

Faculdade Ciências da Vida – FCV

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE ACTINOBACTÉRIAS OBTIDAS DE SOLO DO CERRADO

Ariane dos Santos da Silva*
João Carlos Maia Dornelas de Oliveira **

RESUMO

Enzimas são catalisadores biológicos que participam em várias reações bioquímicas. Enzimas produzidas através de microrganismos despertam o interesse da agroindústria por serem aplicadas em vários processos industriais. As *actinobactérias* representam um grupo diversificado de bactérias amplamente conhecidas por sua eficiência em produzir inúmeras biomoléculas como as enzimas hidrolíticas. Tendo em vista o crescente interesse sobre a interação entre os microrganismos presente no solo, aliado aos seus aspectos biotecnológicos, esse trabalho tem por objetivo isolar, caracterizar e avaliar *actinobactérias* obtidas do solo do cerrado quanto a fabricação das enzimas hidrolíticas celulase, amilase e lipase. O processamento das amostras do solo foram realizados e posteriormente plaqueados em meio firme para caracterizar morfológicamente as *actinobactérias* isoladas. Logo após essas linhagens foram introduzidas em meios com diferentes fontes de C (carbono), em formato de *spots*, para classificação da atividade enzimática. A atividade das enzimas foram avaliadas semiquantitativamente por meio do índice enzimático (IE). Os resultados demonstram alterações morfológica dentre os 21 isolados de *actinobactérias* obtidas. O índice enzimático variou de 0 a 3,17 mostrando alta capacidade biotecnológica de algumas cepas. Os isolados A12 e A17 apresentam altos valores para amilase, já os isolados A12 apresenta pra celulase e A4 para lipase. Conforme os resultados encontrados através deste estudo verifica-se alteração genética e bioquímica demonstrando a capacidade biotecnológica destes micro-organismos na síntese de enzimas requeridas pela agroindústria.

Palavras-chave: Actinomicetos. Enzimas. Biotecnologia. Agroindústria.

ABSTRACT

Enzymes are biological catalysts that participate in various biochemical reactions. Enzymes produced through microorganisms arouse the interest of agro-industry because they are applied in various industrial processes. Actinobacteria represent a diverse group of bacteria widely known for their efficiency in producing numerous biomolecules such as hydrolytic enzymes. In view of the growing interest in the interaction between the microorganisms present in the soil, together with their biotechnological aspects, this work aims to isolate, characterize and evaluate actinobacteria obtained from the cerrado soil in the manufacture of the hydrolytic enzymes cellulase, amylase and lipase. The processing of soil samples was performed and subsequently plastered in a firm environment to morphologically characterize the isolated actinobacteria. Immediately after these lines were introduced in media with different sources of C (carbon), in the form of spots, for classification of enzymatic activity. Enzyme activity was semi-quantitatively evaluated using the enzyme index (IE). The results showed morphological alterations among the 21 actinobacterial isolates obtained. The enzymatic index ranged from 0 to 3.17 showing high biotechnological capacity of some strains. The A12 and A17 isolates have high amylase values, while the A12 isolates present for cellulase and A4 for lipase. According to the results found in this study, genetic and biochemical alterations are verified, demonstrating the biotechnological capacity of these microorganisms in the synthesis of enzymes required by the agroindustry.

Keywords: Actinomyces. Enzymes. Biotechnology. Agroindustry.

1 INTRODUÇÃO

As enzimas estão presentes em células vivas, onde exercem a função de catalisadores de reações do metabolismo celular (KIRK *et al.*, 2002) e podem ser obtidas de diferentes fontes naturais; no entanto, enzimas produzidas por microrganismos vem despertando o

1-Graduanda em Biotecnologia na Faculdade Ciências da Vida

2- Mestre em Ciências (UFSJ) e Docente na Faculdade Ciências da Vida

interesse agroindustrial devido à possibilidade de produção por processos fermentativos em larga escala (DORNELAS *et al.*, 2017).

Amilases, celulases e lipases se destacam dentre as principais enzimas de importância agroindustrial, pois possuem aplicações em variados processos, indústrias de alimentos, têxtil, biocombustível, cosméticos, bebidas, papel, farmacêutica, dentre outras (KIRK *et al.*, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2006; DORNELAS *et al.*, 2017).

O interesse por microrganismos existentes no solo para a investigação da capacidade biotecnológica destes com relação à formação de enzimas é amplamente realizado por diversas equipes de pesquisa, para a separação e obtenção de linhagens ainda desconhecidas e comercialização de suas enzimas (TYC *et al.*, 2016).

