

# BIOPROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS PRODUTORAS DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS DE INTERESSE INDUSTRIAL A PARTIR DE AMOSTRAS DE COMPOSTAGEM.

Lara de Lima Campos<sup>1</sup>

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

## RESUMO

As enzimas são os produtos mais explorados pela indústria atualmente e possuem aplicação biotecnológica em diversos setores. A obtenção de microrganismos produtores de enzimas de interesse industrial é uma prática sustentável empregada ao desenvolvimento dos processos manufatureiros atuais. A exploração e estudo da microbiota existente na compostagem para esta finalidade ainda é escassa. Bactérias isoladas de amostras ambientais demonstram a capacidade deste grupo de microrganismos em produzir enzimas hidrolíticas. Assim sendo, o objetivo do presente trabalho foi isolar, caracterizar e avaliar a capacidade das bactérias obtidas de composto orgânico em produzir as enzimas hidrolíticas amilase, lipase e protease. Realizou-se o processamento da amostra de composto orgânico e, posteriormente, o plaqueamento em meio sólido a fim de caracterizar morfológicamente as bactérias isoladas. Em seguida, as estirpes foram inoculadas em meios contendo 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). O IE variou de 0 a 2,21, demonstrando o potencial biotecnológico de algumas cepas. Os isolados B1 e B10 apresentaram os maiores valores para amilase, enquanto que os isolados B4 e B7 para lipase e B3 e B11 para protease. Os dados apresentados neste estudo mostraram baixa variabilidade genética e morfológica entre os 12 isolados de bactérias obtidos no composto orgânico, porém existem estirpes com alto potencial de uso para produção de enzimas em escala industrial.

**Palavras-chave:** Atividade enzimática. Biotecnologia. Compostagem. Enzimologia.

## ABSTRACT

Enzymes are the most exploited products by the industry nowadays and have biotechnology application in several sectors. The obtaining of enzyme producing microorganisms of industrial interest is a sustainable practice used in the development of the current manufacturing processes. The exploitation and study of the microbiota in composting for this purpose is still scarce. Isolated bacteria from environmental samples demonstrate the ability of this group of microorganisms to produce hydrolytic enzymes. Therefore, the objective of the present work was to isolate, characterize and evaluate the capacity of the bacteria obtained from organic compost to produce hydrolytic enzymes amylase, lipase and protease. The processing of the organic compost sample was performed and, later, the plating in solid midst in order to morphologically characterize the isolated bacteria. Then, the strains were inoculated in means containing different carbon sources, in the form of spots, to evaluate the enzyme activity. The enzymatic activity was evaluated semiquantitatively using the enzymatic index (EI). The EI ranged from 0 to 2.21, demonstrating the biotechnological potential of some strains. The isolates B1 and B10 presented the highest values for amylase, while the isolates B4 and B7 for lipase and B3 and B11 for protease. The data presented in this study showed low genetic and morphological variability among the 12 isolates of bacteria obtained in the organic compost, but there are strains with high potential for use for the production of enzymes on an industrial scale.

**Key-words:** Enzymatic activity. Biotechnology. Composting. Enzymology.

---

<sup>1</sup> Lara de Lima Campos; Graduada em Biotecnologia, na Faculdade Ciências da Vida, Sete Lagoas/MG; e-mail: laradlcampos@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

A sustentabilidade dos processos industriais tornou-se uma tendência mundial, razão pela qual a introdução de métodos ecológicos alternativos nas etapas de produção intensificou-se nos últimos anos. Adicionalmente, com o avanço da enzimologia, uma maior atenção foi despendida para as enzimas, moléculas onipresentes em animais, plantas e microrganismos, responsáveis por catalisar e coordenar uma série de reações inerentes ao metabolismo celular (CUESTA *et al.*, 2015). Neste cenário, o emprego de enzimas microbianas tem crescido e ganhado destaque a nível industrial (ANBU *et al.*, 2017).

As enzimas são moléculas orgânicas de natureza proteica que atuam como catalisadores biológicos em inúmeros segmentos industriais, podendo ser empregadas no tratamento de couro, desenvolvimento de combustíveis sustentáveis, produção de alimentos fermentados e detergentes enzimáticos de alta eficiência (OSBON; KUMAR, 2018; RAVEENDRAM *et al.*, 2018). A obtenção destas biomoléculas a partir de células microbianas cultivadas pelo processo de fermentação apresenta algumas vantagens, quando comparada à obtenção de enzimas de origem animal e vegetal, como: alta produtividade e menor custo; produção de diversas classes de enzimas; controle das condições de cultivo e obtenção de linhagens melhoradas, quanto à qualidade e eficiência de produção do biocatalizador requerido (GONÇALVES; FONSECA, 2018).

A seleção de microrganismos produtores de enzimas de interesse industrial é uma ferramenta biotecnológica promissora e com grande potencial para redução de custos, uma vez que as enzimas sintéticas são produtos de alto valor aquisitivo (LAMILLA *et al.*, 2017). A obtenção de enzimas, de forma sustentável e eficaz, representa um marco para o setor industrial, já que tem capacidade de otimizar os processos de fabricação de produtos e de tratamentos biológicos de efluentes e rejeitos hoje existentes (GUERRAND, 2017).

Os microrganismos podem ser encontrados em praticamente todos os ambientes e são importantes nos processos de decomposição da matéria orgânica e ciclagem de nutrientes, como nos processos de compostagem, onde a decomposição de matéria orgânica origina um composto húmico rico em nutrientes e que pode ser destinado à suplementação nutricional do solo (ZUCCONI; BERTOLDI, 1987; SILVA *et al.*, 2018). Neste contexto, o presente trabalho se justifica, uma vez que a compostagem possui uma matriz biodiversificada de bactérias com potencial para produção de uma ampla variedade de enzimas hidrolíticas ainda pouco exploradas (BHATIA *et al.*, 2015; COTTA *et al.*, 2015; SHARMA *et al.*, 2017).

