

# CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE LEVEDURAS ISOLADAS A PARTIR DE COMPOSTAGEM

Cíntia Martins Amorim<sup>1</sup>

João Carlos Maia Dornelas de Oliveira<sup>2</sup>

## RESUMO

Enzimas são produtos biotecnológicos amplamente utilizados em diversos setores da indústria. Microrganismos são altamente capazes de sintetizar inúmeras enzimas de interesse industrial. Leveduras são eucariotos unicelulares, que apresentam características de interesse para utilização em diversos segmentos da indústria, devido o elevado potencial em produzir enzimas hidrolíticas. Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi caracterizar e avaliar a atividade enzimática para amilase, pectinase e protease de leveduras isoladas do processo de compostagem da Faculdade Ciências da Vida. Foi realizado o processamento das amostras de compostagem e posterior plaqueamento em meio sólido para caracterizar morfologicamente as leveduras isoladas. Em seguida, os isolados foram inoculados em meios com diferentes fontes de carbono, na forma de *spots*, para avaliação da atividade enzimática. A atividade enzimática foi avaliada semiquantitativamente por meio do índice enzimático (IE). Os resultados mostraram alta variabilidade morfológica entre os 28 isolados de leveduras obtidos. O IE variou de 0 a 3,33 demonstrando o elevado potencial biotecnológico de algumas cepas. Os isolados L25 e L7 apresentaram os maiores valores para amilase, enquanto que os isolados L12 e L4 para pectinase e L18 para protease. Os resultados apresentados neste estudo mostraram alta variabilidade entre as leveduras com alto potencial de uso em processos industriais.

**Palavras-chave:** Enzimas hidrolíticas. Amilase. Pectinase. Protease.

## ABSTRACT

Enzymes are biotechnological products widely used in various sectors of industry. Microorganisms are highly able to synthesize countless enzymes of industrial interest. Yeasts are unicellular eukaryotes that present characteristics of interest for use in various industry segments due to their high potential for producing hydrolytic enzymes. In this context, the objective of the present work was to characterize and evaluate the enzymatic activity for yeast amylase, pectinase and protease isolated from the composting process from Faculdade Ciências da Vida. The composting samples were processed and later plated in solid midst to morphologically characterize the isolated yeasts. Then, the isolates were inoculated in means with different carbon sources, in the form of spots, to evaluate the enzymatic activity. The enzymatic activity was evaluated semiquantitatively using the enzymatic index (EI). The results showed high morphological variability among the 28 obtained yeast isolates. The IE ranged from 0 to 3.33 demonstrating the high biotechnological potential of some strains. The isolates L25 and L7 had the highest values for amylase, while isolates L12 and L4 for pectinase and L18 for protease. The results presented in this study showed high variability among yeasts with high potential for use in industrial processes.

**Key-words:** Hydrolytic enzymes. Amylase. Pectinase. Protease.

---

<sup>1</sup> Cíntia Martins Amorim; Graduada em Biotecnologia, na Faculdade Ciências da Vida, Sete Lagoas/MG; e-mail: cintiamartins328@gmail.com.

<sup>2</sup> João Carlos Maia Dornelas de Oliveira; Mestre em Ciências, na Universidade Federal de São João del-Rei; Docente da Faculdade Ciências da Vida, Sete Lagoas/MG; e-mail: joacmndo@yahoo.com.br.

## 1 INTRODUÇÃO

Enzimas são proteínas amplamente utilizadas como catalisadores biológicos em diversos setores da indústria, tais como nas indústrias têxtil, alimentícia, papel, detergentes e couro (PATEL; SINGHANIA; PANDEY, 2016; LIU; KOKARE, 2017; NELSON; COX, 2018). Os microrganismos são capazes de produzir uma vasta gama de compostos enzimáticos, os quais foram explorados comercialmente ao longo da história da humanidade sendo a primeira aplicação para fins comerciais, realizada por meio da utilização de leveduras na produção de bebidas alcoólicas por meio de fermentação (PATEL; SINGHANIA; PANDEY, 2016; SINGH *et al.*, 2016; ELSHANI *et al.*, 2018).

Os microrganismos utilizados em processos biotecnológicos podem ser obtidos de fontes naturais, como o solo, água, plantas e animais vivos, águas residuais e manguezais (GRIEBELER *et al.*, 2015; SANTOS; BATISTA, 2015; SILVA, 2018). O processo de isolamento de estirpes também pode ocorrer em fontes como a compostagem, onde existe grande abundância de estirpes de interesse biotecnológico, que são na maioria das vezes desconhecidas ou pouco exploradas (MELO *et al.*, 2015; RAMOS *et al.*, 2018).

Dentre os microrganismos, as leveduras apresentam características de interesse para utilização em diversos processos biotecnológicos, devido o elevado potencial destes eucariotos em produzir enzimas hidrolíticas extracelulares (SINGH *et al.*, 2016). Neste contexto, os fungos leveduriformes existentes no processo de compostagem se destacam como uma alternativa sustentável e promissora para a produção de enzimas hidrolíticas de interesse biotecnológico e aplicação nos mais diversos segmentos da indústria.

Diante do exposto, o presente trabalho apresenta a seguinte problemática: leveduras presentes em processo de compostagem possuem potencial em sintetizar enzimas hidrolíticas de interesse biotecnológico? Para que fosse possível responder a referida questão norteadora, levantou-se a hipótese de que no substrato orgânico proveniente do processo de compostagem existe uma alta diversidade de leveduras produtoras de biomoléculas pouco estudadas.

