

Bioprospecção de actinobactérias produtoras de enzimas de interesse da biotecnologia agroindustrial¹

Maria Rita Francielle Gomes¹ e Ivanildo Evódio Marriel²

¹ Estudante do Curso de Agronomia da Universidade Federal de São João del-Rei, Bolsista PIBIC do Convênio CNPq/Embrapa;

² Agrônomo, DSc em Agronomia, Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo;

Introdução

A bioprospecção e o uso de genomas, genes ou produtos de origem microbiana tornaram-se, atualmente, estratégia indispensável como base futura dos desenvolvimentos agrícolas, ambientais e industriais sustentáveis. O termo bioprospecção tem sido utilizado para descrição da busca sistemática e organizada de produtos úteis derivados de recursos biológicos, incluindo plantas, microrganismos, animais, etc., que possam ser desenvolvidos para garantir seu uso racional, assegurar uma distribuição justa e igualitária dos benefícios obtidos para a sociedade em geral, além da promoção e regulamentação de novas tecnologias para comercialização (Pushpangadan et al., 2017).

No caso de microrganismos, a bioprospecção abrange principalmente estratégias para exploração e conhecimento da fração cultivável e não cultivável da biodiversidade microbiana, bem como seus papéis funcionais no ambiente, tornando-se um dos principais focos da era biotecnológica para soluções sustentáveis em setores agroindustriais diversos de interesse global (Singh et al., 2018; Silva et al., 2015).

Dentre os microrganismos presentes no solo, encontram-se as actinobactérias, que são bactérias filamentosas Gram-positivas com alta concentração de guanina e citosina no DNA (Barka et al., 2016). Estas bactérias desempenham um papel importante na reciclagem de resíduos orgânicos e nutrientes no meio ambiente, mas têm sido exploradas com sucesso principalmente como fonte de milhares de produtos metabólicos secundários biologicamente ativos de interesse biotecnológico na agroindústria. Dentre esses metabólitos incluem-se notadamente glicopeptídeos, beta-lactâmicos, aminoglicosídeos, polienos, policetidos, macrolidos, actinomicinas e tetraciclinas e enzimas e produtos antimicrobianos (Barka et al., 2016).

As enzimas são catalisadores biológicos que possuem estrutura molecular complexa, sendo constituída principalmente por uma parte proteica, agregada ou não a carboidratos e lipídeos, com elevados valores de mercado. Sua eficiência como catalisadores de reações em organismos vivos ocorre pela otimização de processos e sustentabilidade ambiental, pois na maioria dos casos agem sob condições naturais de temperatura e pressão (Monteiro; Silva, 2009; Bon et al., 2008).

Dentre as enzimas de importância agroindustrial produzidas por actinobactérias, destacam-se as celulasas, amilases, pectinases e proteases, cujos substratos são constituintes de microrganismos como fungos fitopatogênicos, insetos e/ou de plantas. Consequentemente, são biocatalisadores relevantes com vasta aplicabilidade em setores agrícolas, industriais, alimentícios, têxteis, papéis, biocombustíveis, tratamento de resíduos orgânicos, etc. (Monteiro; Silva, 2009; Orlandelli et al., 2012; Silva et al., 2015; Gomaa, 2013; Kumar et al., 2005; Rao et al., 1998). Em processos agropecuários, vale salientar o emprego de tais ferramentas biotecnológicas em processos de compostagem, produção de biocombustíveis e de controle biológico de microrganismos causadores de doenças em culturas de importância econômica relevante.

Celulase é o complexo de enzimas capaz de formar glicose a partir da hidrólise de celulose, sendo o constituinte natural mais abundante dos compostos orgânicos. Essas enzimas têm uma vasta

aplicabilidade, podendo ser utilizadas na agricultura e na indústria, e possuem um papel importante no ciclo de carbono, pois são capazes de degradar a porção insolúvel da celulose, com grande aplicabilidade na indústria de papel (Orlandelli et al., 2012; Silva et al., 2015). A celulose é considerada o maior constituinte da biomassa vegetal, sendo o biopolímero mais abundante no mundo e, com isso, uma fonte sustentável para processos industriais (Mansfield; Meder, 2003).

A amilase encontra-se entre as classes mais relevantes de enzimas apresentando grande importância para os processos biotecnológicos, por sua ampla aplicação industrial (Pandey et al., 2000). Sua importância está evidenciada em diversos setores como o da indústria têxtil, alimentícia, predominantemente na panificação, bebidas, ração animal, liquefação e sacarificação do amido, indústria química e farmacêutica. Constituinte, assim, o principal grupo de enzimas utilizadas na indústria alimentícia. Sua atividade catalítica resultante é a clivagem de ligações glicosídicas do amido, do glicogênio e de outros oligossacarídeos (Gomaa, 2013).