Diante do exposto, o presente estudo apresenta a seguinte problemática: bactérias presentes em composto orgânico possuem capacidade para sintetizar enzimas hidrolíticas requeridas em processos industriais? Desta forma, levantou-se a hipótese de que diante a variabilidade genética de microrganismos existentes no composto orgânico obtido do processo de compostagem, seria possível isolar bactérias capazes de sintetizar enzimas hidrolíticas. Para testar essa hipótese, esse trabalho objetivou caracterizar e avaliar a capacidade das bactérias isoladas da compostagem em produzir as enzimas hidrolíticas amilase, lipase e protease. A fim de responder os objetivos, propôs-se a utilização de metodologia descritiva, com caráter qualitativo e semiquantitativo, e corte transversal.

Este trabalho é de grande importância, visto que as enzimas são os produtos mais explorados pela indústria atualmente e possuem aplicação biotecnológica em diversos processos. A prospecção e o estudo da atividade enzimática de bactérias obtidas de compostagem ainda são escassos na literatura (RIBEIRO *et al.*, 2017), o que torna este substrato, do ponto de vista sustentável, interessante para estudo e busca de estirpes com alto potencial biotecnológico para suprir a crescente demanda de enzimas requeridas no mercado industrial.

## **2 REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 ENZIMAS**

As enzimas, ou biocatalisadores, são moléculas proteicas de estrutura tridimensional complexa, responsáveis por acelerar processos termodinamicamente viáveis, como, por exemplo, reações químicas e metabólicas. São compostos altamente potentes, específicos e versáteis, sendo, portanto, considerados ferramenta de extrema importância para os processos biotecnológicos (SINGH *et al.*, 2016). As reações enzimáticas geralmente são atóxicas, ocorrem em condições amenas de pH e temperatura, e atuam sobre um substrato específico (LIN; TAO, 2017; RIGOLDI, *et al.*, 2017).

O conhecimento acerca da natureza enzimática e do potencial catalítico das enzimas expandiu a utilização dos biocatalisadores na indústria (GUERRAND, 2017). As enzimas hidrolíticas são responsáveis pela clivagem de moléculas específicas na presença de água, e atualmente representam cerca de 90% dos catalisadores biológicos comercializados. Dentre os biocatalisadores de maior utilização, as enzimas lipase, amilase e protease destacam-se por sua versatilidade e aplicabilidade industrial (LIU; KOKARE, 2017).

### 2.1.1 Amilase

As enzimas amilolíticas são proteínas extracelulares responsáveis pela hidrólise das ligações  $\alpha$ -1,4 e  $\alpha$ -1,6 presentes no amido, glicogênio e sacarídeos derivados. As amilases podem ser extraídas de vegetais, animais ou microrganismos e são amplamente empregadas na fabricação de produtos derivados de fermentação, produção de detergentes e insumos têxteis (COON; JENNISON; WEEK, 1957; SAINI; DAHIYA, 2017). Atualmente, as amilases microbianas representam cerca de 30% do total de enzimas empregadas nas indústrias, contudo, acredita-se que o percentual de utilização desse biocatalisador tende a aumentar ainda mais com a crescente demanda dos setores manufatureiros (ZHANG; HAN; XIAO, 2017).

### 2.1.2 Lipase

As lipases são enzimas responsáveis pela hidrólise e síntese de compostos ricos em triacilgliceróis (YVERGNAUX, 2017). As lipases microbianas podem ser empregadas no setor alimentício, com o intuito de modificar e evidenciar propriedades organolépticas dos alimentos, no tratamento de efluentes, facilitando a degradação de resíduos oleosos, além de apresentarem notável potencial biotecnológico para extração, purificação e desenvolvimento de numerosas moléculas (SAVITHA *et al.*, 2007; GUERRAND, 2017). O emprego de catalisadores biológicos na conversão de compostos lipídicos demonstra alta eficiência e pode ser realizado em meio aquoso ou não aquoso, sob condições amenas de temperatura e pressão (LECHUGA; ZAPATA; NIÑO, 2016; SHELATKAR; PADALIA, 2016).

### 2.1.3 Protease

As enzimas proteolíticas catalisam a hidrólise de ligações peptídicas em substratos proteicos. Apesar de estarem presentes em muitos seres vivos, as proteases advindas de microrganismos dominam o mercado consumidor, uma vez que são componentes de fácil obtenção e alto desempenho reacional (ALI; MUHAMMAD, 2017). As proteases microbianas normalmente são obtidas por meio de processos fermentativos ou por técnicas de modificação genética e constituem o grupo de enzimas com maior aplicação industrial, podendo ser destinadas ao processamento de couro, produção de detergentes, setor farmacêutico, fabricação de alimentos, ração animal e laticínios (SINGH *et al.*, 2016).

## 2.2 APLICAÇÃO INDUSTRIAL DE ENZIMAS MICROBIANAS

As enzimas microbianas oferecem benefícios multifacetados quando comparadas aos processos químicos clássicos, no que se refere à sustentabilidade, rentabilidade e eficiência da reação (SINGH *et al.*, 2016). Nos últimos anos, diversos setores industriais demonstraram otimização nos processos a partir do emprego de catalisadores nas reações, sobretudo aqueles de origem microbiana (CHAPMAN; ISMAIL; DINU, 2018).

