet the criteria outlined may result in return of the manuscript for corrections before evaluation.

The guidelines for manuscript evaluation are available [here](#).

1. Use of wordprocessing software

It is important that the file be saved in the native format of the wordprocessor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts. Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on [Electronic illustrations](#).

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the "spell-check" and "grammar-check" functions of your wordprocessor.

2. LaTeX

You are recommended to use the Elsevier article class [elsarticle.cls](#) to prepare your manuscript and [BibTeX](#) to generate your bibliography. Our [LaTeX site](#) has detailed submission instructions, templates and other information.

3. Article structure

3.1. Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to "the text". Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

For details on structure revise section [Content Types](#).

3.2. Essential title page information

JOURNAL TOOLS

Information

- For Readers
- For Authors
- For Librarians

Journal Content Search

Browse

- By Issue
- By Author
- By Title

Frequently Asked Question (FAQ)

- General
- Subscription
- Technical support
- Contact
- How to search

THIS JOURNAL IS INDEXED AT :

- Web of Science
- SCOPUS

JOURNAL INDICATORS

JCR	SJR	Quartile
1.527		

SHARE 2

SOCIAL

Follow @EJBiotechnology

UNIQUE VISITORS

19,936	3,675	1,907
17,238	3,063	1,839
12,437	2,432	1,806
8,524	2,184	1,798
6,850	2,014	1,611
5,442	1,971	1,591

FLAG counter

http://www.ejbiotechnology.info/index.php/ejbiotechnology/about/submissions#authorGuidelines

18/08/2017

Submissions

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Short title.** Provide a short title having no more than 80 characters including spaces. This will be used for metadata.
- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name, and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, and also post-publication. If possible, indicate an alternative e-mail for contact. Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author. The Corresponding author is responsible that every coauthor has contributed to the ms and has accepted to publish the manuscript.
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a "Present address" (or "Permanent address") may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Changes to authorship

Modifications to authorship are not allowed, this policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts.

3.3. Abstract

The abstract of the manuscript should not exceed 250 words and must be structured into separate sections: **Background**, the context and purpose of the study; **Results**, the main findings; **Conclusions**, brief summary and potential implications. Please minimize the use of abbreviations and do not cite references in the abstract.

In case of review articles, the abstract should be submitted as one section.

3.4. Keywords

Authors must provide between four and eleven keywords, **which must not be part of the title of the paper**. Also Keywords will be added in order to improve manuscript visibility.

3.5. Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

3.6. Acknowledgements and financial support

Indicate Acknowledgments and Financial support in separate sections at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List in acknowledgments those individuals who provided help during the research (e.g., providing language or writing assistance, or proof reading the article, etc.).

3.7. Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

3.8. Nomenclature and units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI) (<http://physics.nist.gov/Pubs/SP330/sp330.pdf>). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI. Authors wishing to present a table of nomenclature should do so on the second page of their manuscript.

3.9. Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

3.10. Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used.

18/08/2017

Submissions

Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

3.11. References

For original articles (research, short communications), at least 75% of the references must be from the [Science Citation Index Expanded](#) and at the same time from the last decade. Also **the DOI number must be included** at the end of each reference.

3.11.1. Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). References en abstract should be avoided. Unpublished results; personal communications and thesis are not allowed. Citation of a reference as "in press" implies that the item has been accepted for publication.

3.11.2. Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

3.11.3. Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support [Citation Style Language styles](#), such as [Mendeley](#) and [Zotero](#), as well as [EndNote](#). Using the word processor plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide.

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/electronic-journal-of-biotechnology>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice.

3.11.4. Reference style

Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

Example: '..... as demonstrated [3,6]. Barnaby and Jones [8] obtained a different result'

Reference section: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] Van der Geer J, Hanraads JA, Lupton RA. The art of writing a scientific article. *J Sci Commun* 2000;163:51-9. Doi: <http://dx.doi.org/doi>.

Reference to a book:

[2] Strunk Jr W, White EB. *The elements of style*. 3rd ed. New York: Macmillan; 1979.

Reference to a chapter in an edited book:

[3] Mettam GR, Adams LB. How to prepare an electronic version of your article. In:

Jones BS, Smith RZ, editors. *Introduction to the electronic age*. New York: E- Publishing Inc; 1999, p. 281-304.

For more than 6 authors the first 6 should be listed followed by 'et al.'

IMPORTANT: Please provide the article's Digital Object Identifier (DOI) at the end of each reference in the following format: e.g. <http://dx.doi.org/10.2225/vol16-issue5-fulltext-12>

3.11.6. Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to:

Web of Science Journal Title Abbreviations:
http://images.webofknowledge.com/WOK46/help/WOS/A_abrvit.html

CAS Source Index (CASSI) Search Tool: <http://cassi.cas.org/search.jsp>

NLM Catalog: Journals referenced in the NCBI Databases:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog/journals>

4. Artwork

4.1. Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Symbol.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.

18/08/2017

Submissions

- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired size of the printed version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available at: <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

4.2. Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/half-tone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (like GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

4.3. Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF, EPS or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color, then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., Science Direct and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version.

4.4. Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

The figures (photographs, drawings) must be numbered with Arabic numerals. Footnotes can be included below the figure.