As pectinases são responsáveis pela despolimerização da pectina por meio de hidrólise e transesterificação, assim como por reações de desesterificação, isto é, possuem a capacidade de hidrolisar a cadeia éster entre os grupos carboxila e metil da pectina (DARTORA *et al.*, 2002). A principal aplicação de enzimas pectinolíticas é na indústria de alimentos, sendo extensivamente usadas na produção de sucos de frutas e vinhos (Uenojo; Pastore, 2007).

As proteases, responsáveis pela hidrólise de ligações peptídicas presentes em moléculas de proteínas, originando assim peptídeos menores e aminoácidos (Rao et al., 1998), são utilizadas na indústria farmacêutica, alimentícia, química e de couro. Proteases de origem microbiana constituem um dos grupos de maior importância das enzimas mundialmente utilizadas na indústria, com representação de 60% do mercado total (Kumar et al., 2005).

Objetivo

Avaliar o potencial enzimático e selecionar actinobactérias produtoras de enzimas de interesse na agroindústria.

Material e Métodos

Ativação das culturas e expressão do índice enzimático

Para a avaliação da atividade enzimática foram reativadas 77 actinobactérias preservadas na Coleção de Microrganismo da Embrapa Milho e Sorgo. Os microrganismos foram cultivados em meio de cultura seletivo para actinobactérias através da técnica de esgotamento. Em seguida, as placas foram incubadas a 30 °C durante 10 dias.

A avaliação da atividade hidrolítica das enzimas amilase, celulase, pectinase e proteases foi estimada através da formação de halo após tratamento específico para cada enzima e expressado através do índice enzimático (IE), estimado pela equação: $IE = (DH+DC)/DC$; sendo DH equivalente ao diâmetro em mm do halo descolorido e DC ao diâmetro em mm das colônias dos isolados (Lealem; Gashe, 1994).

A classificação dos organismos produtores de enzimas correlaciona diretamente o diâmetro do halo de degradação com a habilidade degradativa, sendo aconselhado um $IE \geq 2,0$ para considerar um microrganismo como bom produtor de enzimas em meio sólido (Lealem; Gashe, 1994).

Atividade da enzima celulase

A atividade celulolítica foi avaliada de acordo com a metodologia preconizada por Teather e Wood (1982). Os diferentes isolados foram cultivados em placa de petri contendo 20 mL de meio de cultura mínimo M9 (5 g.L⁻¹ de extrato de levedura, 12,8 g.L⁻¹ de Na₂HPO₄ .7H₂O, 3 g.L⁻¹ KH₂PO₄, 0,5 g.L⁻¹ de NaCl, 1 g.L⁻¹ de NH₄Cl, 5 g.L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O, 0,01 g/L de CaCl₂ .2H₂O, 15 g/L de ágar) com carboximetilcelulose (10g L⁻¹) como fonte de carbono. Após 48 h de crescimento microbiano na temperatura de 30 °C, efetuou-se a detecção da atividade enzimática pela visualização de halos de hidrólise da celulose em torno de cada colônia, após tratamento das placas com lugol (2,0g KI e 1,0g de iodo em 300 mL de água destilada), durante 15 minutos. A atividade da celulase foi expressa através do cálculo de índice enzimático descrito acima.

Atividade da enzima pectinase

A atividade pectinolítica foi verificada após os isolados crescidos em meio mínimo M9. No entanto, na composição do meio de cultura a fonte de carbono CMC foi substituída por pectina cítrica na mesma quantidade, e o pH ajustado para 8,0. Após o período de incubação e o crescimento dos isolados, foram adicionados 10 mL Lugol, e em seguida as placas foram lavadas com água deionizada. A capacidade pectinolítica dos microrganismos avaliados foi determinada pela formação de um halo descolorido em torno da colônia e o IE estimado como descrito anteriormente.

Atividade da enzima protease

A avaliação da atividade proteolítica foi realizada através do crescimento dos isolados em meio YMA modificado (Yeast Malt Agar) (1% de glicose; 0,3% de extrato de levedura; 0,3% de extrato de malte; 0,5% de peptona bacteriana; 1% de caseína; 1,5% de ágar), tendo o pH ajustado para 6,5. Após inoculação, as placas foram incubadas a 30 °C por 4 dias, e em seguida foram adicionados 5mL de ácido acético 5% às placas, deixando agir por 5 minutos; por fim a atividade proteolítica dos microrganismos foi avaliada por causa da formação de uma zona clara em torno das colônias e IE estimado como já descrito.