Para testar essa hipótese esse trabalho teve por objetivo geral caracterizar morfológicamente e avaliar a atividade enzimática para amilase, pectinase e protease de leveduras isoladas do processo de compostagem da Faculdade Ciências da Vida. Para responder os objetivos, a metodologia escolhida possui natureza descritiva, com caráter qualitativo e semiquantitativo, e corte transversal.

Este trabalho é de grande importância, visto que a demanda por microrganismos produtores de enzimas de interesse comercial é crescente. Assim sendo, a busca de alternativas ecológicas é de grande interesse para práticas sustentáveis o que torna imprescindível identificar e conhecer mais sobre as características de leveduras ainda pouco exploradas.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 ENZIMAS

Enzimas são proteínas de estrutura terciária ou quaternária que agem como catalisadores biológicos e estão envolvidas em todos os processos metabólicos, atuando em quase todas as transformações químicas que ocorrem nas células (NELSON; COX, 2018). As enzimas se ligam a um ou mais ligantes, chamados de substratos, e os convertem em produtos modificados quimicamente com extrema rapidez, acelerando as reações e agindo como catalisadores que permitem formar ou quebrar ligações covalentes (VILELA, 2018).

O local catalítico destas macromoléculas é frequentemente localizado em bolsas hidrofóbicas, o que determina a especificidade para o seu substrato, e é denominado sítio ativo. A molécula que liga no sítio ativo e sobre a qual a enzima age é denominada substrato. O complexo enzima-substrato é fundamental para a ação enzimática (NELSON; COX, 2018).

As enzimas podem ser agrupadas em classes funcionais com base no tipo de reação química que catalisam, por exemplo: proteases promovem a quebra de proteínas pela hidrólise das ligações peptídicas entre os aminoácidos (NOVELLI; BARROS; FLEURI, 2016).

### 2.2 ENZIMAS DE INTERESSE INDUSTRIAL

#### 2.2.1 Amilase

A  $\alpha$ -amilase é uma enzima cuja atividade leva a degradação de amido e glicogênio, que são os principais compostos de reserva em plantas e animais (NELSON; COX, 2018). A aplicação industrial das amilases é bastante diversificada, sendo empregadas na produção de

alimentos, ração, produtos farmacêuticos e detergentes (STOLL; FLORES; THYS, 2015; GONÇALVES, 2019).

A aplicação desta enzima requer propriedades únicas em relação à especificidade, estabilidade, temperatura e dependência de pH, portanto, o rastreamento de microrganismos produtores de  $\alpha$ -amilase promove a descoberta de novas amilases para diferentes propósitos (BASTOS *et al.*, 2015). Como exemplo, a amilase, isoladamente ou em combinação com outras enzimas, é adicionada à farinha de pão para reter a umidade, aumentando a maciez e mantendo a massa fresca (SINGH *et al.*, 2016).

### 2.2.2 Pectinase

As pectinases são enzimas despolimerizantes que degradam as pectinas presentes nas paredes celulares dos tecidos vegetais (AHMED *et al.*, 2016). Suas aplicações nas indústrias alimentícia e têxtil são muito difundidas, podendo ser empregadas na maceração de tecidos vegetais, no tratamento de águas residuais e na desgomagem de fibras naturais (KAMARUDDIN *et al.*, 2019).

Na indústria alimentícia são utilizadas para clarificar sucos de frutas, vinhos, fermentações de café e chá e extração de óleos essenciais (POONDLA *et al.*, 2015; RAJDEO *et al.*, 2016). Várias leveduras produzem pectinases como as do gênero *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Cryptococcus*, *Rhodotorola*, e da espécie *Aureobasidium pullulans* (MOYO *et al.*, 2003; MERIN *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2016).

### 2.2.3 Protease

As proteases são uma família diversificada de enzimas, tanto estrutural quanto funcionalmente (WALSH, 2015). Enzimas proteolíticas catalisam a clivagem de ligações peptídicas em substratos à base de proteínas (NELSON; COX, 2018). Estas enzimas regulam a segmentação, localização e atividade biológica de muitas proteínas e modulam as interações proteína-proteína (WALSH, 2015).

Quantitativamente, as enzimas proteolíticas constituem o grupo mais importante de enzimas atualmente em uso nos processos industriais. São utilizadas na indústria alimentícia e de detergente e, mais recentemente, têm sido empregadas no processamento de couro e como agente terapêutico (WALSH, 2015). A protease ácida pode ser empregada no tratamento de

dispepsia alimentar e reduz a quantidade de suplemento de nitrogênio não proteico em dietas de animais, reduzindo assim a excreção de ureia no meio ambiente (SOUZA *et al.*, 2015).

### 2.3 APLICAÇÕES INDUSTRIAIS DE ENZIMAS MICROBIANAS

Os microrganismos produzem uma variedade de enzimas, que foram exploradas comercialmente ao longo da história da humanidade e ainda são requeridas nos processos biotecnológicos atuais. Leveduras foram os primeiros microrganismos a serem utilizados em escala industrial para produzir bebidas alcoólicas a partir de cevada (PATEL; SINGHANIA; PANDEY, 2016; SINGH *et al.*, 2016). As enzimas microbianas ganharam destaque em vários setores industriais, como de papel e celulose, têxteis, couro, detergente, na produção de alimentos e bebidas, biocombustíveis, na medicina, ração animal, na agricultura, na fabricação de produtos químicos, e energia devido a suas diversas aplicabilidades (PATEL; SINGHANIA; PANDEY, 2016; LIU; KOKARE, 2017).

