

## PROSPECÇÃO DE MICRORGANISMOS PARA A PRODUÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEL

Joice Pereira Bomba\*

Simony Pimenta Mascarenhas Cotta\*\*

Ivanildo Evódio Marriel\*\*\*

### RESUMO

As enzimas hidrolíticas desempenham papel importante em diversos processos de interesses biotecnológicos. Dentre esses processos, o uso de biomassa para produção de biocombustíveis, como alternativa às fontes não renováveis, tem despertado grande interesse em virtude das mudanças climáticas. O objetivo deste trabalho foi avaliar e selecionar microrganismos (leveduras, fungos e actinomicetos) produtores das enzimas hidrolíticas amilase, celulase, lipase e xilanase, com potencial para produção de bioetanol e biodiesel. A seleção dos microrganismos foi determinada através do crescimento em meios de cultura com diferentes fontes de carbono (amido solúvel, carboximetilcelulose - CMC, azeite de oliva e xilana) incubados por 10 dias à 28°C, em triplicata. A avaliação da atividade enzimática foi realizada por meio do índice enzimático (IE), sendo classificados como microrganismos potencialmente produtores de enzimas aqueles cujo  $IE \geq 2,0$ . Entre os actinomicetos, observou-se a produção de  $IE \geq 2,0$  de amilase em 76,9 % dos isolados testados, 92,3 % avaliados para produção de celulase, 30,8 % para lipase e 7,7 % para xilanase, com valores de IE variando de 2,0 a 5,53. Com relação aos fungos e leveduras notou-se que estes microrganismos foram ineficientes para produção das enzimas hidrolíticas avaliadas, com  $IE < 2,0$ . Os IE variaram significativamente ( $p \leq 0,05$ ) entre os isolados em todas as enzimas avaliadas. Os resultados demonstram o alto potencial dos actinomicetos para prospecção em processos biotecnológicos de interesse para a indústria de biocombustíveis.

**Palavras-chave:** Amilase; Celulase; Enzimas Hidrolíticas; Xilanase.

### ABSTRACT

Hydrolytic enzymes play an important role in various processes of biotechnological interests. Among these processes, the use of biomass for the production of biofuels, as an alternative to non-renewable sources, has aroused great interest due to climate change. The objective of this work was to evaluate and select microorganisms (yeasts, fungi and actinomycetes) producers the hydrolytic enzymes amylase, cellulase, lipase and xylanase, with potential for bioethanol and biodiesel production. The selection of the microorganisms was determined by growth in culture media with different carbon sources (soluble starch, carboxymethylcellulose - CMC, olive oil and xylan) incubated for 10 days at 28°C in triplicate. The evaluation of the enzymatic activity was performed using the enzymatic index (IE), being classified as microorganisms potentially producing enzymes those whose  $IE \geq 2,0$ . Among the actinomycetes, the production of  $IE \geq 2,0$  amylase was found in 76,9% of the tested isolates, 92,3% evaluated for cellulase production, 30,8% for lipase and 7,7% for xylanase, With IE values ranging from 2,0 to 5,53. With respect of the fungi and yeasts, it was observed that these microorganisms were inefficient for the production of the hydrolytic enzymes evaluated, with  $IE < 2,0$ . EI varied significantly ( $p \leq 0,05$ ) among isolates in all enzymes evaluated. The results demonstrate the high potential of actinomycetes for prospecting in biotechnological processes of interest to the biofuels industry.

**Keywords:** Amylase; Cellulase; Hydrolytic Enzymes; Lipase; Xylanase.

---

\*Graduanda em Biotecnologia pela Faculdade Ciências da Vida

E-mail: [bomba\\_joice@hotmail.com](mailto:bomba_joice@hotmail.com)

\*\*Mestre em Biotecnologia e Gestão da Inovação pelo Centro Universitário de Sete Lagoas

E-mail: [spbm@uaivip.com.br](mailto:spbm@uaivip.com.br)

\*\*\*Doutor em Agronomia pela Universidade de São Paulo

E-mail: [imarriel@cnpms.embrapa.br](mailto:imarriel@cnpms.embrapa.br)