Atividade da enzima amilase

Conforme metodologia descrita por Coon et al. (1957), para a atividade amilolítica os actinomicetos foram inoculados no meio de cultura ágar amido (6,6 g.L⁻¹ de amido solúvel, 0,5 g.L⁻¹ de cloreto de sódio, 3 g.L⁻¹ de extrato de carne, 1 g.L⁻¹ de peptona caseína, 15 g.L⁻¹ de ágar; pH 7,0). Após a inoculação as placas foram incubadas a 30 °C por 7 dias. Em seguida foram adicionados 10 mL de solução diluída de lugol (5 g.L⁻¹ de iodo, 10 g.L⁻¹ de iodeto de potássio) em cada placa. A eficiência da atividade amilolítica foi determinada pela formação de halo amarelo ao redor da colônia e o cálculo do IE, como descrito antes, indicando a produção de amilase.

Resultados e Discussão

Os resultados observados para a atividade das enzimas em diferentes isolados de actinobactérias estão apresentados nas Figuras de 1 a 4.

Dentre os isolados testados, dez (12,98%) não formaram halo, indicando que os microrganismos não foram eficientes em produzir enzimas que degradam a celulose presente nas condições impostas. Entre eles, catorze isolados (18,2%) apresentaram IE < 2, indicando baixa

atividade celulolítica e 53 isolados (68,8%) apresentaram $IE \geq 2$, sendo então classificados como potenciais produtores de celulase de acordo com Lealem e Gashe (1994) (Figura 1). Microrganismos que apresentam essa característica destacam-se na natureza, pois estabelecem um elo chave na ciclagem do carbono (Ruegger; Tauk-Tornisielo, 2004) e também formação de húmus (Padilha, 1998). Tendo um papel importante em processos de compostagem, dando origem a um produto que posteriormente poderá ser utilizado como fertilizante agrícola, biofiltros, na biorremediação e também na produção de cogumelos comestíveis (Silva, 2010). Como potenciais produtores de celulase esses microrganismos podem ser considerados agentes promissores para o controle biológico de fungos fitopatogênicos. Demonstram papel importante também na fabricação de ração animal, melhorando sua digestibilidade para os animais, na indústria alimentícia, favorecendo a qualidade nutricional dos alimentos, remove a parede celular de certos alimentos, contribuindo para a melhor percepção de aroma e sabor. Bem como nas indústrias têxtil, de papel e celulase (Melo; Azevedo, 1998; Mandels, 1985).

Quanto à atividade pectinolítica, dentre os isolados avaliados, dezessete (22,1%) não apresentaram formação de halo nas condições oferecidas, apenas 4 (5,2%) isolado apresentou $IE < 2$ e 56 (72,7%) apresentaram $IE \geq 2$, o que os classifica como potenciais produtores de pectinase (Lealem; Gashe, 1994) (Figura 2). Potenciais produtores de enzimas pectinolíticas são empregados principalmente na indústria alimentícia, tendo papel no amadurecimento de frutas, redução de viscosidade e clarificação em sucos de frutas, em indústrias vinícolas para tratamento preliminar no suco de uva, fermentação de chá e chocolate, para extrair polpa de tomate, em tratamento residual de vegetais, degomagem de fibras, extração de óleos e no enriquecimento proteico de alimentos infantis, substituindo os processos químicos (Uenojo; Pastore, 2007).

Em relação à atividade proteolítica, 44 isolados (57,1%) não demonstraram formação de halo nas condições disponibilizadas. Entre estes, dez isolados (13%) obtiveram $IE < 2$ e apenas 23 isolados (29,9 %) obtiveram $IE \geq 2$, demonstrando potencialidade na produção de proteases (Lealem; Gashe, 1994) (Figura 3). Microrganismos bons em produzir proteases são utilizados na produção de leites e derivados, alterando as propriedades funcionais das proteínas do leite, desenvolvendo sabores característicos, modificando a gordura da manteiga utilizada para o preparo de caramelos, requeijões e condimentos (molhos). Essas enzimas têm sido empregadas também na fabricação de queijos, para redução do tempo de cura, visto que este tempo tem um alto custo de produção (Vitolo, 2001).