Os catalisadores biológicos podem ser aplicados em diversos ramos industriais, nos quais se destacam: (a) indústria médico-farmacêutica, na obtenção de fármacos ativos, altamente seletivos; (b) indústria de biocombustíveis, na produção de combustíveis renováveis, com o intuito de suplementar ou substituir a utilização de combustíveis fósseis; (c) indústria de alimentos, nos processos de preservação, modificação da qualidade e síntese de fragrâncias aromáticas em bebidas e alimentos; (d) indústria de detergentes, na redução dos danos causados às superfícies pela ação de agentes detergentes convencionais (CALLENDER; DYER, 2015; AZEVEDO; LIMA, 2016; PELLIS *et al.*, 2018).

## 2.3 BIOPROSPECÇÃO DE MICRORGANISMOS

O isolamento de linhagens produtoras de enzimas pode ser realizado por meio da bioprospecção, metodologia na qual uma amostra de interesse é coletada, processada e submetida à triagem, visando a obtenção de organismos, oriundos de fontes naturais, e que sejam úteis à humanidade (LAMILLA *et al.*, 2017). Devido à alta diversidade genética e metabólica dos microrganismos presentes na compostagem, a obtenção de cepas advindas desse processo orgânico apresenta potencial para obtenção e produção de diversas enzimas de interesse biotecnológico e industrial (LIMA, 2018).

A associação entre biodiversidade e bioprospecção de novos organismos tornou-se o cerne da biotecnologia moderna, uma vez que a tecnologia vem desenvolvendo-se de forma acelerada no cenário mundial e tem elevada utilização nas áreas alimentícias, medicinais, ambientais e industriais (SOUZA; FIGUEIREDO, 2015). Acredita-se que a aplicação de enzimas hidrolíticas microbianas nos processos industriais se tornará uma das maiores forças propulsoras da economia nacional nas próximas décadas (BOLZANI, 2016).

## 2.4 COMPOSTAGEM

A compostagem é um processo biológico de transformação de compostos orgânicos em matérias húmicas, que culmina na formação de um adubo orgânico homogêneo, de cor escura, cuja funcionalidade é otimizar as propriedades físicas, químicas, biológicas, nutricionais e estruturais do solo (COTTA *et al.*, 2015). O processo é simples e pode ser realizado em escala residencial, uma vez que não requer equipamentos específicos nem exige mão de obra especializada. Basicamente, é necessário uniformizar o tamanho das partículas destinadas à decomposição e controlar as condições de temperatura e umidade das leiras de matéria orgânica (SILVA *et al.*, 2018).

Os refulos alimentares são considerados ótimos substratos para ação dos microrganismos decompositores presentes abundantemente no solo e representam cerca de 70% do volume total de rejeito produzido diariamente (SOUZA; FIGUEIREDO, 2015). Dessa forma, o processo de compostagem pode ser realizado como uma alternativa de tratamento para compostos de natureza orgânica, já que estes constituem a maior fonte de resíduo domiciliar gerado (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2001; COTTA *et al.*, 2015).

Na compostagem existe uma organização complexa de microrganismos, na qual cada grupo desenvolve uma atividade específica na degradação da matéria orgânica, seja ela de origem animal ou vegetal (NICOLAU, 2016). O balanço populacional existente no sistema permite o aumento da eficiência do processo de decomposição e, conseqüentemente, a liberação de nutrientes benéficos ao solo em quantidades adequadas (RIBEIRO *et al.*, 2017). Devido a sua versatilidade e variabilidade genética, as bactérias presentes na compostagem vêm sendo estudadas com a finalidade de se obter compostos bioativos de interesse industrial (COTTA *et al.*, 2015).

## 2.5 BACTÉRIAS

As bactérias são organismos procariontes, altamente resistentes e diversificados, que vivem isoladamente ou em colônias (DROFFNER; BRINTON-JUNIOR; EVANS, 1995). Com o advento da tecnologia de DNA recombinante, as bactérias tornaram-se um dos principais microrganismos estudados e utilizados na obtenção de enzimas hidrolíticas de interesse comercial, devido a sua rápida multiplicação celular e capacidade de adaptação em diferentes fontes de substrato (SHARMA; SATYANARAYANA, 2015).

No processo de compostagem, as bactérias realizam a quebra inicial dos compostos orgânicos e são responsáveis pela produção de substâncias bacteriostáticas e bactericidas, que resultam na inibição de algumas populações microbianas patogênicas e indesejáveis (BRIETZKE, 2016). Além disso, essas populações bacterianas decompõem, por meio do seu arsenal enzimático, os açúcares, amidos, proteínas e outros compostos presentes na matéria orgânica, transformando-os em moléculas que podem ser metabolizadas por outros organismos, além de enriquecer e nutrir o solo (TIECHER, 2016).

### **3 METODOLOGIA**

O trabalho baseou-se em experimentos qualitativos e semiquantitativos e a pesquisa descritiva foi utilizada como ferramenta de metodologia (ZANETTE, 2017). Amostras do Projeto Compostagem, da Faculdade Ciências da Vida, foram coletadas para a realização dos ensaios biológicos, que foram efetuados no laboratório de Microbiologia da Faculdade Ciências da Vida, localizada no município de Sete Lagoas, Minas Gerais. Para realização desse experimento, utilizou-se um composto orgânico pronto, o qual foi submetido ao processo de compostagem no primeiro semestre de 2019.