## 1 INTRODUÇÃO

As fontes energéticas têm papel fundamental na economia de um país e são fortemente dependentes dos combustíveis fósseis (carvão, petróleo e gás natural). Atualmente, 80% do consumo mundial de energia tem origem dessas fontes, apresentando um crescimento médio anual de 2% e nos últimos cinco anos esse valor cresceu para 3,1% ao ano. Devido à alta dependência dos combustíveis fósseis, as limitações dessa fonte estão cada vez mais evidentes com a sua atual escassez e esgotamento próximo (GOLDEMBERG *et al.*, 2008).

É importante salientar que a queima desses combustíveis pelos meios de transportes estão entre as principais causas das alterações climáticas no nosso planeta. Grandes quantidades de gases poluentes como o monóxido de carbono (CO), dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) e gases sulfurosos são emitidas na atmosfera. Os problemas são notáveis, observando contaminações no ar devido à queima desses combustíveis, gerando impactos no meio ambiente e na saúde do ser humano, como a chuva ácida e o efeito estufa (DRUMM, 2014).

Diante disso, os biocombustíveis, derivados da matéria orgânica chamada de biomassa, surgem como excelentes alternativas, com relação à emissão de poluentes na atmosfera. Essa biomassa pode ser de origem animal ou vegetal, sendo os resíduos agroindustriais lignocelulósicos como a cana-de-açúcar, milho, soja, semente de girassol e madeira, as principais fontes utilizadas atualmente, apresentando vantagens econômicas e ambientais, despertando interesse por serem uma fonte de energia de baixo custo, e originando diferentes biocombustíveis, como o bioetanol, o biodiesel e o biogás (ULHOA, 2014; GOMES, 2014).

Durante a produção dessas energias renováveis são necessários o emprego de catalisadores de caráter ácido, alcalino ou enzimas de origem microbiana. As enzimas microbianas são mais atrativas, pois minimizam os resíduos gerados durante o processo, são mais estáveis e específicas para o substrato, além de possuírem grande diversidade em propriedades de catálise. Apesar do grande interesse pelas enzimas, elas possuem a desvantagem do alto custo e a complexidade em controlar o processo. As mais utilizadas são: amilase, celulase, lipase e xilanase (SALIHU, 2011).

As enzimas amilolíticas são proteínas sintetizadas em organismos vivos, sendo elas de origem vegetal, animal ou microbiana, no qual essas últimas são utilizadas em grande maioria. Para a produção do bioetanol, o amido das matérias-primas lignocelulósicas necessita

ser convertido em açúcares de tamanhos menores, tornando-se necessário a ação das enzimas hidrolíticas amilolíticas, que promovem a hidrólise enzimática e conseqüentemente a quebra do amido em moléculas de glicose para que então ocorra a fermentação desse substrato (PEREIRA, 2015).

As celulases hidrolisam as ligações  $\beta$ -1,4 glicosídicas nas cadeias de celulose. A celulose é principal constituinte estrutural das células vegetais, proporcionando proteção osmótica e resistência mecânica às células. A hidrólise enzimática da celulose ocorre através da ação de um complexo multienzimático: as endoglucanases e as exoglucanases, redutoras ou não-redutoras. A produção de celulases por fungos tem sido muito estudada, e o gênero *Aspergillus* é um dos maiores produtores de enzimas do sistema celulolítico (PEREIRA, 2013).

As xilanases são enzimas que hidrolisam os grupos de polissacarídeos xilanas, também denominadas hemicelulose (SANTOS, 2012). Devido à complexidade da xilana, a sua hidrólise requer ação de um conjunto de enzimas responsáveis pela sua conversão em unidades menores. Essas enzimas são chamadas de endoxilanases e exoxilanases, transformando basicamente o xilano em xilo-oligômeros e xilose respectivamente. São caracterizadas pelo seu modo de ação, produtos da hidrólise e origem, já que podem ser produzidas por microrganismos como fungos e bactérias (PEREIRA, 2013).