As *actinobactérias* desempenham importante papel devido à alta eficiência em produzir inúmeras substâncias bioativas, dentre as quais, as enzimas se destacam devido à sua ampla aplicabilidade biotecnológica e industrial (BALLAV *et al.*, 2015). Consequentemente o estudo de bactérias produtoras de enzimas é um trabalho essencial para a busca de fabricantes de biomoléculas de interesse agroindustrial (LUZ, *et al.*, 2016). Deste modo, o presente trabalho se justifica, pela necessidade de se obter estirpes com grande capacidade em desenvolver enzimas economicamente viáveis, devido à crescente demanda requerida pelo mercado mundial.

Neste sentido, o presente trabalho apresenta a seguinte problemática: *Actinobactérias* provenientes de solos do cerrado são eficientes em sintetizar enzimas hidrolíticas de interesse agroindustrial? Desta forma, levantou-se a hipótese de que a diversidade genética de *actinobactérias* existentes no solo do cerrado permite selecionar linhagens promissoras quanto a produção das enzimas requeridas pela agroindústria.

O estudo teve como objetivos isolar, caracterizar e avaliar o potencial de *actinobactérias* de amostras dos solos do cerrado em produzir enzimas hidrolíticas celulase, amilase e lipase. Para responder os objetivos, a metodologia escolhida possui natureza descritiva, com caráter qualitativo e semiquantitativo, e corte transversal.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 ENZIMAS

Enzimas são catalisadores biológicos de natureza proteica que participam de várias reações bioquímicas, tendo como papel fundamental o controle metabólico. Catalisador é uma

substância que acelera a velocidade de uma reação química. Estas moléculas aceleram reações termodinamicamente viáveis, sendo extremamente versáteis, estereoespecíficas e de elevada importância nos processos biotecnológicos (KIRK *et al.*, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2006; DORNELAS *et al.*, 2017).

De acordo com Pandey *et al.*, (1999), enzimas compõem um dos grupos essenciais referente a síntese de produtos biológicos de utilização humana. Entretanto, enzimas produzidas por microrganismos apresentam inúmeras vantagens pelo fato de ser um produto natural com estabilidade térmica e química (RODRIGUES *et al.*, 2015). Entre os microrganismos, *actinobactérias* se sobressaem por produzirem diversas biomoléculas, onde as enzimas se destacam (KIRK *et al.*, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2006; DORNELAS *et al.*, 2017).

A importância das enzimas nos processos industriais é bastante difundida, porém a aplicação na agroindústria vem ganhando grande destaque. Dentre as enzimas de utilização agroindustrial se destacam as amilases, celulasas e lipases, as quais possuem aplicações em vários processos industriais, nas indústrias de alimentos, têxtil, biocombustível, cosméticos, bebidas, papel, farmacêutica, dentre outras (KIRK *et al.*, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2006; DORNELAS *et al.*, 2017).

2.2 ENZIMAS DE INTERESSE AGROINDUSTRIAL

2.2.1 Amilase

As amilases são enzimas responsáveis pela degradação das moléculas de amido. O amido é encontrado principalmente em sementes de cereais como milho, trigo, cevada, arroz e também em tubérculos como batata e mandioca (LAJOLO; MENEZES *et al.*, 2006). Amilases são amplamente aplicadas em vários desenvolvimentos biotecnológicos e também produzidas pelos microrganismos, sendo utilizadas em diversos setores industriais, na preparação de amido, produção de etanol, xaropes de glicose e de frutose, indústria têxtil, produção de cerveja e indústrias de papel (POLIZELI; SILVA *et al.*, 2016).

Podem de ser obtidas de animais e vegetais; porém amilases microbianas são amplamente requeridas devido a grande produção e facilidade de manipulação dos microrganismos para obter moléculas bioativas com as características necessárias (TANYILDIZI; OZER *et al.*, 2005; ALBUQUERQUE *et al.*, 2010).

2.2.2 Celulase

Celulases são enzimas responsáveis pela decomposição da celulose, principal composto presente nas células vegetais. As celulases compreendem um complexo enzimático composto por diversas enzimas, que atuam sinergicamente na hidrólise da fibra celulósica, um homopolissacarídeo constituído por unidades de glicose unidas por ligações do tipo β -1,4 e cuja unidade de repetição é o dissacarídeo celobiose (MOHANTA *et al.*, 2014).