#### **3.1 ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE BACTÉRIAS**

Uma amostra de 5g do composto foi coletada e acrescida de 45mL de solução salina 0,85% estéril, com subsequente homogeneização. Posteriormente, uma alíquota de 1mL foi retirada e destinada às diluições seriadas decimais ( $10^{-1}$  a  $10^{-3}$ ). Em seguida, uma alíquota de 100 $\mu$ L de cada diluição foi plaqueada em meio Batata Dextrose Ágar – BDA (200g de batata, 20g de dextrose, 15g de ágar, por litro), através da técnica de espalhamento em superfície com o auxílio de uma alça de Drigalski e, posteriormente, as placas foram incubadas a 37°C por 24-48 horas. Todo o procedimento foi realizado em triplicata (HUNGRIA; ARAUJO, 1994).

Realizada a obtenção, as estirpes selecionadas foram submetidas à avaliação dos aspectos morfológicos, de acordo com Shirling; Gottlieb (1966). Em seguida, 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 BACTÉRIAS

Os isolados foram cultivados em meio BDA, a 37°C durante 24-48 horas, em placas de Petri. Para avaliação macromorfológica, considerou-se a avaliação de aspectos como cor, borda e elevação das colônias (SHIRLING; GOTTLIEB, 1966). Para análise micromorfológica, os microrganismos previamente identificados como prováveis bactérias foram avaliados por meio da técnica de Coloração de Gram, utilizando um microscópio ótico para visualização das estruturas morfológicas (SHIRLING; GOTTLIEB, 1966; MAI-PROCHNOW *et al.*, 2016).

## 3.3 CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA DE BACTÉRIAS

### 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 6,6g/L. Os isolados foram inoculados na forma de *spots* e em triplicata no meio ágar amido (6,6g/L de amido solúvel, 0,5g/L de cloreto de sódio, 3g/L de extrato de carne, 1g/L de peptona caseína, 15g/L de ágar; pH 7,0). As culturas foram incubadas a 37°C por 48 horas, sendo, posteriormente, adicionadas 10mL de solução diluída de lugol (5g/L de iodo, 10g/L de iodeto de potássio) em cada placa. A detecção da enzima foi realizada observando-se se houve 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 lipase

A produção de lipase foi realizada segundo o trabalho de Savitha *et al.* (2007), utilizando meio de cultura composto por 5g/L peptona, 1g/L de extrato de levedura, 4g/L de cloreto de sódio, 15g/L de ágar, 31,25mL/L de óleo de oliva, 0,01g/L de rodamina B; pH 7,0. Os isolados foram inoculados nesse meio na forma de *spots*, em triplicata, e incubados a 37°C por 48 horas. Após o período de incubação, as culturas foram expostas à radiação ultravioleta para observar a formação de halos de coloração azul em torno das colônias, que é o parâmetro indicativo da presença da enzima lipase (COLEN, 2006).

### 3.3.3 Produção de protease

A produção de protease foi realizada conforme o estudo de Orlandelli *et al.* (2011), utilizando meio de cultura Ágar-gelatina-leite (18g/L de ágar, 10g/L de leite em pó desnatado e 10g/L de gelatina em pó). Os isolados foram inoculados nesse meio na forma de *spots*, em triplicata, e incubados a 37°C por 48 horas. A produção de protease foi observada nas placas sem a necessidade de um agente 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, lipase 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:  $IE = DH/DC$ , onde DH representa o diâmetro do halo de hidrólise (mm) e DC representa o diâmetro das colônias dos isolados (mm) (STAMFORD *et al.*, 1998; SILVA *et al.*, 2015).

## 3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os ensaios de atividade enzimática seguiram o delineamento inteiramente casualizado (DIC), considerando 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, por meio do *software* SISVAR<sup>®</sup> 5.3 (FERREIRA, 2010).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE BACTÉRIAS

No presente estudo, foram identificadas 40 colônias de microrganismos distintos, após o isolamento realizado da amostra de composto orgânico. No entanto, após minuciosa avaliação das características morfológicas destes isolados, observou-se que apenas 12 eram representantes de bactérias. A baixa variabilidade genética obtida neste trabalho pode estar relacionada à idade do composto utilizado, pois o mesmo encontrava-se maturado desde o primeiro semestre de 2019. Oliveira *et al.* (2008) e Brietzke (2016) relatam que a idade do

composto orgânico pode interferir na quantidade e na diversidade de bactérias presentes, já que estes microrganismos possuem pico de atividade nas fases iniciais do processo (mesofílica e termofílica), onde temperaturas mais elevadas auxiliam na decomposição acelerada matéria orgânica.

Os dados referentes às características macro e micromorfológicas dos isolados, encontram-se na Tabela 1. Observou-se variação de características como: (a) cor, com predominância de colônias brancas (33,35%); (b) borda, com predominância de formato regular (58,34%) e (c) elevação, com predominância de colônias planas (58,34%). Os aspectos macromorfológicos dos isolados bacterianos não revelaram alta variabilidade. Este fato pode estar associado à modificação adaptativa ao meio ou à capacidade que esses microrganismos possuem de assumir uma morfologia em resposta às condições ambientais adversas (KOCH, 1996; YOUNG, 2008).

A análise micromorfológica dos isolados selecionados (Tabela 1) foi realizada com base na observação das lâminas coradas através do Método de Gram em microscópio ótico (SHIRLING; GOTTLIEB, 1966; MAI-PROCHNOW *et al.*, 2016). Apesar de os isolados não terem apresentado grande diversidade quanto às características macroscópicas, revelou-se a presença cinco tipos de morfologia distintos, sendo bacilos (41,66%), cocos (16,67%), diplococos (16,67%), estafilococos (16,67%) e estreptococos (8,33%). Nota-se que a presença de bactérias Gram-negativas (66,66%) foi predominante neste estudo. Esses microrganismos possuem elevado potencial para degradar compostos aromáticos e xenobióticos, por isso, são frequentemente associados a processos industriais e de biorremediação (FERMOR; RANDLE; SMITH, 1985; MOREIRA; SIQUEIRA, 2002; CHEN *et al.*, 2004).