Processos mediados por enzimas microbianas têm despertado interesse no campo da biotecnologia, pois os microrganismos requerem insumos de baixo custo para obtenção desta biomolécula, além de ganho na otimização do tempo requerido nos processos, não produzem toxinas e redução na geração de resíduos (CHOI; HAN; KIM, 2015). Entre os microrganismos produtores de enzimas as leveduras se destacam na síntese de biocompostos, entre os quais predominam as proteinases (THERON; BELY; DIVOL, 2017).

### 2.4 PROSPECÇÃO DE MICRORGANISMOS

Os microrganismos utilizados em processos biotecnológicos podem ser isolados, selecionados e testados como culturas puras a partir de uma fonte natural, tais como o solo, água, plantas e animais vivos, águas residuais e manguezais (GRIEBELER *et al.*, 2015; SANTOS; BATISTA, 2015; SILVA, 2018).

A obtenção de microrganismos também pode ocorrer em fontes como a compostagem, que é a transformação de resíduos orgânicos em fertilizantes, causado pela atuação de enzimas hidrolíticas excretadas por estes para obtenção de energia (PASCON *et al.*, 2011). As pilhas de compostagem podem atingir até 80°C devido ao metabolismo, favorecendo o desenvolvimento de organismos. Neste processo, a interação entre fatores bióticos e abióticos levam a constante transformação da complexa comunidade microbiana ao longo da degradação da matéria orgânica (PASCON *et al.*, 2011).

As linhagens puras podem ser obtidas por meio das técnicas de isolamento direto ou com meios de cultura altamente seletivos para permitir a seleção dos microrganismos de interesse, através da seleção primária em meio de cultura sólida, onde pode ser observado substâncias de interesse produzidas pelos microrganismos (SILVA *et al.*, 2016; GARRIDO; BISPO; SILVA, 2018). As culturas selecionadas em meio sólido, em geral, são inseridas em cultivo submerso, sob diversas condições, obtendo-se, assim, caldos fermentados resultantes do crescimento do mesmo microrganismo. A quantidade produzida das substâncias em cada cultivo é comparada, podendo-se selecionar as cepas mais promissoras (SILVA *et al.*, 2016; GARRIDO; BISPO; SILVA, 2018).

## 2.5 LEVEDURAS

As leveduras são fungos unicelulares cosmopolitas com distribuição em diversos ecossistemas, e apresentam-se como uma fonte alternativa para a produção de enzimas comerciais em larga escala (OGAWA *et.al.*, 2019). Estes microrganismos possuem características vantajosas, como a alta taxa de crescimento em uma ampla variedade de substratos, o curto tempo para fermentação sem a necessidade de indutor no meio de crescimento, capacidade de secretar enzimas e baixo potencial patogênico (KIM; YOO; KANG, 2015).

Leveduras adquiridas de uma mesma fonte possuem o potencial de produzir enzimas com características completamente ou parcialmente diferentes, além disso, a clonagem de genes e a manipulação genética podem melhorar a produção destas biomoléculas, assim a produção de enzimas comerciais por leveduras se torna promissora (POONDLA *et al.*, 2015).

Algumas espécies de leveduras degradam o amido aumentando sua potencialidade em aplicações biotecnológicas, sintetizam uma gama de enzimas hidrolíticas e produzem etanol a partir da biomassa amilácea (CASPETA; CASTILLO; NIELSEN, 2015). Wei *et al.*, (2017) reportam a importância biotecnológica da levedura *Aureobasidium pullulans* na produção de inúmeras enzimas extracelulares, como protease, lipase e amilase.

### 3 METODOLOGIA

O trabalho desenvolvido foi do tipo experimental, adotou os métodos de pesquisa descritivos, qualitativos e semiquantitativos, com caráter transversal. As amostras utilizadas no presente estudo foram obtidas do projeto de compostagem da Faculdade Ciências da Vida. Todos os trabalhos efetuados no experimento foram realizados no laboratório de Microbiologia da Faculdade Ciências da Vida, localizada no município de Sete Lagoas, Minas Gerais.

#### 3.1 ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE LEVEDURAS

Um total de 5 g do substrato orgânico da compostagem foi acrescido de 45 mL de solução salina 0,85% estéril e homogeneizado por 30 minutos. Após a homogeneização, uma alíquota de 1 mL foi retirada da solução e realizou-se as diluições seriadas decimais ( $10^{-1}$  a  $10^{-3}$ ) e, posteriormente, 100  $\mu$ L de cada diluição foi plaqueada em meio Batata Dextrose Ágar – BDA (200 g de batata, 20 g de dextrose, 15 g de ágar, por litro), através da técnica de espalhamento em superfície com o auxílio de uma alça de Drigalski para obtenção dos microrganismos. As placas inoculadas foram incubadas a 25°C por 48 horas sendo todo o procedimento realizado em triplicata (ARAÚJO; HUNGRIA, 1994).

Realizada a obtenção, as estirpes selecionadas foram submetidas a exame morfológico (DIAS; SCHWAN, 2010). Uma alíquota da colônia pura foi repicada em tubo contendo o mesmo meio de cultura, e mantido inclinado para posterior utilização nas etapas de caracterização enzimática.