Conforme Bhat & Bhat (1997), a decomposição da celulose utilizando as enzimas microbianas se destaca devido a sua aplicação biotecnológica e seu baixo custo. Dentre os diferentes usos nas indústrias, as celulases são utilizadas na fabricação de sucos de fruta, vinho e café, processamento das fibras de algodão, descoloração e modificação das fibras vegetais, dentre outras aplicações (SILVA; MARTINS *et al.*, 2015).

2.2.3 Lipase

As lipases pertencem ao grupo das hidrolases que aceleram a conversão de triacilgliceróis a ácidos graxos livres e glicerol (LARGE *et al.*, 1999). Conforme Cortez *et al.*, (2017), é uma enzima amplamente encontrada na natureza e apresenta alto potencial biotecnológico como biocatalisador em reações de síntese orgânica.

A obtenção de lipases tem sido realizada por processo fermentativo submerso, entretanto, o processo em meio firme também tem se mostrado promissor, quando são utilizados substratos de baixo custo como nutrientes (CORTEZ *et al.*, 2017). Por possuírem características enzimáticas diversas, as lipases microbianas podem ser aplicadas industrialmente em diversos segmentos (HASAN *et al.*, 2006).

Conforme Cortez *et al.*, (2017), as fontes essenciais para obtenção de lipases na utilização industrial têm sido os microrganismos. “Devido à sua ampla utilização pode ser empregado na preparação de alimentos, síntese de produtos químicos e fármacos, processamento de óleos e produção de cosméticos” (BORNSCHEUER *et al.*, 2002).

2.3 ACTINOBACTÉRIAS

Actinobactérias são gram-positivas, aeróbicas, filamentosas, com alto teor de guanina/citosina em seu genoma (TORTORA *et al.*, 2012). Possuem também alta

variabilidade morfológica, crescimento lento e assemelham-se morfológicamente aos fungos filamentosos (AGHAMIRIAN; GHIASIAN *et al.*, 2009; TORTORA *et al.*, 2012).

Este microrganismo é capaz de se modificar conforme o ambiente; no entanto, vivem preferencialmente no solo (FILHO *et al.*, 2009). *Actinobactérias* também se sobressaem pela eficiência em sintetizar inúmeras enzimas de interesse agroindustrial (FLORES *et al.*, 1997; PEREIRA *et al.*, 2000). Dornelas *et al.*, (2017) reporta em sua pesquisa que *actinobactérias* do gênero *Streptomyces* apresentam resultados satisfatórios na produção de enzimas de utilização agroindustrial.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo se trata de uma pesquisa experimental que buscou isolar e caracterizar *actinobactérias* de amostras do solo do cerrado e avaliar a capacidade destes isolados em produzir enzimas hidrolíticas amilase, celulase e lipase. Adotou os métodos de pesquisa descritivos, qualitativos e semiquantitativos, com caráter transversal. Esses experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Microbiologia da Faculdade Ciências da Vida, no município de Sete Lagoas, MG.

3.1 ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE ACTINOBACTÉRIAS

Um total de 5 gramas de amostras do solo do cerrado foi peneirado, acrescidos de 45 ml de solução salina 0,85% e homogeneizados por 30 minutos. Após homogeneização, uma alíquota de 1 mL foi pipetada e procedeu-se às diluições seriadas decimais (10⁻³ a 10⁻⁵) para isolamento das *actinobactérias*. O volume de 100 µL de cada diluição seriada foi plaqueados em meio de cultura Ágar Glicerol-Asparagina – AGA [1 gramas/litro de L-asparagina, 10 gramas/litro de glicerol, 1 gramas/litro de KH₂PO₄, 15 gramas/litro de ágar e 1 ml/litro de solução de micronutrientes (0,1 g de FeSO₄.7H₂O, 0,1 g de MnCl₂.4H₂O, 0,1 g de ZnSO₄.7H₂O, de qsp 100 mL de água deionizada)] suplementado com 0,03 g/L de antibiótico ciclohexamida, seguido de incubação à temperatura de 28°C por um período de 14 dias (SHIRLING; GOTTLIEB *et al.*, 1966; DORNELAS *et al.*, 2017). Todo o procedimento realizou-se em triplicata.

3.2 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE ACTINOBACTÉRIAS

3.2.1 Macromorfologia

Para análise macromorfológica, os isolados foram submetidos ao exame macroscópico conforme o estudo realizado por Shirling; Gottlieb *et al.*, (1966) e Dornelas *et al.*, (2017). Os isolados foram cultivados em meio AGA a 28°C durante 14 dias, em placas de Petri convencionais, e posteriormente, as seguintes características culturais, tais como coloração do micélio vegetativo e micélio aéreo foram avaliados com todos os isolados identificados como *actinobactérias* (HUNGRIA; SILVA *et al.*, 2011).