**Tabela 1.** Classificação morfológica das colônias bacterianas isoladas da compostagem.

Colônias	Características Culturais				
	Macromorfologia			Micromorfologia	
	Cor	Borda	Elevação	Morfologia	Gram
<b>B1</b>	Laranja	Irregular	Convexa	Diplococos	Gram-negativos
<b>B2</b>	Laranja claro	Redonda	Convexa	Cocos	Gram-negativos
<b>B3</b>	Creme	Irregular	Convexa	Estreptococos	Gram-negativos
<b>B4</b>	Amarela	Redonda	Plana	Bacilos	Gram-negativos
<b>B5</b>	Vermelha	Redonda	Plana	Bacilos	Gram-negativos
<b>B6</b>	Branca	Redonda	Plana	Estafilococos	Gram-negativos
<b>B7</b>	Marrom	Redonda	Plana	Cocos	Gram-positivos
<b>B8</b>	Amarela	Irregular	Plana	Bacilos	Gram-negativos
<b>B9</b>	Branca	Redonda	Convexa	Estafilococos	Gram-positivos
<b>B10</b>	Branca	Redonda	Plana	Bacilos	Gram-positivos
<b>B11</b>	Amarela	Irregular	Convexa	Diplococos	Gram-negativos
<b>B12</b>	Branca	Irregular	Plana	Bacilos	Gram-positivos

## 4.2 CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA DE BACTÉRIAS

Os dados da atividade enzimática da amilase, lipase e protease estão dispostos na Tabela 2. Observou-se que 91,66% dos isolados possuem capacidade para sintetizar pelo menos uma das enzimas testadas, mesmo que estes não tenham apresentado atividade enzimática eficiente (Índice enzimático < 2,0). A produção de amilase, lipase e protease foi observada em 41,67%, 41,67% e 33,33% das estirpes, respectivamente. O isolado B6 não apresentou atividade enzimática para nenhuma das biomoléculas avaliadas.

**Tabela 2.** Índice enzimático (IE) de amilase, lipase e protease de isolados de bactérias obtidas de compostagem.

Isolado	Índice Enzimático		
	Amilase	Lipase	Protease
<b>B1</b>	2,15a	1,50c	0,00
<b>B10</b>	2,12a	0,00	0,00
<b>B7</b>	1,24b	2,08a	0,00
<b>B5</b>	1,17c	0,00	0,00
<b>B2</b>	1,13d	0,00	0,00
<b>B3</b>	0,00	0,00	2,14a
<b>B4</b>	0,00	2,21a	0,00
<b>B6</b>	0,00	0,00	0,00
<b>B8</b>	0,00	0,00	1,95b
<b>B9</b>	0,00	1,07d	0,00
<b>B11</b>	0,00	1,84b	2,13a
<b>B12</b>	0,00	0,00	1,74c

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 formação de halo amarelo claro ao redor da colônia indicou a hidrólise do amido, após revelação das placas de Petri com solução diluída de lugol (MARIANO; SILVEIRA, 2005). A ocorrência de halo de degradação foi observada em apenas 5 (41,67%) isolados no presente trabalho, com valores de IE variando entre 1,13 e 2,15 (Tabela 2).

Das estirpes isoladas, B1 e B10 (16,66%) apresentaram  $IE \geq 2,0$ , portanto, foram classificadas como potenciais produtoras de amilase (LEALEM; GASHE, 1994). Os isolados B2, B5 e B7 (25,0%) não apresentaram atividade amilolítica eficiente ( $IE < 2$ ). Do total de 12 cepas, 7 (58,33%) não formaram halo de degradação nas condições avaliadas, o que evidencia que os mesmos não foram capazes de produzir amilase.

A baixa ocorrência de bactérias produtoras de amilase também foi observada por Sacco (2013), onde apenas 43,75% dos isolados obtidos de amostras de consórcios formados de solo contendo palha ou bagaço de cana-de-açúcar em decomposição foram capazes de produzir a enzima. Segundo Kim *et al.* (2006), microrganismos cultivados em cultura pura regularmente apresentam atividades enzimáticas insatisfatórias. Além disso, as enzimas de alguns isolados podem não se difundir no meio de cultivo, o que impossibilita a formação de halo de degradação (SALYERS; REEVES; D'ELIA, 1996).

#### 4.2.2 Detecção da atividade lipolítica

A atividade lipolítica dos microrganismos foi indicada pela formação de halo azul ao redor da colônia, após a submissão do meio de cultivo à radiação ultravioleta (MENEZES; ASSIS, 2004; RODRIGUES *et al.*, 2016).

Do total de 12 cepas, 7 (58,33%) não formaram halo nas condições avaliadas, o que evidencia que os mesmos não foram capazes de produzir lipase, conforme demonstrado na Tabela 2. Valores de IE para as 5 (41,67%) linhagens que apresentaram resultado positivo variaram entre 1,07 e 2,21. O IE para atividade lipolítica variou significativamente ( $p \leq 0,05$ ) entre os microrganismos avaliados, sendo os isolados B4 e B7 (16,66%) considerados bons produtores, já que apresentaram valores superiores a 2 (LEALEM; GASHE, 1994). As linhagens B1, B9 e B11 (25,0%) não produziram enzima suficiente para serem caracterizadas boas produtoras, uma vez que apresentaram  $IE < 2$ , indicando baixa atividade lipolítica.