#### 3.2 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE LEVEDURAS

Para análise morfológica, as linhagens selecionadas foram inoculadas em placa com meio BDA e, após o crescimento por 48 horas, procedeu-se a avaliação macroscópica quanto às características macromorfológicas: cor, tipo de borda e aspecto das colônias. Com relação à micromorfologia, foi realizada a montagem de uma lâmina a fresco utilizando solução salina 0,85% estéril; para observação em microscópio óptico (Leica DFC 490) em aumento de 40X. Posteriormente, as células foram caracterizadas quanto às características microscópicas, tais como: forma, produção de pseudo-hifas e brotamento (DIAS; SCHWAN, 2010).

### 3.3 CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA DE LEVEDURAS

#### 3.3.1 Produção de amilase

A produção de amilase foi testada de acordo com Coon *et al.* (1957), com adaptação na concentração de amido solúvel para 6,6 g/L. Os isolados foram inoculados na forma de *spots* e em triplicata no meio ágar amido (6,6 g/L de amido solúvel, 0,5 g/L de cloreto de sódio, 3 g/L de extrato de carne, 1 g/L de peptona caseína, 15 g/L de ágar; pH 7,0). As culturas foram incubadas a 28 °C por 48 horas, sendo adicionados 10 mL de solução diluída de lugol (5 g/L de iodo, 10 g/L de iodeto de potássio) em cada placa. A produção da enzima amilase foi detectada pela formação de zona amarela ao redor da colônia, em contraste com a coloração azul resultante da reação do amido com o iodo.

#### 3.3.2 Produção de pectinase

A produção de pectinase foi avaliada utilizando meio de cultura ágar nutriente suplementado com 1,25 g/L de pectina cítrica (UENOJO; PASTORE, 2007). Os isolados foram inoculados nesse meio na forma de *spots*, em triplicata e incubados a 28 °C por 48 horas. Para a detecção da atividade pectinolítica foi realizada a revelação com a solução de vermelho rutênio 0,05% e, posteriormente, as placas foram lavadas com água destilada.

#### 3.3.3 Produção de protease

A produção de protease foi realizada utilizando meio de cultura Ágar-gelatina-leite (18 g/L de ágar, 10 g/L de leite em pó desnatado e 10 g/L de gelatina em pó) (ORLANDELLI *et al.*, 2011). Os isolados foram inoculados na forma de *spots*, em triplicata e incubados a 28 °C por 48 horas. A produção de proteases foi observada nas placas sem a necessidade de um revelador, onde o resultado positivo foi identificado pela formação de halos claros ao redor da colônia.

#### 3.3.4 Índice enzimático

Além da análise qualitativa, as atividades hidrolíticas das enzimas amilase, pectinase e protease foram estimadas semiquantitativamente através do índice enzimático (IE) conforme a

relação entre o diâmetro da colônia e do halo de hidrólise segundo a seguinte equação:  $IE = DH/DC$ , sendo DH o diâmetro em mm do halo de hidrólise e DC o diâmetro em mm da colônia dos isolados (STAMFORD *et al.*, 1998; SILVA *et al.*, 2015).

### 3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os ensaios de atividade enzimática foram dispostos conforme o delineamento inteiramente casualizado com três repetições por amostra. Os resultados obtidos foram analisados individualmente e, quando ocorreram diferenças significativas pelo teste F ( $p \leq 0,05$ ), os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade, utilizando o *software* SISVAR<sup>®</sup> 5.3 (FERREIRA, 2010).

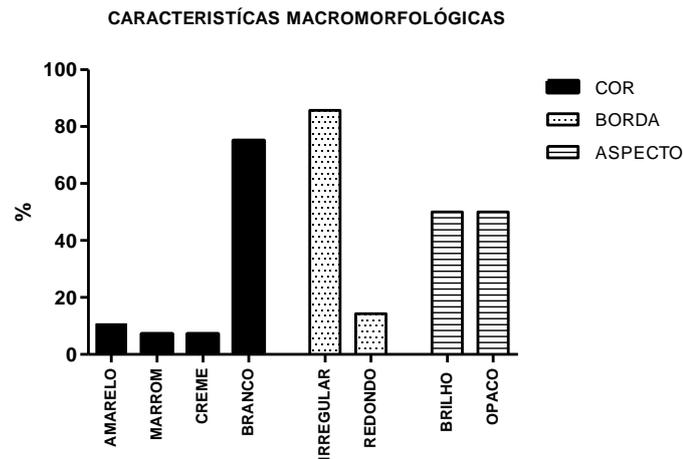
## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA

Analisando os dados referentes às características morfológicas dos isolados, obteve-se um total de 28 leveduras, sendo as médias dos parâmetros encontrados apresentados nos Gráficos 1 e 2.

Com relação às características macroscópicas (Gráfico 1) observou-se que as leveduras apresentaram coloração branca (75,0%), amarela (10,71%), creme (7,14%) e marrom (7,14%). A predominância das colônias com cor branca também foi reportado por Guimarães (2016) em estudo de caracterização de leveduras de amostra ambiental. De acordo com Yarrow (1998), a presença de padrões de coloração diferentes, tais como marrom e amarelo, estão relacionados à síntese de pigmentos carotenoides.