Sobre a produção de amilases, dezesseis (20,8%) não apresentaram formação de halo, indicando que os microrganismos não foram eficientes na produção nas condições avaliadas. Entre eles, oito isolados (10,4%) apresentaram $IE < 2$, indicando baixa atividade amilolítica e 53 isolados (68,8%) apresentaram $IE \geq 2,0$, sendo então classificados como potenciais produtores de amilase de acordo com Lealem e Gashe (1994) (Figura 4). Como produtores de amilases podem ser utilizados em indústrias têxteis, de papel e celulose, couro, detergentes, para produção de cervejas e bebidas destiladas, cereais para alimentação infantil, liquefação e sacarificação do amido, ração animal, indústria química e farmacêutica. Na panificação, elas têm como objetivo facilitar a manipulação da massa nas máquinas, além de serem responsáveis por aumentar a disponibilidade de açúcar fermentescível na massa, elevando o paladar e a qualidade da tostagem do pão (Vitolo, 2001; Van Dam; Hille, 1992).

Atividade Celulolítica

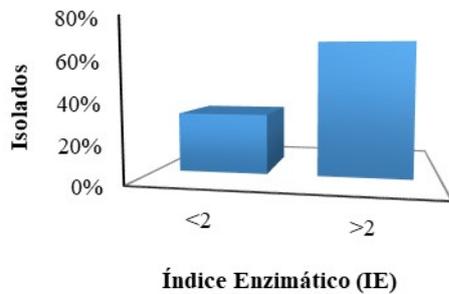


Fig. 1. Distribuição dos isolados (%) de actinobactérias com base no índice enzimático.

Atividade Pectinolítica

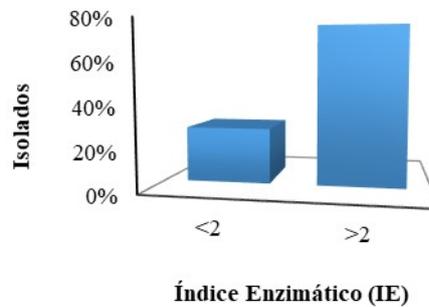


Fig. 2. Distribuição dos isolados (%) de actinobactérias com base no índice enzimático.

Atividade Proteolítica

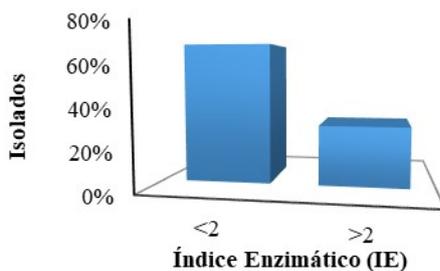


Fig. 3. Distribuição dos isolados (%) de actinobactérias com base no índice enzimático.

Atividade Amilolítica

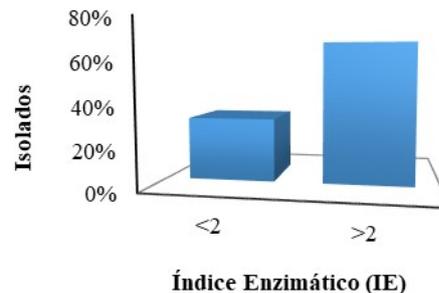


Fig. 4. Distribuição dos isolados (%) de actinobactérias com base no índice enzimático.

Por fim, dos 77 isolados avaliados, houve aqueles que se destacaram, apresentando um índice enzimático elevado para as enzimas, de interesse agroindustrial, avaliadas neste estudo.

Quadro 1. Isolados avaliados que se destacaram quando a degradação de enzimas agroindustriais.

Isolado	Amilase	Celulase	Pectinase	Protease
A 92	0	4,74	0	0
A 405	2,71	4,29	5,00	2,16
ACT 648	4,25	2,47	9,60	4,66
AEJ 57	0	3,86	9,00	3,50
ACT 83	11,0	3,60	9,30	1,71
AM 45	8,00	6,99	4,16	3,50
AC 91	8,66	2,58	3,60	1,66

Conclusão

Os resultados demonstraram que foi possível a seleção de isolados de actinobactérias com potencial de uso agroindustrial com base nas enzimas celulase, protease, pectinase e amilase. Entre os isolados testados, o A 92 e o A 405 demonstraram maior atividade celulolítica, quanto à atividade

proteolítica os isolados ACT 648 e AEJ 57 foram os que mais se destacaram. Já em relação à atividade pectinolítica os isolados que mostraram maior eficiência foram o ACT 83 e o AEJ 57, por fim os isolados que apresentaram maior atividade amilolítica foram o AM 45 e o AC 91.

Referências

BARKA, E. A.; VATSA, P.; SANCHEZ, L.; GAVEAU-VAILLANT, N.; JACQUARD, C.; KLENK, H. P.; CLÉMENT, C.; OUHDOUCH, Y.; VAN WEZELD G. P. Taxonomy, physiology, and natural products of actinobacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 80, n. 1, p. 1-43, 2016.