3.2.2 Micromorfologia

Para a análise micromorfológica utilizou-se a técnica de microcultivo, conforme Holt *et al.*, (1989) e Dornelas *et al.*, (2017), para cada um dos isolados analisados na visualização macromorfológica. O aparato para a realização do microcultivo foi montado em placas de Petri, dentro da qual foi colocado uma lâmina de microscópio e um chumaço de algodão. Cada conjunto foi embalado em papel craft e esterilizado por 30 min à 121 °C, em autoclave. Um cubo de aproximadamente 1 cm³ de meio AGA foi cortado e colocado sobre o centro da lâmina contida no interior da placa de Petri. O isolado foi inoculado com o auxílio de alça de platina, em todos os lados do cubo, posteriormente coberto por uma lamínula esterilizada. O algodão no interior da placa foi umedecido com água destilada estéril e a placa incubada por 14 dias a 28°C. Após o período de incubação, a lamínula foi retirada e depositada sobre outra lâmina microscópica estéril contendo uma gota de lactofenol de Amann (ácido láctico, fenol cristalizado, glicerol e água – 1:1:1:1), sendo as bordas da lamínula vedadas com esmalte incolor, após a secagem da solução. Após o preparo das lâminas, procedeu-se a observação da presença de cadeia de esporos e sua morfologia ao microscópio óptico (Leica DFC 490) em aumento de 100X e fotografados.

3.3 CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA DE ACTINOBACTÉRIAS

3.3.1 Produção de amilase

O teste de produção da amilase foi realizada segundo Coon *et al.*, (1957) e Dornelas *et al.*, (2017) com alteração da quantidade de amido para 6,6 gramas/litros. Os isolados foram

inoculados em forma de *spots* e em triplicata no meio de cultura ágar amido (6,6 gramas/litros de amido solúvel, 0,5 gramas/litros de NaCl, 3 gramas/litros de extrato de carne, 1 gramas/litro de peptona caseína, 15 gramas/litro de ágar; pH 7,0). As culturas foram incubadas a 28 °C por 96 horas, após a incubação foram adicionados 10 mL de solução diluída de lugol (5 gramas/litro de iodo, 10 gramas/litro de iodeto de potássio) em cada placa. A produção da amilase foi observada pela descoloração do meio, com formação de zona amarela clara em volta da colônia, em contraste com a coloração azul resultante da reação do amido com o iodo.

3.3.2 Produção de celulase

A produção de celulase foi avaliada segundo Lewis *et al.*, (1988) e Dornelas *et al.*, 2017, utilizando meio de cultura suplementado com carboximetilcelulose (CMC) como única fonte de carbono (3 gramas/litro de NaNO₃, 1 gramas/litro de K₂HPO₄, 0,5 gramas/litro de MgSO₄, 0,5 gramas/litro de KCl, 10 mg/l de FeSO₄.7H₂O, 10 gramas/litro de CMC, 15 gramas/litro de ágar e pH=7,0). As linhagens foram inoculadas sob a forma de spots, em triplicata, e incubadas a 28°C por 96 horas. Após a incubação, foram adicionados 10 mL de solução de vermelho congo a 0,5% em cada placa, deixando-se agir por 15 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, o excesso da solução foi removido e adicionou-se 10 mL de solução de NaCl (1 M) adicionado em cada placa, deixando-se agir por 30 minutos. A produção da celulase foi detectada pela descoloração do meio, formando uma zona alaranjada em volta da colônia, em contraste com o meio vermelho resultante da reação da celulose com o vermelho congo.

3.3.3 Produção de lipase

O teste para produção de lipase foi feito conforme Savitha *et al.*, (2007) e Dornelas *et al.*,(2017) utilizando-se meio de cultura composto por 5 gramas/litro peptona, 1 gramas/litro de extrato de levedura, 4 gramas/litro de NaCl, 15 gramas/litro de ágar, 31,25 ml/L de óleo de oliva, 0,01 gramas/litro de rodamina B; pH 7,0. As cepas foram inoculadas sob o formato de *spots*, em triplicata e incubados a 28 °C por 72 horas. Após o período de incubação, as placas foram expostas à radiação ultravioleta para observar a presença de halos de coloração azul em

volta das colônias, que é o critério utilizado para indicar a presença da lipase difundida no meio (COLEN *et al.*, 2006).