Figures that include more than one image should be labeled as a, b, c, etc. (lower case, use black or white bold according to the figure).

Example:

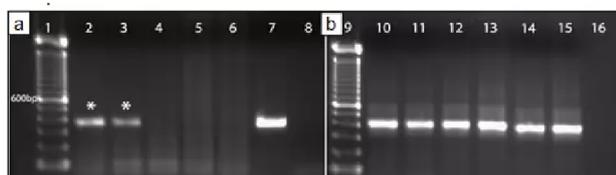


Fig. 2. Genotyping of founder animals. (a) PCR amplification of DNA samples obtained from weaned pups, using primers for luciferase gene (lanes 2 to 8, amplification product 380 bp) and (b) internal control primers for GAPDH gene (lanes 10 to 16, amplification product 410 bp). DNA from a luciferase transgenic mouse and from a wild-type C57BL/6 mouse was used as template for positive controls (lane 7 and 15). Lanes 8 and 16 are negative controls (no DNA). Lane 1: 100 bp ladder (Invitrogen).

4.5. Graphs

Graphs should be cited as figures and must be numbered with Arabic numerals. Footnotes can be included below the figure.

Graphs that include more than one image should be labeled as a, b, c, etc. (Arial lower case). They must be in 2D and have a title. In case they have legend, it must be placed below the image. They should be built with Arial font and in the colour palette called "Trek" (warm earth colours). Graphs must be sent in editable formats (MS excel if possible). We also accept Sigma plot and Origin) in order to make formal changes (colour, fonts, size, etc.).

Examples:

Column chart:

18/08/2017

Submissions

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

4.8. GenBank/DNA sequence linking

DNA sequences and GenBank Accession numbers: Many Elsevier journals cite "gene accession numbers" in their running text and footnotes. Gene accession numbers refer to genes or DNA sequences about which further information can be found in the database at the National Center for Biotechnical Information (NCBI) at the National Library of Medicine. Elsevier authors wishing to enable other scientists to use the accession numbers cited in their papers via links to these sources, should type this information in the following manner:

For each and every accession number cited in an article, authors should type the accession number in bold text. Letters in the accession number should always be capitalized. (See Example 1 below). This combination of letters and format will enable Elsevier's typesetters to recognize the relevant texts as accession numbers and add the required link to GenBank's sequences.

Example 1: "GenBank accession nos. **AI631510**, **AI631511**, **AI632198**, and **BF223228**, a B-cell tumor from a chronic lymphatic leukemia (GenBank accession no. **BE675048**), and a T-cell lymphoma (GenBank accession no. **AA361117**)".

Authors are encouraged to check accession numbers used very carefully. An error in a letter or number can result in a dead link. In the final version of the printed article, the accession number text will not appear bold or underlined (see Example 2 below).

Example 2: "GenBank accession nos. AI631510, AI631511, AI632198, and BF223228, a B-cell tumor from a chronic lymphatic leukemia (GenBank accession no. BE675048), and a T-cell lymphoma (GenBank accession no. AA361117)".

In the final version of the electronic copy, the accession number text will be linked to the appropriate source in the NCBI databases enabling readers to go directly to that source from the article.

Submission Preparation Checklist

As part of the submission process, authors are required to check off their submission's compliance with all of the following items, and submissions may be returned to authors that do not adhere to these guidelines.

1. I confirm the acceptance of the publication charge of US\$1.100 and the publication method.
2. The submission has not been previously published, not is being considered for publication in another journal.
3. The submission file is in Microsoft Word 2003 (.doc), Word 2007 (.docx) or RTF (.rtf) document file format.
4. Figures and Tables are included in the manuscript file. Files greater than 5.0 MB will be send as complementary files.
5. At least 75% of the cited articles are from the last decade and at the same time from the [ISI Science Citation Index Expanded](#).
6. Where available DOIs for the references they are provided at the end of each citation.
7. The text follows to the stylistic and bibliographic requirements outlined in the [Guide for Authors](#).
8. I am a native English speaker, but if it is not my first language, my manuscript was revised by a native English speaker.
9. I have read carefully and followed [Guide for Authors](#).

Copyright Notice

Upon acceptance of an article by the journal, authors will be asked to transfer the copyright to **Electronic Journal of Biotechnology**, which is committed to maintain the electronic access to the journal and to administer a policy of fair control and ensure the widest possible dissemination of the information. The author can use the article for academic purposes, stating clearly the following: "Published in Electronic Journal of Biotechnology at DOI:10.2225/volXX-issueX-fulltext-XX".

The [Copyright Transfer Agreement](#) must be submitted as a signed scanned copy to biotec@ucv.cl. All authors must send a copy of this document.

Privacy Statement

The name and e-mail addresses entered in our journal site will be used exclusively for the stated purposes of this journal and will not be made available for any other purpose or to any other party.

ISSN: **0717-3458**

Contact: edbiotec@pucv.cl

Pontificia Universidad Católica de Valparaíso
Av. Brasil 2950, Valparaíso, Chile

<http://www.ejbiotechnology.info/index.php/ejbiotechnology/about/submissions#authorGuidelines>

6/7

18/08/2017

Submissions

Copyright © 1997- 2017 by Electronic Journal of Biotechnology