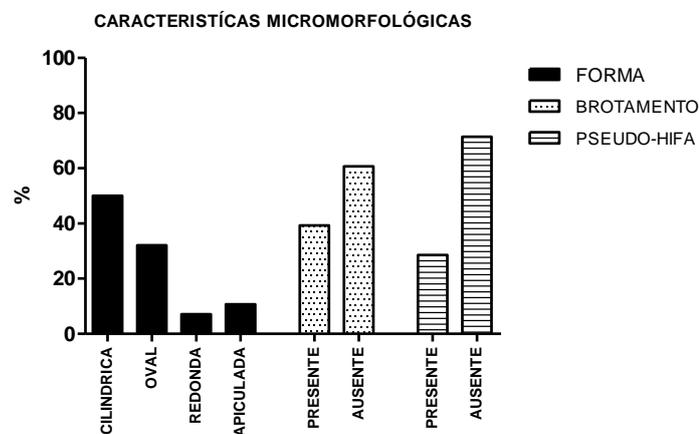
Entre os 28 isolados, 85,71 % apresentaram bordas irregulares e 14,28% redondas enquanto que 50,0% demonstraram aspecto brilhante e 50,0% opaco, conforme demonstrado no gráfico 1. A análise macromorfológica das colônias de leveduras é mais descritiva e auxilia no processo de isolamento e seleção inicial dos microrganismos, não chegando a uma análise taxonômica precisa (DIAS; SCHWAN, 2010).



**Gráfico 1.** Características macromorfológicas das leveduras obtidas de amostra de compostagem da Faculdade Ciências da Vida.

Características microscópicas (Gráfico 2) também foram avaliadas e revelaram diferenciação na estrutura morfológica da forma, sendo 50,0% cilíndrica, 32,14% oval, 10,71% apicular e 7,14% redonda. Notou-se que 39,28% das leveduras apresentaram brotamento enquanto não houve formação desta estrutura em 60,71% dos isolados.

Verificando-se a presença de pseudo-hifas observou-se que 28,57% das estirpes possuíam esta estrutura o que não ocorreu com 71,42% das linhagens analisadas. Baseando-se apenas nos micromorfológicos, não foi possível concluir a taxonomia dos isolados de levedura deste trabalho. Os caracteres morfológicos servem como base para dar suporte no agrupamento de indivíduos após realização da identificação das leveduras por meio de técnicas moleculares (GUIMARÃES, 2016).



**Gráfico 2.** Características micromorfológicas das leveduras obtidas de amostra de compostagem da Faculdade Ciências da Vida.

#### 4.2 CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA DAS LEVEDURAS

Os dados da atividade enzimática da amilase, pectinase e protease estão apresentados na Tabela 1. Observou-se que 85,71% das linhagens foram capazes de produzir pelo menos uma das três enzimas avaliadas, mesmo que não tenham sido classificadas como potenciais produtoras, ou seja, aquelas que apresentaram Índice Enzimático  $< 2,0$ . A produção de amilase, pectinase e protease foi observada em 35,71, 60,71 e 53,57% dos isolados; respectivamente. As estirpes L8, L13, L16 e L19, não apresentaram atividade enzimática para qualquer uma das enzimas testadas.

**Tabela 1.** Índice enzimático (IE) de amilase, pectinase e protease de isolados de leveduras obtidas de compostagem.

Isolado	Índice enzimático		
	Amilase	Pectinase	Protease
L25	2,30a	0,00	0,00
L7	2,25a	1,07g	2,93d
L14	2,03b	2,10b	2,62f
L23	1,90c	2,04b	0,00
L18	1,80c	1,65e	3,33a
L21	1,77c	1,32f	2,67e
L20	1,75c	1,38f	2,29g
L11	1,74c	0,00	0,00
L15	1,58d	1,73d	2,68e
L1	1,50d	1,25f	2,14i
L16	0,00	0,00	0,00
L17	0,00	1,63e	3,24b
L8	0,00	0,00	0,00
L10	0,00	0,00	2,22h
L28	0,00	0,00	1,27k
L12	0,00	2,27a	3,20b
L9	0,00	2,12b	0,00
L13	0,00	0,00	0,00
L26	0,00	1,92c	0,00
L4	0,00	2,18a	2,14i
L27	0,00	2,15b	0,00
L3	0,00	0,00	3,10c
L24	0,00	0,00	1,86j
L2	0,00	1,06g	0,00
L19	0,00	0,00	0,00
L6	0,00	1,10g	0,00
L5	0,00	2,14b	0,00
L22	0,00	0,00	2,71e

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

#### 4.2.1 Detecção da atividade amilolítica

A atividade amilolítica dos isolados foi determinada pela presença de um halo amarelo ao redor das colônias (COON *et al.*, 1957). O IE foi estatisticamente significativo ( $p \leq 0,05$ ) entre as leveduras capazes de degradar o amido em meio de cultura (Tabela 1). Do total de 28 cepas, 18 (64,29%) não formaram halo nas condições avaliadas, o que evidencia que os mesmos não são capazes de produzir amilase.

O resultado encontrado no presente estudo encontra-se de acordo com os trabalhos de Landell *et al.* (2009) e Costa *et al.* (2011) que analisando o perfil enzimático de leveduras obtidas de bromélias e batata-doce, verificaram que apenas 13% e 16,3%; respectivamente, apresentaram resultado positivo para amilases. Segundo Salyers *et al.* (1996) o fato dos microrganismos crescerem no meio contendo amido como única fonte de carbono sugere que todas as linhagens possuem atividade amilolítica porém as enzimas de alguns isolados não difundiram-se no meio, o que não propicia a formação de halo de degradação.