3.3.4 Índice enzimático

As atividades hidrolíticas das enzimas amilase, celulase e lipase produzidas pelos 21 isolados, foram mensuradas por meio do índice enzimático (IE), conforme a equação: $IE = DH/DC$, sendo DH o diâmetro em mm do halo de hidrólise e DC o diâmetro em mm da colônia das *actinobactérias* (STAMFORD *et al.*, 1998; SILVA *et al.*, 2015; RODRIGUES *et al.*, 2006; DORNELAS *et al.*, 2017). Os diâmetros das colônias e halos de hidrólise foram medidos com paquímetro (mm) posicionado no reverso das placas de Petri (LEALEM; GASHE *et al.*, 1994).

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os ensaios da atividade enzimática das *actinobactérias* foram dispostos conforme o delineamento inteiramente casualizado (DIC) com três repetições por amostra. Os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade, utilizando o software SISVAR® 5.3 (FERREIRA *et al.*, 2010).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização morfológica de actinobactérias

Após minuciosa análise macroscópica, foram selecionadas 21 linhagens caracterizadas como *actinobactérias*. Uma das características observadas foi o micélio produzido para diferenciar este grupo de microrganismos das demais bactérias. A organização filamentosa e ramificada das *actinobactérias* também foi utilizada por Dornelas *et al.*, (2017) como método de seleção de possíveis bactérias pertencentes ao filo *Actinobactéria*.

Esse grupo de microrganismos apresentam alta diversidade morfológica, onde pôde ser observado o variado padrão de coloração do micélio vegetativo e aéreo das 21 colônias selecionadas (Tabela 1), o que está de acordo com os dados apresentados por Dornelas *et al.*, (2017) no trabalho com *actinobactérias* isoladas de solo do cerrado.

A identificação micromorfológica das estirpes selecionadas foi determinada após observação microscópica das lâminas preparadas com lactofenol e revelou variada diferenciação na estrutura morfológica das cadeias de esporos dos diferentes isolados, sendo 19,05% reta, 9,52% *retinaculum-apertum*, 23,81% espiral e 47,62% flexível. Os resultados observados na micromorfologia sugerem que os isolados sejam pertencentes ao gênero *Streptomyces*. A caracterização microscópica do gênero *Streptomyces* pode ser desenvolvida através da microscopia do micélio aéreo, onde forma cadeia de esporos que podem ser retos, flexuosos, em forma de espirais com uma ou duas voltas ou longos espirais (WILLIAMS *et al.*, 1989).

Tabela 1. Características morfológicas dos isolados de actinobactérias obtidas de solo do cerrado.

Isolado	Características macromorfológicas		Características micromorfológicas
	Micélio aéreo	Micélio vegetativo	Cadeia de esporos
A1	Cinza	Marrom escuro	Flexível
A2	Cinza	Marrom escuro	Reta
A3	Branco	Marrom claro	Espiral
A4	Bege	Creme	Espiral
A5	Marrom escuro	Marrom escuro	Flexível
A6	Branco	Bege	Flexível
A7	Marrom claro	Marrom	Flexível
A8	Cinza	Marrom claro	<i>Retinaculum-apertum</i>
A9	Amarelo	Bege	<i>Retinaculum-apertum</i>
A10	Creme	Creme	Espiral
A11	Cinza	Marrom escuro	Reta
A12	Marrom claro	Marrom claro	Espiral
A13	Creme	Creme	Reta
A14	Cinza	Marrom	Espiral
A15	Branco	Marrom claro	Flexível
A16	Marrom claro	Marrom	Flexível
A17	Cinza	Marrom claro	Flexível
A19	Amarelo	Amarelo	Reta
A20	Marrom	Marrom escuro	Flexível
A21	Marrom claro	Marrom claro	Flexível

4.2 Caracterização enzimática de actinobactérias

Os dados da atividade enzimática da amilase, celulase e lipase estão descritos na Tabela 2. Comprovou que 90,48% 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 $\leq 2,0$. Amilase, celulase e lipase foram observadas em 76,19, 61,91 e 52,38% dos isolados respectivamente. As estirpes A16 e A18, não apresentaram atividade enzimática para qualquer uma das enzimas avaliadas.

Tabela 2. Índice enzimático (IE) de amilase, celulase e lipase de isolados de actinobactérias obtidas de solo do cerrado.

