

BIOPROSPECÇÃO DE MICRORGANISMOS PRODUTORES DE ENZIMAS

Ligiane Aparecida Florentino¹

Thaís Cristina Franco²

Sistema de produção sustentável

Resumo

Os microrganismos possuem alta diversidade molecular e metabólica, sendo fonte de produtos bioativos naturais, como a produção de enzimas, as quais são amplamente utilizadas em processos industriais devido sua capacidade de atuar como catalizador, acelerando a velocidade das reações. Diante disso, o presente trabalho buscou identificar e selecionar a presença de atividade amilolítica e celulolítica em oito estirpes bacterianas promotoras de crescimento vegetal, utilizando dois meios distintos de cultura, contendo fontes únicas de carbono, farelo de milho e CMC. A presença das enzimas foi diagnosticada por meio de testes de formação de halo de degradação, formados nos meios de cultura. Como resultado, das estirpes testadas, foi verificado que a UNIFENAS 100-24 se mostrou potencialmente capaz de degradar o amido e a celulose, sendo, portanto, uma característica desejável para a manutenção da qualidade do solo e desenvolvimento vegetal.

Palavras-chave: Bactérias; Amilase; Celulase.

¹ Prof. Dra., Universidade José do Rosário Vellano – Campus Alfenas, Departamento Ciências Agrárias, ligiane.florentino@unifenas.br.

² Aluna do Curso de Agronomia, Universidade José do Rosário Vellano, Departamento Ciências Agrárias, thais_cfranco@hotmail.com.

INTRODUÇÃO

As enzimas são biocatalisadores, em sua maioria de origem proteica, capazes de promover reações de maneira mais rápida, eficiente e ambientalmente sustentável (LUZ et al., 2016). Segundo Camargo (2009), esses catalisadores biológicos podem ser extraídos de tecidos animais, vegetais e de microrganismos. As enzimas microbianas se expressão atualmente como as principais fontes de produção de enzimas usadas industrialmente, isso devido a algumas características como a grande quantidade de produto em tempo relativamente curto, a não dependência de condições ambientais e gasto reduzido no uso de matérias primas (ZIMMER et al., 2009).

De acordo com Spier et al. (2004), as enzimas amilolíticas tem a finalidade de alterar matérias-primas amiláceas e/ou adquirir produtos próprios, são capazes de hidrolisar moléculas de amido permitindo que pequenos polímeros de açúcares sejam liberados (GUPTA et al., 2003 e PANDEY et al., 2005). É empregado na indústria de alimentos, na etapa de degomagem na indústria têxtil, na indústria de papel, na indústria química e também aplicado na indústria de ração animal.

As celulasas exercem um papel importante sobre as indústrias de bioenergia e produtos de origem biológica, provocam uma motivação no desenvolvimento e seleção de enzimas celulolíticas por meio de microrganismos que se apliquem à hidrólise da celulose das paredes celulares dos vegetais (ZHANG et al., 2006). Para o emprego em compostagem, assepsia de tanques e tratamentos de resíduos e efluentes, adequa-se também produtos contendo amilases, proteases, lipases e celulasas (EDC, 2004).

Objetiva- se com esse trabalho, identificar e selecionar bactérias promotoras do crescimento vegetal, isoladas do solo, capazes de produzir as enzimas amilase e celulase.

METODOLOGIA

Os experimentos deste trabalho foram realizados no laboratório de microbiologia do solo do setor da agronomia, na UNIFENAS, em Alfenas, MG.

Os microrganismos, 8 estirpes bacterianas, utilizados, foram: UNIFENAS 100-31, UNIFENAS 100-24, UNIFENAS 100-50, UNIFENAS 100-69, UNIFENAS 100-59,

UNIFENAS 100-74, UNIFENAS 100-71 e UNIFENAS 100-72. São estirpes isoladas do solo rizosférico de *Brachiaria brizantha*, sendo testadas quanto ao potencial de atuar como promotoras do crescimento vegetal, e pertencem à coleção do Laboratório de Microbiologia do solo do Setor da Agronomia, na UNIFENAS, em Alfenas, MG.