O baixo índice de isolados produtores e classificados como bons produtores de lipases pode estar associado às temperaturas de incubação e/ou especificidade do substrato utilizado, já que estas enzimas são altamente específicas e suas atividades hidrolíticas podem variar conforme a composição de triglicerídeos incorporados ao meio de cultivo (NITHANGENI *et al.*, 2001; VAN DER SAND *et al.*, 2014).

#### 4.2.3 Detecção da atividade proteolítica

A atividade proteolítica foi determinada pela formação de halo claro ao redor das colônias bacterianas (ORLANDELL *et al.*, 2011). O IE para produção de protease (Tabela 2) variou significativamente ( $p \leq 0,05$ ) entre as bactérias avaliadas, sendo que 4 (33,33%) isolados foram considerados produtores desta enzima, devido a presença de halo de degradação no meio de cultura, com valores variando de 1,74 a 2,14.

Das estirpes isoladas, observou-se que 8 (66,67%) microrganismos não foram capazes de hidrolisar a proteína do leite e 2 (16,67%) isolados não produziram enzima suficiente para serem caracterizados como bons produtores, pois apresentaram  $IE < 2$ . Os isolados B3 e B11 apresentaram  $IE \geq 2,0$ , portanto, foram classificados como potenciais produtores de protease (LEALEM; GASHE, 1994).

Fatores como a concentração de glicose e peptona são determinantes para aumentar a produção de proteases e podem não ter sido suficientes na suplementação do meio (COCHRAN; COX, 1992). Além disso, a repressão da produção da enzima de interesse pode ter acontecido devido a algum composto presente no meio ou até mesmo devido a fatores físicos, como pH, temperatura e tempo de incubação (NEHETE; SHAH; KOTHARI, 1985; CRUEGER; CRUEGER, 1993; JOHNVESLY; NAIKI, 2001; CABRAL *et al.*, 2016).

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Entre as bactérias isoladas da compostagem, existe baixa variabilidade genética em relação às características morfológicas analisadas. A maioria dos isolados (91,66%) hidrolisa pelo menos um dos substratos utilizados para bioprospecção enzimática. As estirpes B1 e B10 apresentaram maior produção de amilase, B4 e B7 de lipase e B3 e B11 de protease ( $IE \geq 2$ ), revelando o alto potencial biotecnológico destas linhagens para síntese de enzimas em escala industrial. O composto orgânico maturado foi uma limitação no presente estudo, no que tange a diversidade genética de bactérias presentes no substrato avaliado. Deste modo, sugere-se que, na realização de trabalhos futuros, seja utilizado composto não maturado. O presente estudo contribui com a busca por linhagens de microrganismos potencialmente produtores de biomoléculas de interesse industrial, sendo que se faz necessário a continuidade do trabalho, visando otimizar os processos de obtenção de enzimas e a diferenciação molecular das estirpes encontradas.

## REFERÊNCIAS

- ALI, S.; MUHAMMAD, Y. G. Industrial application of microbial proteases. **European Journal of Pharmaceutical and Medical Research**. v.4. n.6. p.623-629. 2017.
- ANBU, P.; GOPINATH, C. B. S.; CHAULAGAIN, B. P.; LAKSHMIPRIYA, T. Microbial Enzymes and Their Applications in Industries and Medicine. **BioMed Research International**. 2017.

- AZEVEDO, A. N. G.; LIMA, B. G. A. Biocombustíveis: desenvolvimento e inserção internacional. **Revista Direito Ambiental e sociedade**. v. 6. n. 1. p.77-100. 2016.
- BHATIA, A.; RAJPAL, A.; MADAN, S.; KAZMI, A. A. Techniques to analyze microbial diversity during composting – A mini review. **Indian Journal of Biotechnology**. v.14. p.19-25. 2015.
- BOLZANI, V. S. Biodiversidade, bioprospecção e inovação no Brasil. **Ciência e Cultura**. v.68. n.1. p.04-05. 2016.
- BRIETZKE, D. T. **Avaliação do processo de compostagem considerando a relação carbono/nitrogênio**. Centro Universitário Univates. Lajeado. 2016.
- CABRAL, M.; LIMA, M.; FERNANDES, G.; COSTA, E.; PORTO, A.; CAVALCANTI, M. (2016). Queijos artesanais: fonte de bactérias ácido lácticas selvagens para formulação de fermentos tradicionais. **Journal of Bioenergy and Food Science**, 3(4), p.207-215.
- CALLENDER, R.; DYER, R. B. The Dynamical Nature of Enzymatic Catalysis. **Accounts of Chemical Research**. v.48. p.407–413. 2015
- CHAPMAN, J.; ISMAIL, A. E.; DINU, C. Z. Industrial Applications of Enzymes: Recent Advances, Techniques, and Outlooks. **Catalysts**. v.8. n.6. p.238. 2018.
- CHEN, W. M.; CHANG, J. S.; WU, C. H.; CHANG, S. C. Characterization of phenol and trichloroethene degradation by the rhizobium *Ralstonia taiwanensis*. **Research in Microbiology**. 155: 672-680 (2004).
- COCHRAN, W. G.; COX, G. M. **Experimental designs**. 2<sup>nd</sup>. Ed. New York: J. Wiley and sons, 1992. p.335-375.
- COLEN, G. **Isolamento e seleção de fungos filamentosos produtores de lipases**. 2006. 206p. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- COON, H. J.; JENNISON, M. W.; WEEK, O. B. Routine tests for the identification of bacteria. **Manual of microbiological methods**. New York: McGraw-Hall. p.239-262. 1957.
- COTTA, J. A. O.; CARVALHO, N. L. C.; BRUM, T. S.; REZENDE, M. O. O. Compostagem versus vermicompostagem: comparação das técnicas utilizando resíduos vegetais, esterco bovino e serragem. **Engenharia Sanitária e Ambiental**. v.20.n.1. p.65-78. 2015.
- CUESTA, S. M.; RAHMAN, S. A.; FURNHAM, N.; THORNTON, J. M. The Classification and Evolution of Enzyme Function. **Biophysical Perspective**. v.109. n.6. p.1082-1086. 2015.
- CRUEGER, W.; CRUEGER, A. **Biotecnologia: manual de microbiologia industrial**. Zaragoza: Acirbia, 1993. p.413.
- DROFFNER, M. L.; BRINTON-JUNIOR, W. F.; EVANS, E. Evidence for the prominence of well characterized mesophilic bacteria in thermophilic (50–70°C) composting environments. **Biomass and Bioenergy**. v.8. n.3. p.191-195. 1995.
- FERMOR, T. R.; RANDLE, P. E.; SMITH, J. F. **Compost as substrate and its preparation**. In: Flegg P.B., Spencer D.M, Wood D.A., editors. *The Biology and Technology of the Cultivated Mushroom*. Chichester, UK.: John Wiley; 1985. pp. 81–109.