Isolado	Índice enzimático		
	Amilase	Celulase	Lipase
A12	3,14 a	3,17 a	1,03 h
A17	3,08 a	0,00	0,00
A7	3,00 b	2,33e	0,00
A21	2,60 c	2,86 c	2,02 c
A19	2,42 d	0,00	2,13 b
A5	2,39 d	2,07 g	1,00 h
A14	2,29 e	1,58 i	1,07 g
A15	2,22 f	2,13f	0,00
A20	2,21 f	1,92 h	2,12 b
A11	1,93 g	2,33 e	0,00
A6	1,83 h	2,47 d	0,00
A4	1,62 i	3,06 b	2,27 a
A3	1,37 j	0,00	0,00
A9	1,20 l	1,36 j	2,03 c
A10	1,18 l	2,90 c	1,72 d
A2	1,04 m	0,00	0,00
A1	0,00	0,00	1,63 e
A8	0,00	0,00	1,58 f
A13	0,00	2,17 f	0,00
A16	0,00	0,00	0,00
A18	0,00	0,00	0,00

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

4.2.1. Detecção da atividade amiolítica

A atividade enzimática da amilase é detectada através do aparecimento de um halo amarelo em volta da colônia (COON *et al.*, 1957). A formação do halo de degradação do amido foi observado em volta da colônia de 16 (76,19%) cepas enquanto que o mesmo não ocorreu com 5 (23,81%) isolados, revelando que os mesmos não apresentam nenhuma atividade amiolítica, conforme dados observados na Tabela 2. O IE variou significativamente ($p \leq 0,05$) entre as *actinobactérias* capazes de degradar o amido solúvel presente no meio de cultura. Entre eles, 7 (43,75%) isolados apresentaram $IE < 2$, indicando baixa atividade, enquanto 9 (56,25%) apresentaram $IE \geq 2,0$, classificados como potenciais produtores de amilases (LEALEM; GASHE *et al.*, 1994).

Os isolados A12 e A17 apresentaram, em média, os maiores índices enzimáticos demonstrando elevado potencial amilolítico, com valores de $IE > 3,0$. Karanja *et al.*, (2010) observaram um índice enzimático em torno de 3,4 em espécies de *Streptomyces* isoladas de solos no para atividade amiolítica. Vigal *et al.*, (1991), relatam a eficiência de *Streptomyces sp.* na produção de amilase, o que demonstra o potencial para uso em escala industrial dos dois isolados obtidos no presente estudo.

4.2.2 Detecção da atividade celulótica

Entre os isolados de *actinobactérias* avaliados (Tabela 2), apenas 13 (61,90%) apresentaram resultado positivo para produção de celulase. O IE variou significativamente ($p \leq 0,05$) entre as linhagens capazes de degradar a celulose presente no meio de cultura. Dentre os 21 isolados, 3 (23,08%) apresentaram $IE < 2$, indicando baixa atividade celulótica, enquanto 10 (76,92%) apresentaram $IE \geq 2,0$, classificados como potenciais produtores de celulases (LEALEM; GASHE *et al.*, 1994).

O isolado A12 pode observar um alto IE ($IE = 3,17$) certificando o alto potencial deste micro-organismo para produzir essa enzima de interesse. Em estudo com *actinobactéria* produtoras de enzimas de interesse para agroindústrias, Dornelas *et al.*, (2017) também verificou que várias espécies de *actinomicetos* obtidos de solo do cerrado também observaram valores de índice enzimático acima de 2, o que demonstra o potencial deste grupo de micro-organismo em produzir enzimas hidrolíticas para serem aplicadas em vários segmentos da indústria.

4.2.3. Detecção da atividade lipolítica

A produção lipolítica pode ser observada em 11 (52,38%) dos isolados dentre os 21 selecionados como *actinobactérias* neste estudo (Tabela 2). O IE variou significativamente ($p \leq 0,05$) entre as linhagens capazes de degradar o azeite de oliva presente no meio de cultura e variou de 1,00 à 2,27. Dentre as estirpes produtoras de lipase, 6 (54,55%) apresentaram $IE < 2$ sendo indicado como baixa atividade lipolítica e 5 (45,45%) revelaram $IE > 2$, sendo estes caracterizados como bons produtores de lipases.

O isolado A4 apresentou o maior IE ($IE = 2,27$) demonstrando o potencial deste micro-organismo para a produção de lipase. O índice enzimático observado neste trabalho encontra-se próximo ao apresentado por Dornelas *et al.*, (2017) que detectou um IE de 2,60 produzido

por *Streptomyces hygroscopicus* isolado de solo do cerrado. De acordo com Hasan *et al.*, (2006), as lipases produzidas por micro-organismo possuem características enzimáticas diversificadas tornando-as atrativas para uso industrial.