Já as lipases são enzimas que catalisam a hidrólise de substratos como óleos e gorduras, formando o grupo mais importante dos biocatalizadores. Um de seus potenciais de aplicação é na reação de transesterificação enzimática visando à produção de biodiesel. O seu uso na bioconversão de óleos e gorduras possui vantagem sobre os catalizadores químicos, agindo sob condições brandas de temperatura e pressão, catalisando as reações tanto em meio aquoso como não aquoso e além disso, trazem vantagens ao meio ambiente (RODRIGUES, 2009).

Este trabalho teve o objetivo de selecionar actinomicetos, fungos filamentosos e leveduras da Coleção de Microrganismos Multifuncionais e Fitopatógenos da Embrapa Milho e Sorgo (CMMF-MS) com potencial biotecnológico para a produção das enzimas hidrolíticas amilase, celulase, lipase e xilanase. Essa seleção foi realizada através do cultivo desses microrganismos em meio sólido para posterior verificação de produção enzimática. Os microrganismos selecionados poderão ser utilizados em testes futuros de produção de biodiesel e bioetanol a partir de diferentes substratos, em substituição aos combustíveis fósseis utilizados atualmente.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 BIOCOMBUSTÍVEIS COMO ALTERNATIVA SUSTENTÁVEL

A energia é o principal elemento para o desenvolvimento econômico, e a sua necessidade aumenta de acordo com o aumento da população e da industrialização. Atualmente, as principais fontes geradoras de energia, totalizando por volta de 80% do consumo são o petróleo, o gás natural e o carvão mineral (CARVALHO & FERREIRA, 2017). Os combustíveis fósseis são considerados fontes energéticas não-renováveis, por serem produtos de lenta decomposição de organismos vivos pela ação do meio ambiente, por milhares de anos (MARTINS, 2015). Essas fontes de energia possuem reservas finitas, sendo necessário muito tempo para sua reposição no meio ambiente, e assim, a sua atual escassez está cada vez mais em evidência (MAZZOLA *et al.*, 2014).

Além disso, o uso inconsciente desses recursos naturais resultam em problemas ambientais, como o aquecimento global e a poluição proveniente da emissão de gases, causada principalmente pela queima de combustíveis fósseis, a chuva ácida (SOUZA *et al.*, 2015). Esta, tem origem através das queimas, onde são lançados na atmosfera gases poluentes,  $\text{NO}_2$ ,  $\text{SO}_2$ , que reagem com vapor de água presente na atmosfera, produzindo ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{NO}_4$ ) e nítrico ( $\text{HNO}_3$ ) (CARVALHO & FERREIRA, 2017; MACHADO, 2010).

Diante do exposto, ao longo do tempo, esses aspectos vêm sendo analisados e novas maneiras de conciliar as necessidades humanas com extração de recursos naturais vêm sendo desenvolvidas, como os biocombustíveis. Estes, são combustíveis energéticos para motores produzidos através de fontes renováveis e biodegradáveis através de diferentes substratos, como as plantas, gorduras vegetais e animais. Os biocombustíveis, além de serem seguros, são menos poluentes e podem ser produzidos a baixos custos devido à biomassa utilizada (DOMINGOS *et al.*, 2012).

Biomassa é qualquer matéria orgânica de origem vegetal ou animal, como a cana-de-açúcar, beterraba, milho, sorgo, semente de girassol, resíduos florestais, excrementos de animais, resíduos agrícolas e outros (SANTOS & ALMEIDA, 2010). A utilização de resíduos agroindustriais (fibras compostas por polissacarídeos, celulose, sacarose e hemicelulose) como biomassa apresenta vantagens econômicas e ambientais, onde o aproveitamento desses resíduos são de baixo custo e evitam o acúmulo dessas biomassas indesejáveis no meio

ambiente. As biomassas apresentam um potencial satisfatório para a geração de energia e uma série de combustíveis, como o bioetanol, biodiesel e o biogás. (CINELLI, 2012).