BON, E. P. S.; PEREIRA JÚNIOR, N.; GOTTSCHALK, L. M. F.; SÁPEREIRA, P.; ROSEIRO, J. C.; FERRARA, M. A. Bioprocessos para produção de enzimas In: BON, E.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. (Ed.). **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicação e mercado**. Rio de Janeiro: Interciências, 2008. p. 95-122.

COON, H. J.; JENNISON, M. W.; WEEK, O. B. Routine tests for the identification of bacteria. In: SOCIETY OF AMERICAN BACTERIOLOGISTS. **Manual of microbiological methods**. New York: McGraw-Hill, 1957. p. 239-262.

GOMAA, E. Z. Some applications of α -amylase produced by *Bacillus subtilis* NCTC10400 and *Bacillus cereus* ATCC 14579 under solid state fermentation. **African Journal of Microbiology Research**, v. 7, n. 29, p. 3720-3729, 2013.

KUMAR, S.; SHARMA, N. S.; SAHARAN, M. R.; SINGH, R. Extracellular acid protease from *Rhizopusoryzae*: purification and characterization. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 5, p. 1701-1705, 2005.

LEALEM, F.; GASHE, B. A. Amylase production by a Gram-positive bacterium isolated from fermenting tef (*Eragrostis tef*). **Journal of Applied Bacteriology**, v. 77, p. 348-352, 1994.

MANDELS, M. Applications of cellulases. **Biochemical Society Transactions**, v. 13, p. 414-415, 1985.

MANSFIELD, S. D.; MEDER, R. Cellulose hydrolysis: the role of monocomponent cellulases in crystalline cellulose degradation. **Cellulose**, v. 10, p. 159-169, 2003.

MELO, I. S. de; AZEVEDO, J. L. de (Ed.). **Controle biológico**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 1998. v. 1.

MONTEIRO, V. N.; SILVA, R. N. Aplicações industriais da biotecnologia enzimática. **Revista Processos Químicos**, v. 3, p. 9-23, 2009.

ORLANDELLI, R. C.; SPECIAN, V.; FELBER, A. C.; PAMPHILE, J. A. Enzimas de interesse industrial: produção por fungos e aplicações. **Revista de Saúde e Biologia**, v. 7, n. 3, p. 97-109, set./dez. 2012.

PADILHA, G. Biologia molecular de *Streptomyces* e aplicações industriais. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.). **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 1998. p. 327-343.

PANDEY, A.; NIGAM, P.; SOCCOL, C. R.; SOCCOL, V. T.; SINGH, D.; MOHAN, R. Advances in microbial amylases. **Biotechnology Applied and Biochemical**, v. 31, p. 135-152, 2000.

PUSHPANGADAN, P.; GEORGE, V.; IJINU, T. P.; CHITHRA, M. A. Biodiversity, bioprospecting, traditional knowledge, sustainable development and value added products: a review. **Journal of Traditional Medicine & Clinical Naturopathy**, v. 7, n. 1, article 1000256, 2017.

RAO, M. B.; TANKSALE, A. M.; GHATGE, M. S.; DESHPANDE, V. V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 3, p. 597-635, 1998.

RUEGGER, M. J. S.; TAUKE-TORNISIELO, S. M. Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Jureia-Itatins, São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 27, n. 2, p. 205-211, 2004.

SILVA, L. C. B. **Identificação de actinobactérias e *Thermoactinomyces* spp. isolados do processo de compostagem para a produção de *Agaricus brasiliensis***. 2010. 89 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

SILVA, V. M. A.; BRITO, F. A. E.; RAMOS, K. A.; SILVA, R. M.; MARTINS, C. M.; MARTINS, S. C. S. Atividade enzimática de actinobactérias do semiárido. **Revista Brasileira de Geografia Física**, v. 8, p. 560-572, 2015.

SINGH, J.; SHARMA, D.; KUMAR, G.; SHARMA, N. R. **Microbial bioprospecting for sustainable development**. Singapore: Springer, 2018. 397 p.

TEATHER, R. M.; WOOD, P. J. Use of congo red polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 43, p. 777-780, 1982.

UENOJO, M.; PASTORE, G. M. Pectinases: aplicações indústrias e perspectivas. **Química Nova**, 30, n. 2, p. 388-394, 2007.

VAN DAM, H. W.; HILLE, J. D. R. Yeast and enzymes in breadmaking. **Cereal Foods World**, v. 37, n. 3, p. 245-252, 1992.

VITOLO, M. Aplicações de enzimas na tecnologia de alimentos. In: AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A. (Coord.). **Biotecnologia na produção de alimentos**. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. p. 387-420.