- FERREIRA, D. F. **SISVAR - Sistema de análise de variância**. Versão 5.3. DEX. Lavras/MG: UFLA, 2010.
- GONÇALVES, C. C. S.; FONSECA, F. S. A. Reações de Oxidação Catalisadas por Enzimas. **Revista Virtual de Química**. v.10. n.4. p.778-797. 2018.
- GUERRAND, D. Lipases industrial applications: focus on food and agroindustry. **Oilseeds and fats, Crops and Lipids Journal**. v.24. n.4. 2017.
- HUNGRIA, M.; ARAUJO, R. S. **Microrganismos de importância agrícola**. Brasília: Embrapa SPI, 1994. (Embrapa, Documentos, 44).
- KIM, S; HOLTZAPPLE, M. T. Effect of structural features on enzyme digestibility of corn stover. **Bioresource Technology**. v.97, n.4, p.583–591, 2006.
- JOHNVESLY, B.; NAIK, G. R. Studies on production of thermostable alkaline protease from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus* sp. JB-99 in chemically defined medium. **Process Biochemistry**. Oxford, UK. v.37. p.139-144, 2001.
- KOCH, A. L. What size should a bacterium be? A question of scale. **Annual Review of Microbiology**. 1996;50:317–348.
- LAMILLA, C.; PAVEZ, M.; SANTOS, A.; HERMOSILLA, A.; LANQUINAO, V.; BARRIENTOS, L. Bioprospecting for extracellular enzymes from culturable *Actinobacteria* from the South Shetland Islands, Antarctica. **Polar Biology**. v.40. n.3. p.719–726. 2017.
- LEALEM, F.; GASHE, B. A. Amylase production by a gram-positive bacterium isolated from fermenting tef. (*Eraglostis tef.*). **Journal of applied bacteriology**. v.77. .p.348-352. 1994
- LECHUGA, E. G. O.; ZAPATA, I. Q.; NIÑO, K. A. Detection of extracellular enzymatic activity in microorganisms isolated from waste vegetable oil contaminated soil using plate methodologies. **African Journal of Biotechnology**. v.15. n.11. pp.408-416. 2016.
- LIMA, P. S. **Prospecção de bactérias isoladas do solo da agroindústria potencialmente produtoras de enzimas e polímeros**. Centro de Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2018.
- LIN, B.; TAO, Y. Whole-cell biocatalysts by design. **Microbial Cell Factories**. v.16. p.106. 2017.
- LIU, X.; KOKARE, C. Microbial enzymes of use in industry. **Biotechnology of Microbial Enzymes**. Academic Press. p. 267-298. 2017.
- MAI-PROCHNOW, A.; CLAUSON, M.; HONG, J.; MURPHY, A. B. Gram-positive and Gram-negative bacteria. **Nature Scientific Reports**. v.6. 2016.
- MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E. B. (Eds.) 2005. **Manual de práticas em fitobacteriologia**. 2. ed. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 158p.
- MENEZES, M.; ASSIS, S. M. P. (2004) **Guia prático para fungos fitopatogênicos**. Recife: Imprensa Universitária UFRPE. 106 p.
- MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **RESOLUÇÃO CONAMA nº 275, de 25 de abril de 2001**. Publicada no DOU no 117-E, de 19 de junho de 2001, Seção 1, página 80.

- MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: Editora UFLA, 2002. 625 p.
- NEHETE, P. N.; SHAH, V. D.; KOTHARI, R. M. Profiles of alkaline protease production as a function of composition of the slant, age, transfer and isolate number and physiological state of culture. **Biotechnology Letters**. Dordrecht, NE. v.7. p.413-418. 1985.
- NICOLAU, P. B. **Microrganismo e ambiente: ar e água, solo e extremos**. Universidade Estadual Paulista. São Paulo. 2016.
- NITHANGENI, M. B.; PATTERTON, H. G.; TANDER, A. V.; VERGEER, W. P.; LITTHAUER, D. Over-expression and properties of a purified recombinant *Bacillus licheniformis* lipase: a comparative report on *Bacillus* lipases. **Enzyme Microbial Technology**. v.28, p.705-712, 2001.
- OLIVEIRA, E. C. A.; SARTORI, R. H.; GARCEZ, T. B. **Compostagem**. 2008. São Paulo: Embrapa SPI, 2008. Centro de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade Federal de São Paulo, Piracicaba, 2008.
- OSBON, T.; KUMAR, M. Biocatalysis and Strategies for Enzyme Improvement. **Biophysical Chemistry**. Intechpen. 2018.
- ORLANDELLI, R.C.; ALMEIDA, T.T.; AZEVEDO, J.L.; PAMPHILE, 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.
- PELLIS, A.; CANTONE, S.; EBERT, C.; GARDOSSE, L. Evolving biocatalysis to meet bioeconomy challenges and opportunities. **New Biotechnology**. v.40. p.154-169. 2018.
- RAVEENDRAM, S.; PARAMESWARAN, B.; UMMALYMA, S. B.; ABRAHAM, A.; MATHEW, A. K.; MADHAVAN, A.; REBELLO, S.; PANDEY, A. Applications of Microbial Enzymes in Food Industry. **Food Technology and Biotechnology**. v.56. n.1. p.16–30. 2018.
- RIBEIRO, N. Q.; SOUZA, T. P.; COSTA, L. M. A. S.; CASTRO, C. P.; DIAS, E. S. Microbial additives in the composting process. **Ciência e agrotecnologia**. v.41. n.2. p.159-168. 2017.
- RIGOLDI, F.; DONINI, S.; REDAELLI, A.; PARISINI, E.; GAUTIERI, A. Review: Engineering of thermostable enzymes for industrial applications. **APL Bioengineering**. v.2. 2017.
- RODRIGUES, C.; CASSINI, S. T.; ANTUNES, P. W.; KELLER, R. P.; GONÇALVES, R. F. Isolamento e seleção de fungos produtores de lipases com base na atividade lipásica e no potencial hidrolítico sobre óleo comestível de soja e espuma de caixa de gordura. **Revista Engenharia Saniária e Ambiental**. v.21. n.4. p.507-518. 2016.
- SACCO, L. P. **Isolamento de bactérias produtoras de enzimas de interesse em processos biotecnológicos**. 68 p. Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP, 2013.
- SAINI, R.; DAHIYA, A. Amylases: Characteristics and industrial applications. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**. v.6. n.4. p.1865-1871. 2017.

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.

SAVITHA, J.; SRIVIDYA, S.; JAGAT, R.; PAYAL, P.; PRIYANKI, S.; RASHMI, G.W.; ROSHINI, K.T.; SHANTALA, Y.M. Identification of potential fungal strain (s) for the production of inducible, extracellular and alkalophilic lipase. **African Journal of Biotechnology**. v.6. p.564 -568. 2007.

SHARMA, A.; SAHA, T. N.; ARORA, A.; SHAH, R.; NAIN, L. Efficient Microorganism Compost Benefits Plant Growth and Improves Soil Health in Calendula and Marigold. **Horticultural Plant Journal**. v.3. n.2. 2017.

SHARMA, A.; SATYANARAYANA, T. Microbial acid-stable  $\alpha$ -amylases: Characteristics, genetic engineering and applications. **Process Biochemistry**. v.48. n.2. p.201-211. 2015.

SHELATKAR, T.; PADALIA, V. Lipase: An Overview and its Industrial Applications. **International Journal of Engineering Science and Computing**. v.6. n.10. 2016.

SHIRLING, E. B.; GOTTLIEB, D. Methods for characterization of Streptomyces species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v.16. p.313-340. 1966.

SILVA, F. C.; FALCÃO, M. T.; OLIVEIRA, S. K. S.; VIEIRA, R. B.; SCACABAROSSO, H. Disposição irregular dos resíduos sólidos urbanos e suas influências na saúde pública no município de Mucajaí – RR. **Revista Geonorte**. v.9. n.33. p.111-125.2018.

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.; MITTAL, A.; KUMAR, M.; MEHTA, P.K. Microbial Proteases in Commercial Applications. **Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences**. v.4. n.3. p.365-374. 2016.

SINGH, R., KUMAR, M.; MITTAL, A.; MEHTA, P. K. Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. **3 Biotech Journal**. v.6 .n.2. p.174. 2016.

SOUZA, K. A.; FIGUEIREDO, G. L. A. S. Bioonegócios e desenvolvimento alternativo no estado do Amazonas (Brasil). **Revista de História**. Universidade Estadual de Goiás. v.4. p.139-159. 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.

TIECHER, T. **Manejo e conservação do solo e da água em pequenas propriedades rurais no sul do Brasil: práticas alternativas de manejo visando à conservação do solo e da água**. Editora UFRGS. Porto Alegre. 2016.

VAN DER SAND, S. T.; MINOTTO, E.; MILAGRE, L.P.; OLIVEIRA, M.T. Enzyme characterization of endophytic actinobacteria isolated from tomato plants. **Journal of Advanced Scientific Research**, v.5, p.16-23, 2014.

YOUNG, K. D. Bacterial morphology: why have different shapes?. **Current Opinion in Microbiology**. v.6. p.596–600. 2007.

YVERGNAUX, F. Lipases: particularly effective biocatalysts for cosmetic active ingredients. **Oilseeds and fats, Crops and Lipids Journal**. v.24. n.4. 2017.

ZANETTE, M. S. Pesquisa qualitativa no contexto da Educação no Brasil. **Educação em Revista**. n.65. p.149-166. 2017.

ZHANG, Q.; HAN, Y.; XIAO, H. Microbial  $\alpha$ -amylase: A biomolecular overview. **Process Biochemistry**. v.53. p.88-101. 2017.

ZUCCONI, F.; BERTOLDI, M. Composts specifications for the production and characterization of composts from municipal solid waste. In Compost: production, quality and use, M de Bertoldi, M.P. Ferranti, P.L'Hermite, F.Zucconi eds. **Elsevier Applied Science**. London, 30-50p, 1987.