Entre a demanda de biocombustíveis existentes, o bioetanol e o biodiesel são os mais procurados atualmente. O bioetanol (etanol) possui algumas diferenças se comparado aos combustíveis derivados do petróleo. Apresenta maior teor de oxigênio, proporciona uma combustão mais limpa e melhor desempenho dos motores. O bioetanol é produzido através da fermentação alcoólica, processo pelo qual os microrganismos convertem açúcares em etanol, gerando bagaço como subproduto. Esse resíduo, composto por celulose e hemicelulose, pode ser convertido em glicose, xilose e outros açúcares por via microbiana através das enzimas hidrolíticas (SALES, 2010).

O bioetanol pode ser sintetizado a partir de diversos substratos: matérias-primas sacaríneas, compostas por sacarose encontradas em cana-de-açúcar e beterraba, matérias-primas amiláceas, ricas em amido e matérias-primas lignocelulósicas, através da celulose encontrada geralmente em madeiras, bagaço de cana, dentre outros. Para cada uma é recomendado o emprego de uma enzima diferente (amilase, celulase e xilanase), devido alta especificidade, e quando utilizadas em sinergismo, alcançam resultados satisfatórios (CINELLI, 2012).

O biodiesel pode ser produzido através de matéria-prima oleaginosa, como a soja, girassol, mamona, gorduras de origem animal e óleos de descarte utilizados para frituras. Essa biomassa é submetida a uma reação de transesterificação, no qual óleos vegetais reagem com o álcool, originando então o biodiesel e glicerol. Para que essa reação ocorra, é necessário o emprego de catalisadores ácidos, bases ou enzimas lipolíticas. Os catalisadores ácidos, geralmente apresentam maior rendimento e as bases são mais eficientes (RODRIGUES, 2009).

Já a síntese de biodiesel através de enzimas possui a vantagem da facilidade de retirada da glicerina livre e a possibilidade da utilização do etanol, onde o emprego da energia de ativação é menor para a hidrólise do triacilglicerol, devido à presença de água na sua composição, apresentando como desvantagem o alto custo. As lipases atuam sobre os triacilgliceróis, promovendo a sua catálise e conseqüentemente reações de transesterificação. Essa catálise enzimática possui alguns fatores que influenciam na atividade enzimática, como a biomassa utilizada, condições de agitação necessárias durante o processo e a razão da mistura do álcool a ser empregado na esterificação (SILVEIRA *et al.*, 2015).

## 2.2 MICRORGANISMOS PRODUTORES DE ENZIMAS

Devido à redução da disponibilidade de fontes não-renováveis de energia e aos problemas ambientais relacionados com as emissões de gases poluentes, os biocombustíveis apresentam-se como alternativa sustentável para a resolução desses problemas. Possuem como características a baixa toxicidade, são biodegradáveis, são capazes de reduzir as emissões de gases prejudiciais e são renováveis, pois seus substratos são as biomassas encontradas em abundância no meio ambiente. Diante disso, estão sendo realizadas pesquisas a fim de melhorar e desenvolver a produção de biocombustíveis com fontes renováveis (PALUDO, 2014).

Os microrganismos constituem uma alternativa eficiente e bastante estudada por serem capazes de produzir moléculas para a síntese de biocombustíveis tais como bioetanol, biodiesel e biogás. Essas energias produzidas através de microrganismos possuem a vantagem de não provocar impactos ambientais, sendo um processo limpo de geração de energia. Esses microrganismos, como actinomicetos, fungos filamentosos e leveduras, são capazes de converter açúcares como glicose, sacarose e outros componentes da biomassa lignocelulósica em compostos de interesse (OLIVEIRA & BATISTA, 2015).

Os actinomicetos são bactérias filamentosas e possuem grande diversidade morfológica. Suas colônias são formadas por uma massa de hifas, chamada de micélio, formado a partir do desenvolvimento inicial dos esporos, esporângios ou fragmentos de hifas em meio sólido, constituindo o micélio vegetativo. Algumas estirpes apresentam micélio aéreo, ao invés do micélio vegetativo, provocando alterações morfológicas, estruturais e fisiológicas. Os actinomicetos são amplamente encontrados em ambientes naturais, como rios, lagos e principalmente nos solos (BISPO, 2010).