Valores de IE para as 10 (35,71%) linhagens que apresentaram resultado positivo variaram entre 1,50 e 2,30 (Tabela 1). Entre elas, 7 isolados apresentaram índice enzimático  $< 2$ , indicando baixa produção de amilase, enquanto 3 apresentaram  $IE \geq 2,0$ , indicando boa atividade amilolítica. Os isolados L25 e L7 demonstraram, em média, os maiores índices enzimáticos expondo elevado potencial amilolítico destes microrganismos. Esses dados corroboram com os resultados obtidos por Costa *et al.* (2011) que obtiveram  $IE \geq 2,0$  com leveduras isoladas de leguminosa. A amilase microbiana está entre as classes de enzimas mais requeridas pelas indústrias devido às inúmeras aplicações nos processos biotecnológicos (ADRIO; DEMAIN, 2014).

#### 4.2.2 Detecção da atividade pectinolítica

Do total de isolados, 17 (60,71%) formaram halo de degradação no meio de cultura suplementado com pectina, indicando que estas linhagens foram capazes de produzir pectinase. A atividade pectinolítica foi determinada por meio do IE que foi estatisticamente significativo ( $p \leq 0,05$ ) e variou de 1,06 a 2,27 entre as leveduras avaliadas (Tabela 1). Nota-se que 10 isolados apresentaram índice enzimático  $< 2$ , indicando baixa produção de pectinase, enquanto 7 apresentaram  $IE \geq 2,0$ , indicando boa atividade pectinolítica.

Os isolados L12 e L4 apresentaram, em média, os maiores IE certificando o alto potencial destes microrganismos para a produção desta enzima de interesse. Em estudo com

leveduras obtidas de resíduos agroindustriais, Couto (2008) relatou que várias espécies de leveduras produziram diferentes quantidades de pectinases o que corrobora com o presente estudo. Segundo Araújo (2015), as pectinases microbianas apresentam elevada aplicação na indústria alimentícia, com uso no processo de clarificação ou aumento na eficiência de extração de polpas para produção de sucos.

Do total de 28 cepas, 11 (39,29%) não foram capazes de produzir pectinase, fato observado pela ausência da formação de halo de hidrólise ao redor das colônias. Apesar de a síntese de enzimas pectinolíticas ser comum entre os diversos de microrganismos, os fungos filamentosos destacam-se por secretarem cerca de 90% das enzimas produzidas no meio de cultura (BLANDINO *et al.*, 2001). No entanto, o presente estudo retrata a eficiência de leveduras em produzir pectinases para uso em inúmeros processos industriais e aplicações biotecnológicas.

#### 4.2.3 Detecção da atividade proteolítica

As proteases são enzimas capazes de clivar ligações peptídicas usualmente utilizadas em diversas atividades industriais tais como amaciamento de carne e processamento de alimentos e bebidas (SOARES *et al.*, 1999). Entre os seres vivos, as leveduras ganham destaque por produzirem biomoléculas de interesse biotecnológico, entre as quais predominam as proteases (RODRIGUES; SANT'ANNA, 2001).

O IE para produção de protease variou significativamente ( $p \leq 0,05$ ) entre as leveduras avaliadas, sendo que 15 (53,57%) isolados foram considerados produtores desta enzima devido a presença de halo de degradação no meio de cultura, com valores variando de 1,27 a 3,33. Observa-se que 13 (46,43%) isolados não foram capazes de hidrolisar a proteína do leite e 2 (7,14%) microrganismos não produziram enzima suficiente para serem caracterizados como bons produtores pois apresentaram índice enzimático  $< 2$  (Tabela 1).

O isolado L18 apresentou o maior IE demonstrando o potencial deste microrganismo para a produção de protease. Neves *et al.* (2006) em estudo com leveduras isoladas na Região Amazônica reportam a capacidade destas linhagens em produzir protease sendo o gênero *Candida* o mais frequente. Buzzini; Martini (2002) também relatam a produção de protease por leveduras dos gêneros *Candida*, *Geotrichum* e *Pichia* isoladas de ambientes tropicais corroborando com os dados obtidos no presente trabalho onde mais de 50,0% dos isolados apresentaram atividade enzimática proteolítica.

## 5 CONCLUSÃO

Entre as leveduras isoladas da compostagem existe variabilidade em relação às características morfológicas e produção de enzimas hidrolíticas. A maioria dos isolados (85,71%) hidrolisa pelo menos um dos substratos utilizados na prospecção da atividade enzimática, demonstrando o potencial biotecnológico destes microrganismos na síntese de enzimas requeridas em diversos segmentos da indústria, tais como amilase, pectinase e protease. Os isolados L25 e L7 apresentam maior produção de amilase, L12 e L4 de pectinase e L18 de protease. O presente trabalho contribui com a busca por novas fontes de microrganismos, contudo faz-se necessário a continuidade do referido trabalho para otimizar a produção das enzimas, e utilizar métodos complementares para diferenciar as espécies encontradas.

## REFERÊNCIAS

- ADRIO, J.L.; DEMAIN, A.L. Microbial enzymes: tools for biotechnological processes. **Biomolecules**. v. 4, p. 117-139, 2014.
- AHMED, I.; ZIA, M.A.; HUSSAIN, M.A.; AKRAM, Z.; NAVEED, M.T.; NOWROUZI, A. Bioprocessing of citrus waste peel for induced pectinase production by *Aspergillus niger*; its purification and characterization. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**. v.9. n.2. p.148-154, 2016.
- ARAÚJO, M. A. M. **Isolamento e seleção de leveduras para produção de enzimas de interesse industrial a partir de frutos do cerrado**. 68 p. Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, 2015.
- ARAÚJO, R. S.; HUNGRIA, M. **Microrganismos de importância agrícola**. Brasília: Embrapa SPI, 1994.
- BASTOS, C.M.S.; COSTA, S.T.C.; ABREU-LIMA, T.L.; ZUNIGA, A.D.G.; CARREIRO, S.C. Efeito das condições de cultivo na produção de amilase por duas linhagens de leveduras. **R. bras. Bioci.**, v. 13, n. 3, p. 123-129. 2015.
- BLANDINO, A.; DRAVILLAS, K.; CANTERO, D.; PANDIELLA, S. S.; WEBB, C. Utilization of whole wheat flour for the production of extracellular pectinases by some fungal strains. **Proc. Biochem**. v. 37, p. 497-503, 2001.
- BUZZINI, P.; MARTINI, A. Extracellular enzymatic activity profiles in yeast and yeast-like strains isolated from tropical environments. **Journal of Applied Microbiology**. v. 23, p. 1020-1025, 2002.