5 CONCLUSÃO

O presente trabalho contribui para prospecção de microrganismos com o potencial de interesse agroindustrial, e teve como limitação não ter sido realizado todos os testes necessários para apresentar a atividade enzimática das *actinobactérias*.

As *actinobactérias* são consideradas uma ótima alternativa para a utilização biotecnológica, já que a demanda por processos mais econômicos e viáveis vem ganhando espaço nos processos indústrias com o uso de enzimas hidrolíticas de origem microbiana.

Entre as *actinobactérias* isoladas de solo do cerrado existe alta variabilidade genética em relação às características morfológica e produção de enzimas hidrolíticas, onde pode ser observado que os isolados A12 e A17 apresentam maior produção de amilase, A12 de celulase e A4 de lipase, demonstrando o potencial biotecnológico destes micro-organismos na síntese de enzimas requeridas pela agroindústria.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

AGHAMIRIAN, M. R; GHASIAN, S. A. isolation and characterization of medically important aerobic actinomycetes in soil of Iran (2006 - 2007). **The Open Microbiology Journal**. v. 3, p. 53-57, 2009.

ALBUQUERQUE, U. S.; SALES, A. E.; TAKAKI, G. M. C.; MESSIAS, A. S.; SILVA, C. A. A. Detecção de amilase e uréase em bactérias mesofílicas isoladas de lodo de esgoto da Estação de Tratamento Mangueira, Recife – Pernambuco. **Exacta**. V. 8, n. 3, p. 289-298, 2010.

BALLAV, S.; KERKAR, S.; THOMAS, S.; AUGUSTINE, N. Halophilic and halotolerant actinomycetes from a marine saltern of Goa, India producing anti-bacterial metabolites. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 119, n.3, p. 323-330, 2015.

BHAT, M. K.; BHAT, S. Cellulose Degrading Enzymes and their Potential Industrial Applications. **Biotechnol Advances**. v. 15, ns. ¾, p. 583–620, 1997.

BORNSCHEUER, U. T. Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application. **FEMS Microbiology Reviews**. v.26, n.1, p.73-81, 2002.

COLEN, G. Isolamento e seleção de fungos filamentosos produtores de lipases. 2006. 206 f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.

COON, H. J.; JENNISON, M. W.; WEEK, O. B. Routine tests for the identification of bacteria, in: **Manual of Microbiological Methods** (ed. Society of American Bacteriologists). McGraw-Hal, New York, p. 239-262, 1957.

CORTEZ, D. V.; de Castro, H. F.; Andrade, G. S. S.; **Quim. Nova**, 2017.

DORNELAS, J. C. M.; FIGUEIREDO, J. E. F.; DE ABREU, C. S.; LANA, U. G. P.; OLIVEIRA, C. A.; MARRIEL, I. E. Characterization and phylogenetic affiliation of Actinobacteria from tropical soils with potential uses for agro-industrial processes. **Genetics and Molecular Research**. v. 16, n. 3, p.1-16, 2017.

DORNELAS, J. C. M. **Potencial biotecnológico de actinomicetos para produção de enzimas hidrolíticas e biocontrole in vitro de *pantoea ananatis*, agente causal da mancha-branca do milho**. Dissertação (Mestrado em Ciências) Universidade Federal de São João Del-Rei – UFSJ. 2017.

FERREIRA, D.F. SISVAR - **Sistema de análise de variância**. Versão 5.3. DEX.Lavras-MG: UFLA, 2010.

FILHO, R. C.; ROMEIRO, R. S.; AMARAL, L. S.; GARCIA, F. A. O. Potencialidade de um actinomiceto de rizosfera de tomateiro como agente de biocontrole de doenças. **Horticultura Brasileira**. v. 27, n.3, p. 340-344, 2009.

FLORES, M. E.; PÉREZ, R.; HUITRÓN, C. β -Xylosidase and xylanase characterization and production by *Streptomyces* sp. CH-M-1035. **Letters in Applied Microbiology**. v. 24, p. 410-416, 1997.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMMED, A. Industrial application of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 39, n. 2, p. 235-251, 2006.

HOLT, J.G.; WILLIAMS, S.T.; SHARPE, M.E. Bergey's manual of systematic bacteriology. Baltimore: **Williams & Wilkins**. v.4, p.2300- 2648, 1989.

HUNGRIA, M.; SILVA, K. (Ed.). Manual de curadores de germoplasma – micro-organismos: Rizóbios e bactérias promotoras do crescimento vegetal. **Brasília: Embrapa-Recursos Genéticos e Biotecnologia**. (Embrapa-CNPAF. Documentos, 333). p. 20, 2011.