A diversidade ecológica dos actinomicetos e sua capacidade de produzir metabólitos secundários faz-se importante para a produção de enzimas. As enzimas produzidas por eles possuem a capacidade de degradar compostos nitrogenados orgânicos, carboidratos, vários esteróides como colesterol, uma variedade de compostos aromáticos, acetileno e muitos outros. As enzimas sintetizadas pelos actinomicetos possuem grande interesse industrial por possuírem maior estabilidade a altas temperaturas e diferentes valores de pH, como por exemplo as amilases, celulasas, xilanases e quitinases (BISPO, 2010).

As leveduras e fungos filamentosos também são ótimos para a utilização na produção de enzimas por serem de fácil adaptação e manuseio sendo os mais utilizados para essa

função, devido aos mecanismos eucariotos. As leveduras possuem reprodução vegetativa por brotamento ou gemulação e apresentam tamanhos e morfologias diferentes, se comparadas às bactérias (CARVALHO *et al.*, 2007). Apresentam grande diversidade metabólica, colonizando qualquer fonte de nutriente, principalmente aqueles ricos em açúcar. Isso permite que elas sintetizem diversos tipos de enzimas com capacidade de hidrolisar moléculas de açúcar em tamanhos menores (SANTOS, 2012).

Os fungos filamentosos são claramente diferentes das leveduras. Possuem uma aparência de algodão e estão presentes em vários ecossistemas e habitats. Por terem variada diversidade metabólica, são de fácil adaptação, com crescimento rápido em meios relativamente simples com fontes de carbono (SANTOS, 2012). São apontados como grandes degradadores de biomassa, com destaque *Trichoderma* e *Penicillium*, principais gêneros produtores de celulases, sendo esse último possuidor de alto potencial para a produção da enzima  $\beta$ -glicosidase (ALMEIDA, 2013).

### 2.3 ENZIMAS PRODUTORAS DE BIOCOMBUSTÍVEIS: AMILASE, CELULASE, LIPASE E XILANASE

As amilases estão entre as principais enzimas industriais, e atualmente na produção de biocombustíveis através da degradação do amido. Atuam sobre o seu substrato, hidrolisando essa molécula em oligossacarídeos e glicose. O amido é um polissacarídeo heterogêneo composto por dois polímeros: a amilose e a amilopectina. É hidrolisado por enzimas denominadas amilolíticas, divididas em três categorias: as endoamilases, exoamilases e as desramificadoras (OLIVEIRA *et al.*, 2010). As endoamilases catalisam a hidrólise do amido no interior da sua molécula, quebrando-a em partículas de tamanhos variados. As exoamilases atuam no exterior da molécula através da hidrólise das extremidades da sua cadeia, resultando em moléculas menores. Já as enzimas desramificadoras atuam exclusivamente nas ligações  $\alpha$ -1,6 nas ramificações da amilopectina. A atuação sinérgica das principais enzimas amilolíticas favorecem a hidrólise do amido aumentando a taxa de reação e diminuindo a inibição dos produtos (CINELLI, 2012).

A celulose é um composto muito encontrado em vegetais, somando cerca de 50% da sua massa seca. É classificado como homopolímero linear, possuindo em sua composição moléculas de glicose associadas a outros polissacarídeos hemicelulósicos e lignina. As

celulases são enzimas biocatalizadoras específicas com capacidade de realizar a hidrólise da celulose para a liberação de açúcares, como a glicose. As celulases são classificadas de acordo com seu mecanismo de ação, e são divididas em três grupos: endoglucanases (EnG), exoglucanases (ExG) e  $\beta$ -glicosidases (BG), responsáveis pela quebra de ligações internas, externas e de oligossacarídeos solúveis em glicose, respectivamente. Apesar de ser muito encontrada em vegetais, a celulase pode ser sintetizada também por fungos e bactérias (SILVA, 2014).