- CASPETA, L.; CASTILLO, T.; NIELSEN, J. Modifying Yeast Tolerance to Inhibitory Conditions of Ethanol Production. **Processes. Front. Bioeng. Biotechnol.** v.3. 2015.
- CHOI, J. M., HAN, S. S., & KIM, H. S. Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects. **Biotechnology advances**, v.33. n.7. p.1443-1454. 2015.
- COON, H.J., JENNISON, M.W. & WEEK, O.B. Routine tests for the identification of bacteria. In: **Society of American Bacteriologists ed. Manual of Microbiological Methods.** New York. McGraw-Hal, p.239-262, 1957.
- COSTA, S.T.C.; ABREU-LIMA, T.C.; CARREIRO, S.C. Atividade amilolítica de leveduras isoladas de batata-doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam). **Revista de Biociências da Universidade de Taubaté**, Vol.17, n 2, p. 15-24, 2011.
- COUTO, F. M. M. **Leveduras produtoras de  $\beta$ -glicosidade e pectinase.** 66 p. Universidade Federal do Pernambuco, Recife, 2008.
- DIAS, D.R.; SCHWAN, R.F. Isolamento e identificação de leveduras. In: MOREIRA, F.M.S.; HUISING, E.J.; BIGNELL, D.E. (Ed.). **Manual de biologia dos solos tropicais: amostragem e caracterização da biodiversidade.** Lavras: UFLA, 2010. p.145-148.
- ELSHANI et al. Beer fermentation with different yeast concentration. **J. Pharm. Sci. & Res.** Vol. 10(9), 2018, 2380-2382.
- FERREIRA, D.F. **SISVAR - Sistema de análise de variância.** Versão 5.3. DEX. Lavras-MG: UFLA, 2010.
- GARRIDO, J.V.M.L.; BISPO, D.F.; SILVA C.F. Isolamento e seleção de microrganismos produtores de lipase e otimização da produção enzimática. **Scientia Plena.** v.14. n.6. 2018.
- GONÇALVES, L.A. **Produção e caracterização de amilase secretada por *Rhizoctonia solani* AG-1 IA.** 2019. Faculdade de Engenharia, Universidade Estadual de São Paulo, Ilha Solteira, 2019.
- GRIEBELER, N. E.; DE BORTOLI, V.; ASTOLFI, A. L.; DARONCH, N. A.; SCHUMANN, A. C.; SALAZAR, L. N.. Seleção de fungos filamentosos produtores de amilases, proteases, celulasas e pectinases. **Revista Acadêmica: Ciência Animal** v.13. 2015.
- GUIMARÃES, M. **Diversidade e afiliação filogenética de leveduras associadas á plantas de sorgo sacarino [*sorghum bicolor* (l.) moench] cultivadas no cerrado.** 61p. Universidade Federal de São João Del Rei, Minas Gerais, 2016.
- KAMARUDDIN, M.A., IBRAHIM, M.H., THUNG, L.M. *et al.* Sustainable synthesis of pectinolytic enzymes from citrus and *Musa acuminata* peels for biochemical oxygen demand and grease removal by batch protocol. **Appl Water Sci.** v.9. n.68. 2019.
- KIM, H.; YOO, S.J.; KANG, H.A. Yeast synthetic biology for the production of recombinant therapeutic proteins. **FEMS Yeast Research**, v. 15. n. 1. 2015.
- LANDELL, M. F. *et al.* *Cryptococcus bromelii* sp. nov., an orange-coloured basidiomycetous yeast isolated from bromeliads in Brazil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 59, p. 910-913, 2009.