KARANJA, E. N.; BOGA, H.I.; MUIGAI, A.W.; WAMUNYOKOLI, F.; KINYUA, J.; NONOH, J.O. Optimization of growth conditions and characterization of enzymatic activity of selected novel *Streptomyces* species from Kenyan soils. **Scientific Conference Proceedings**. p. 17-30, 2010.

KIRK, O.; BORCHERT, T. V.; FUGLSANG, C. C. Industrial enzyme applications. **Current Opinion in Biotechnology**. v. 13, p. 345-351, 2002.

LAJOLO, F. M.; MENEZES, E. W. Carbohidratos en alimentos regionales Iberoamericanos. **São Paulo: Universidade de São Paulo**, 648p, 2006.

LARGE, K. P.; MIRJALILI, K.; OSBORNE, M.; PEACOCK, L. M.; ZORMPAIDIS, V.; WALSH, M.; CAVANAGH, M. E.; LEADLAY, P. F.; ISON, A. P. Lipase activity in Streptomycetes. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 25, p. 569-575, 1999.

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

LEWIS, K. J. Biological control mechanism of the mycoparasitae *Phytum oligandum* Dreschler. PhD Thesis. **University of Sheffield, Sheffield. Lima, L.H.C., 1988.**

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. **Interbio**. v. 10, n. 1, p. 13-24, 2016.

MOHANTA, Y. K. Isolation of cellulose-degrading actinomycetes and evaluation of their cellulolytic potential. **Bioengineering and Bioscience**. v. 2, p. 1-5, 2014.

OLIVEIRA, A. N.; OLIVEIRA, L. A.; ANDRADE, J. S.; CHAGAS JÚNIOR, A. F. Enzimas hidrolíticas extracelulares de isolados de rizóbia nativos da Amazônia Central, Amazonas, Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 26, n. 4, p. 853-860, 2006.

PANDEY, A.; SELVAKUMAR, P.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P. Solid-state fermentation for the production of industrial enzymes. **Current Science**. V. 77, n. 1, p. 149-162, 1999.

PEREIRA, J. C. Interações entre as populações de actinomicetos e outros organismos na rizosfera. **Documentos 118, Seropédica - Rio de Janeiro. Dez. 2000.**

POLIZELI, M. L. T.M.; SILVA, T. M. (orgs). Amilases Microbianas. **São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2016.**

RODRIGUES, K. **Identificação, produção de antimicrobianos e complexos enzimáticos de isolados de actinomicetos**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Meio Ambiente) – Porto Alegre – RS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, 129p. 2006.

RODRIGUES, R. L. e Oliveira e S. D. Junior – **XI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica** – UNICAMP - Campinas SP et al. 2015.

SAVITHA, J.; SRIVIDYA, S.; JAGAT, R.; PAYAL, P.; PRIYANKI, S.; RASHMI, G. W. Identification of potential fungal strains for the production of inducible, extracellular and alkalophilic lipase. **Afr J Biotechnol**. v. 6, p. 564-568, 2007.

SILVA, V. M.; MARTINS, C. M.; MARTINS, S. C. S. Atividade celulolítica de actinobactérias de região semiárida do Ceará. **Enciclopédia Biosfera**, v. 11, p. 2026-2036, 2015.

SHIRLING, E. B.; GOTTLIEB, D. Methods for characterization of *Streptomyces* species. **International journal of systematic bacteriology**. v.16, p.313-340, 1966.

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.

TANYILDIZI, M. S.; OZER, D.; ELIBOL, M. Optimization of α -amylase production by *Bacillus* sp. using response surface methodology. **Process Biochemistry**. v. 40, p. 2291- 2296, 2005.

TYC, O. SONG, C; DICKSCHAT, J.S.; VOS, M.; GARBEVA, P. The ecological role of volatile and soluble secondary metabolites produced by soil bacteria. **Trends in Microbiology**, v.25, n.4, p. 280-292, 2016.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Microbiologia. 10.ed. **Porto Alegre: Artemed**, p. 934, 2012.

VIGAL, T.; GIL, J.A.; DAZA, A.; GARCÍA-GONZÁLEZ, M. D.; MARTÍN, J. F. Cloning, characterization and expression of an α -amylase gene from *Streptomyces griseus* IMRU3570. **Molecular & General Genetics**. v. 225, p. 278-288, 1991.

WILLIAMS, S. T.; SHARPE, M. E.; HOLT, J. G. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. New York: Williams e Wilkins, v. 4, p. 2648, 1989.