O método utilizado para a conservação das estirpes foi repicagem em ágar nutriente e posteriormente transferida para o meio líquido até sua fase log (10^8 células mL⁻¹) para a seleção de bactérias com capacidade para produzir enzimas.

Para a seleção das bactérias promotoras de amilase, foi adotada a metodologia de Rabalho (2002), onde o meio de seleção foi composto de: 10g de farelo de milho esterilizado umedecido com uma solução de sais contendo 0,14% de (NH₄)₂SO₄, 0,20% de K₂HPO₄, 0,02% de MgSO₄.7H₂O e 0,10% da solução de micronutriente, pH foi ajustado 6,5 a 6,8.

Em placas de Petri contendo o meio de seleção, foram inoculadas 20 µL da suspensão bacteriana em pontos, sendo realizada quadruplicada, e em seguida incubadas em estufas à 28°C. Após 48h, foram analisadas e medidas o diâmetro de cada colônia e as placas foram inundadas com solução de iodo. A comprovação da atividade enzimática foi por meio da formação de um halo claro ao redor do ponto onde a estirpe foi inoculada (ROCHA, 2010), que posteriormente foi medido com um paquímetro.

A fim de selecionar bactérias promotoras de celulase, as estirpes foram cultivadas em placas contendo meio sólido carboximetilcelulase (CMC) como fonte de carbono, metodologia de Santos et al., (2010) adaptada. Foi realizada quadruplicada de pocinhos em cada placa com 140 µL de suspensão bacteriana, sob estufa a 28°C. Após 24h, foram coradas com uma solução de Vermelho do Congo 1% por 10 minutos e descoradas com a solução de NaCl 0,5% para aumentar o contraste do halo, indicando sua atividade enzimática. Para cada microrganismo foi medido os respectivos halos com um paquímetro.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das estirpes bacterianas avaliadas quanto à produção de amilase e celulase, observou-se que a estirpe UNIFENAS 100-24 apresentou uma melhor capacidade na degradação, formando halos, conforme apresentado na Figura I, respectivamente.

A revelação de um halo enzimático ao redor da estirpe foi por meio do teste de iodo e vermelho congo comprovando sua capacidade em crescer e degradar os substratos.

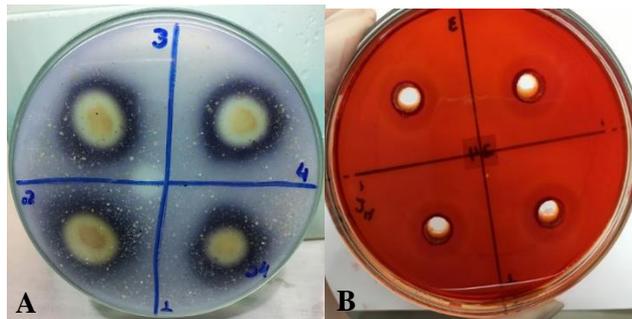


Figura I: Formação de halos de hidrólise em meio ágar contendo uma única fonte de carbono. (A) amilase; (B) celulase.

Foi comprovada com ensaios enzimáticos em placas que todas as bactérias utilizadas na seleção cresceram no meio contendo uma fonte de carbono (CMC e farelo de milho). É interessante notar que a atividade enzimática só foi comprovada na bactéria UNIFENAS 100-24 apresentando um halo de hidrólise visível em ambos os substratos, resultados semelhantes foram encontrados na literatura (SANTOS et al., 2010 e ROCHA, 2010).

Cabe ressaltar o aumento da produção agrícola em sistemas orgânicos, e uma necessidade de aplicação de subprodutos agroindustriais como fonte orgânica de nutrientes, por meio do processo de compostagem. Com isso, a utilização futura de bactérias com capacidade em degradar resíduos vegetal no desenvolvimento de processos que pretendem impulsionar, otimizar ou acelerar a bioconversão de materiais lignocelulolíticos para aplicação no campo e em nível industrial (SANTOS et al., 2010). De acordo com Boisset et al. (2001), a combinação de diferentes tipos de enzimas que atuam em associação provou ser um método efetivo para aprimorar a digestão de resíduos celulósicos.