- LIU, X.; KOKARE, C. Microbial enzymes of use in industry. In: *Biotechnology of Microbial Enzymes*. **Academic Press**. p. 267-298. 2017.
- MELO, A.L.S.; SILVA, J.M.; NETO, A.M.; SANTOS, T.M.C. Prospecção e isolamento de actinomicetos com potencial para promoção de crescimento em rúcula (*Eruca sativa* L.). **Green Journal of Agroecology and Sustainable Development**. v.10. n.3. 2015.
- MERIN, M. G.; MENDOZA, L. M.; FARÍAS, M. E.; DE AMBROSINI, V. I. M. Isolation and selection of yeasts from wine grape ecosystem secreting cold-active pectinolytic activity. **International journal of food microbiology**. v.147. n.2. p.144-148. 2011.
- MOYO, S.; GASHE, B. A.; COLLISON, E. K.; MPUCHANE, S. Optimising growth conditions for the pectinolytic activity of *Kluyveromyces wickerhamii* by using response surface methodology. **International journal of food microbiology**. v.85. n.1 p87-100. 2003.
- NOVELLI, P.K.; BARROS, M.M.; FLEURI, L.F. Novel inexpensive fungi proteases: Production by solid state fermentation and characterization. **Food Chemistry**. v.198. p.119-124. 2016.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger 7ªed**. Artmed Editora. 2018.
- NEVES, K. C.; PORTO, A. L. F.; TEIXEIRA, M. F. S. Seleção de leveduras da Região Amazônica para produção de protease extracelular. **Acta Amazônica**. v. 36, n. 3, p. 299 – 306, 2006.
- OGAWA, M., BISSON, L.F., *et al.* New insights on yeast and filamentous fungus adhesion in a natural co-immobilization system: proposed advances and applications in wine industry. **Appl Microbiol Biotechnol**. v. 103. p.4723. 2019.
- ORLANDELLI, R.C.; ALMEIDA, T.T.; AZEVEDO, J.L.; PAMPFILE, J.A. **Produção da enzima protease por fungos endofíticos isolados da planta medicinal Piper hispidum Sw.** In: Anais Eletrônico VII EPCC – Encontro Internacional de Produção Científica do Centro Universitário de Maringá (CESUMAR), Editora CESUMAR: Maringá, 2011.
- PASCON, R. C.; BERGAMO, R. F.; SPINELLI, R. X.; DE SOUZA, E. D.; ASSIS, D. M.; JULIANO, L.; VALLIM, M. A. Amylolytic microorganism from Sao Paulo zoo composting: isolation, identification, and amylase production. **Enzyme research**, 2011.
- PATEL, A. K.; SINGHANIA, R. R.; PANDEY, A. (2016). Novel enzymatic processes applied to the food industry. **Current Opinion in Food Science**. v.7. p.64-72. 2016.
- POONDLA, V.; BANDIKARI, R.; SUBRAMANYAM, R.; OBULAM, V. S. R. Low temperature active pectinases production by *Saccharomyces cerevisiae* isolate and their characterization. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**. v.4. n.1. p.70-76. 2015.
- RADJEO, K.; *et al.* Immobilization of pectinase on reusable polymer support for clarification of apple juice. **Food and Bioproducts Processing**. v.99. p.12-19. 2016.
- RAMOS, R.F.; SOBUCKI, L.; ROHRIG, B.; LUDWIG, J.; DAIROT, D.J.; Diversidade funcional de bactérias isoladas de solos rizosférico e não rizosférico em cultura de milho. **Journal of Agroveterinary Sciences**. v.17. n.3. 2018.

RODRIGUES, A. N. & SANT'ANNA, E. S. Efeito do cloreto de sódio na produção de proteínas (*Saccharomyces cerevisiae*) em fermentação semi-sólida. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 21, n. 1, p. 63-66, 2001.

SALYERS, A.A.; REEVES, A.; D'ELIA, J. Solving the problem of how to eat something as big as yourself: Diverse bacterial strategies for degrading polysaccharides. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 17, p.470-476, 1996.

SANTOS, A. P. A.; BATISTA, S. B. Isolamento e caracterização fenotípica de microrganismos isolados de solo poluído por resíduos sólidos do bairro carrapicho município de Várzea Grande – Mato Grosso. **Connection Line**. v.12. 2015.

SILVA, C. F. Isolamento e seleção de microrganismos produtores de enzimas de interesse comercial. **Scientia Plena**. v.14. n.2. 2018.

SILVA, M.B.; *et al.* Isolamento de microrganismos e estudo da produção de lipase utilizando resíduos agroindustriais. **Scientia Plena**. v. 12. n. 5. 2016.

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, R., KUMAR, M.; MITTAL, A.; MEHTA, P. K. Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. **Biotech**. v.6 .n.2. p174. 2016

SOARES, V. F.; FERREIRA, V. S.; BON, E. P. S. **Produção de Proteases de *Bacillus subtilis* usando óleo de soja como fonte de carbono**. In: 4º Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática. Resumos. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 98pp. 1999.

SOUZA, P.M.; *et al.* A biotechnology perspective of fungal proteases. **Braz. J. Microbiol**. v. 46.n.2.p.337-346.2015.

STAMFORD, T. L. M.; STAMFORD, N. P.; ARAÚJO, J. M. Atividade enzimática de microrganismos isolados do jacatupé (*Pachyrhizus erosus* L.Urban). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 18, p. 382-385, 1998.

STOLL, L.; FLORES, S.H.; THYS, R.C.S. Fibra de casca de laranja como substituto de gordura em pão de forma. **Cienc. Rural**. v.45. n.3. p.567-573. 2015.

THERON, L. W.; BELY, M.; DIVOL, B. Characterisation of the enzymatic properties of MpAPr1, an aspartic protease secreted by the wine yeast *Metschnikowia pulcherrima*. **J. Sci. Food Agric**, v. 97. p.3584-3593. 2017.

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

VILELA, A.F.L. **Co-imobilização das enzimas acetilcolinesterase e B-secretase1: estudo de condições para triagem de ligantes**. 2018. Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

WALSH, G. Industrial Enzymes: Proteases and Carbohydrases. **Proteins: biochemistry and biotechnology**. p.327-369. 2015.

WEI, P.; *et al.* Production of poly(malic acid) from sugarcane juice in fermentation by *Aureobasidium pullulans*: Kinetics and process economics. **Bioresource Technology**. v. 224. p. 581-589. 2017.

YARROW, D. Methods for the isolation, maintenance and identification of yeasts. In: KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W. (Ed.). *The yeasts, a taxonomic study*. 4th ed. **Amsterdam: Elsevier**, 1998. p.77-100.