As enzimas lipolíticas são empregadas na catálise da hidrólise de moléculas de triacilgliceróis em ácidos graxos. Essas são produzidas intracelular ou extracelular em diversos micro-organismos, como as leveduras *Candida rugosa* e *Candida antarctica*. As lipases mostram-se como promissoras alternativas na catálise de diversas reações, como a transesterificação, esterificação, acidólise e intesterificação. Esse fenômeno acontece devido ao ataque nucleofílico que a enzima realiza sobre o grupo carbonila do éster (SILVA, 2013).

As lipases estão sendo propostas para superar as expectativas das catálises químicas na produção de biodiesel. O seu emprego como biocatalisadores está sendo estudado devido ao seu benefício ao meio ambiente quando comparados a outros métodos (OBREGÓN, 2004). Ultimamente, ganharam uma atenção especial como biocatalisadores para a produção de biodiesel, na qual atuam efetuando a catálise da hidrólise do triglicerol (TAG), produzindo diacilglicerol (DAG), monoacilglicerol (MAG), glicerol e ácidos graxos livres (AGL) (MARDER *et al.*, 2008).

A xilana é um dos principais componentes da parede celular vegetal, é uma molécula mais complexa de ser hidrolisada, pois requer a ação de mais de uma enzima em diferentes especificidades atuando em sinergismo. Dentre elas, as xilanases e xilosidades são as principais que atuam nesse mecanismo. Essas são enzimas extracelulares, produzidas por microrganismos que atuam na hidrólise aleatória das ligações  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) da xilana e de xilooligossacarídeos. As enzimas  $\beta$ -xilosidades não conseguem hidrolisar a molécula da xilana, elas atuam na hidrólise de moléculas de xilobiose e xilooligossacarídeo, liberando assim a xilose. As xilanases, ou então endo-xilanase e exo-xilanase agem na cadeia principal das xilanas, mais especificamente nas ligações  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4), liberando diversos tamanhos de xilooligossacarídeos e xilose. A partir dos resíduos agroindustriais, as xilanases degradam a hemicelulose transformando em açúcar xilose. Com isso, acontece o processo de produção do etanol a partir da fermentação desse açúcar liberado (GOMES, 2014).

### 3 METODOLOGIA

O presente trabalho se trata de uma pesquisa experimental que se baseia em selecionar e testar microrganismos da Coleção de Microrganismos Multifuncionais e Fitopatógenos da Embrapa Milho e Sorgo (CMMF-MS) com potencial para produção de diferentes enzimas: amilase, celulase, lipase e xilanase. Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Microbiologia e Bioquímica do Solo da Embrapa Milho e Sorgo, no município de Sete Lagoas, MG.

#### 3.1 REATIVAÇÃO DOS ISOLADOS

As análises qualitativas-quantitativas foram realizadas em um total de 45 microrganismos da Coleção de Microrganismos Multifuncionais da Embrapa Milho e Sorgo, identificados como 13 actinomicetos, 16 fungos filamentosos e 16 leveduras, com base no seu sequenciamento. Os fungos filamentosos isolados estavam conservados à temperatura de -20°C no glicerol. Para a ativação das estirpes, foram inoculados uma alíquota de 10 µl em placas Petri com meio de cultura BDA (200 g/L de batata, 20 g/L de dextrose, 15 g/L de ágar) e incubados por 72h à 30°C.

Para a reativação dos isolados de leveduras e actinomicetos preservados em óleo mineral estéril, foram transferidos pequenos fragmentos para placas Petri contendo meio de cultura sólido. Para a transferência das leveduras foram utilizado o meio Ágar Yeast Extract Peptone Dextrose – YEPD (5 g/L de peptona, 5 g/L de extrato de levedura, 40 g/L de glicose e 15 g/L de ágar), incubado por 72h a 28°C. Já os actinomicetos, utilizou-se o meio Ágar Glicerol Asparagina – AGA [1 g/L de L-asparagina, 10 g/L de glicerol, 1 g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 15 g/L de ágar, e 1 ml/L de solução de micronutrientes (0,1 g de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,1 g de  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ; 0,1 g de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e 100 ml de água deionizada)] com posterior incubação por 14 dias à 28°C. Para verificar a pureza dos isolados foi empregado o método de esgotamento.