CONCLUSÕES

Conclui-se, portanto, que das oito estirpes testadas somente a estirpe UNIFENAS 100-24, revelou-se produtora da enzima amilase e celulase.

A AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq, pelo suporte financeiro ao trabalho.

R REFERÊNCIAS

- BOISSET, C; PETREQUIN, C; CHANZY, H; HENRISSAT, B; SCHULEIN, M. Optimized mixtures of recombinant *Humicola insolens* cellulases for biodegradation of crystalline cellulose. **Biotechnology Bioengineering**, France v. 72, n.3 p.339–45. 2001.
- CAMARGO, A. J. et al. **REVISTA PROCESSOS QUÍMICOS: Aplicações Industriais da Biotecnologia Enzimática**. Goiânia: Assessoria de Comunicação e Marketing do Sistema Fieg, v. 3, n. 5, 2009. Semestral. Faculdade de Tecnologia Senai Roberto Mange.
- EDC – Enzyme Development Company. **Enzymes Applications in Animal Feed**.
- GUPTA, R. ; MOHAPATRA, H. ; GOSWAMI, V. K. ; CHAUHAN, B. **Microbial α -Amylases: a Biotechnological Perspective**. Process Biochemistry. Jan. 2003. p. 1-18.
- LUZ, B. D. S; BICAS, J. L.; SARROUH, B.; LOFRANO, R. C. Z. **Bioprospecção de microrganismos produtores de enzimas de interesse industrial realizada no Parque Estadual Serra do Ouro Branco, Brasil**. v.10, n.1, p.13-24, Jan-Jun, 2016. Revista Multidisciplinar da Faculdade de Ciências Biológicas e da Saúde da Unigran. Dourados.
- PANDEY, A.; WEBB, C.; SOCCOL, C. R.; LARROCHE, C. **Enzyme Technology**. 1º ed. New Delhi: Asiatech Publishers, Inc, p. 760, 2005.
- RABALHO, A. A. **Isolamento de linhagens microbianas termofílicas amilolíticas, produção, caracterização e aplicação das amilases na hidrólise do amido de mandioca**. 2002. 161 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, 2002.
- ROCHA, T.B. **Isolamento, identificação e caracterização enzimática de uma bactéria de fonte termal do Cerrado**. 2010. 124 f. Dissertação (mestrado) – Universidade de Brasília, Instituto de Ciências biológicas, Brasília, DF, 2010.
- SANTOS, F. H. R.; SILVA, B. M.; VICENTE, M. S.; REIS, V. M.; SOARES, L. H. B. Isolamento de bactérias com habilidade hidrolítica da biomassa em sistemas de compostagem. Seropédica: **Embrapa Agrobiologia**, 2010. 19 p. (Embrapa Agrobiologia. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 70).
- SPIER, M. R.; WOICIECHOWSKI, A. L.; SOCCOL, C. R. **Produção de α -Amilase por *Aspergillus* em Fermentação no Estado Sólido de Amido de Mandioca e Bagaço de Cana-de-Açúcar**. VI SEMINÁRIO BRASILEIRO DE TECNOLOGIA ENZIMÁTICA. Anais Enzitec 2004. Rio de Janeiro: Enzitec, 2004. v. 1. p. 116-116.
- ZHANG, Y. H. P.; HIMMEL, M. E.; MIELENZ, J. R. **Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies**. Biotechnology Advances v.24, p.452-481, 2006.
- ZIMMER, K.R.; BORRÉ, G.L.; TRENTIN, D.S.; JÚNIOR, C.W.; FRASSON, A.P.; GRAEFF, A.A.; et al. Enzimas microbianas de uso terapêutico e diagnóstico clínico. **Revista Liberato**, v.10, n.14, p. 123-137, jul/dez. 2009.