#### 3.2 ATIVIDADE ENZIMÁTICA

### 3.2.1 AMILASE

A produção de amilase foi determinada conforme descrito por Coon *et al.* (1957). Os isolados de actinomicetos, fungos filamentosos e leveduras foram suspensos em solução salina e inoculados no meio de cultura ágar amido (0,5 g/L de NaCl, 3 g/L de extrato de carne, 5 g/L de peptona caseína, 1 g/L de amido e 15 g/L de ágar) em triplicata. As culturas foram incubadas por 10 dias a 28°C, e em seguida adicionadas de 10 ml de solução lugol diluída (5 g/L de iodo, 10 g/L de iodeto de potássio) em cada placa. A produção da enzima amilase foi detectada pela descoloração do meio, com a formação de uma zona amarela ao redor da colônia, em contraste com o meio azul resultante da reação do amido com o iodo.

### 3.2.2 CELULASE

A atividade celulolítica dos actinomicetos, fungos filamentosos e leveduras foi avaliada de acordo com Lewis (1988), utilizando-se meio de cultura suplementado com carboximetilcelulose (CMC) como fonte única de carbono (3 g/L de NaNO<sub>3</sub>, 1 g/L de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5 g/L de MgSO<sub>4</sub>, 0,5 g/L de KCl, 10 g/L de FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 10 g/L de CMC, 15 g/L de ágar). Os isolados foram suspensos em solução salina, inoculados no meio de cultura e incubados por 10 dias a 28°C. Posteriormente, foram adicionados 10 mL de solução de vermelho congo a 0,5 % (m/v) em cada placa, deixando-se agir por 15 minutos. Em seguida, o excesso da solução foi descartado e adicionou-se 10 mL de solução de NaCl 1 M, deixando-se agir por 30 minutos sob temperatura ambiente. A produção da enzima celulase foi detectada através da descoloração alaranjada ao redor das colônias devido à reação da celulose com o vermelho congo.

### 3.2.3 LIPASE

A atividade lipolítica foi testada de acordo com Savitha *et al.* (2007), utilizando-se meio de cultura contendo: 1 g/L de extrato de levedura, 4 g/L de cloreto de sódio, 15 g/L de

ágar, 31,25 mL/L de óleo de oliva, 0,01 g/L de rodamina B. Os isolados foram suspensos em solução salina, inoculados no meio de cultura em triplicata e incubados por 5 dias a 28°C. Após o período de incubação, os isolados foram expostos a luz ultravioleta para a detecção da formação de halos de coloração azul ao redor das colônias, considerado como parâmetro indicativo da presença da enzima lipase.

#### 3.2.4 XILANASE

O teste de produção de xilanase foi avaliado de acordo com Heinz (2015) com algumas modificações. Os isolados de actinomicetos, fungos filamentosos e leveduras foram suspensas em solução salina e inoculadas em triplicata em placas Petri com meio de cultura XPY (2 g/L de xilano, 1 g/L de  $K_2HPO_4$ , 0,01 g/L de  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ , 3 g/L de  $NaNO_3$ , 0,5 g/L de KCl e 0,5 g/L de  $MgSO_4$ , 15 g/L de ágar e pH 6,0) e incubadas por 10 dias a 28°C. Após o período de incubação, adicionou-se 10 mL da solução de vermelho congo sobre a placa, deixando-se agir por 15 minutos. Em seguida, retirou-se o excesso da solução de vermelho congo e adicionou-se 10 mL da solução de NaCl 1 M, deixando-se agir por 30 minutos. Observou-se a revelação dos halos de cor alaranjada ao redor das colônias.

#### 3.2.5 ÍNDICE ENZIMÁTICO

As atividades hidrolíticas das enzimas amilase, celulase, lipase e xilanase foram estimadas através do cálculo do índice enzimático (IE), utilizando-se a seguinte equação:  $IE = Dh/Dc$ , sendo Dh o diâmetro em mm do halo de hidrólise e Dc o diâmetro em mm das colônias dos isolados (STAMFORD *et al.*, 1998; SILVA *et al.*, 2015). Os diâmetros dos halos de hidrólise e das colônias dos isolados foram medidos com paquímetro em mm, posicionado no reverso das placas de Petri inoculadas. Todos os 45 isolados foram dispostos em três repetições por amostra, onde os resultados da atividade enzimática dos microrganismos foram analisados pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade, por meio do programa SISVAR.

## 4 RESULTADOS

Do total de 45 isolados avaliados entre actinomicetos, fungos filamentosos e leveduras, apenas 13 (28,9%) não produziram nenhuma das enzimas analisadas, sendo esses todos leveduras. Os demais isolados (71,1%) apresentaram resultados positivos para pelo menos uma enzima hidrolítica. As amilases e celulases foram as enzimas que mais obtiveram isolados produtores com 30 (66,7%) e 26 (58%) isolados positivos, respectivamente. Já as lipases e xilanases apresentaram 7 (15,5%) e 14 (31,1%) dos isolados positivos. O índice enzimático (IE) variou significativamente ( $p \leq 0,05$ ) entre os microrganismos avaliados, sendo que para considerar um microrganismo como bom produtor de enzimas extracelulares, é necessário apresentar  $IE \geq 2,0$ .

### 4.1 ATIVIDADE ENZIMÁTICA NOS ACTINOMICETOS

Os resultados encontrados para atividade amilolítica para actinomicetos foram positivos para todos os isolados. Apenas os microrganismos ACT5, ACT3 e ACT11 apresentaram  $IE < 2$ , com valores iguais a 1,49, 1,77 e 1,27, respectivamente. Já o isolado ACT9 demonstrou maior IE igual a 3,96 classificando-se com ótimo potencial biotecnológico (Gráfico 1). Os resultados encontrados por Rodrigues (2009), foram diferentes, onde apenas 3 (30%) do seu total de 10 isolados foram positivos para amilase, com IE variando entre 1,2 a 2. Os resultados encontrados pelo autor foram inferiores ao presente estudo.

Entre os 13 isolados de actinomicetos, todos apresentaram resultados positivos para a atividade celulolítica, com IE variando entre 1,0 e 4,13 para os isolados ACT5 e ACT1 respectivamente (Gráfico 1). Apenas o isolado ACT5 não alcançou o  $IE > 2$ , não sendo considerado bom produtor da enzima celulase. De acordo com Nunes (2010), todos os 48 isolados de actinomicetos de processos de compostagem apresentaram resultados positivos para celulase, com índice de atividade enzimática entre 1,5 a 10,5 sendo esses superiores aos encontrados nesse trabalho com maiores índices enzimáticos.

Para a enzima lipase, apenas 6 (45,2%) isolados de actinomicetos foram classificados como positivos para formação de halos de hidrólise. Desses isolados, apenas 2 alcançaram valores de  $IE < 2$ . Os demais variaram entre 2,11 e 2,46 pelos isolados ACT7 e ACT13

respectivamente, considerados bons produtores enzimáticos lipolíticos (Gráfico 1). Nos estudos realizados por Barbosa *et al.* (2015), apresentaram resultados inferiores ao presente trabalho, onde 1 (14,3%) dos 7 actinomicetos analisados teve resultado positivo com valor de IE igual a 1,3.

Os resultados obtidos para a enzima xilanase a partir dos actinomicetos foram negativos para 12 (92,3%) isolados. Apenas o isolado ACT5 apresentou halo de hidrólise com IE > 2 com valor igual a 5,53 considerado como bom potencial biotecnológico (Gráfico 1). Bispo (2010), encontrou em suas análises vários actinomicetos com capacidade de sintetizar a xilanase, sendo que desses isolados positivos, 56 apresentaram IE < 2 e 35 demonstraram valores de IE > 2. Com isso, observa-se que os resultados encontrados no presente trabalho foram inferiores quando comparados com o autor em relação a quantidade de isolados produtores e com IE > 2.

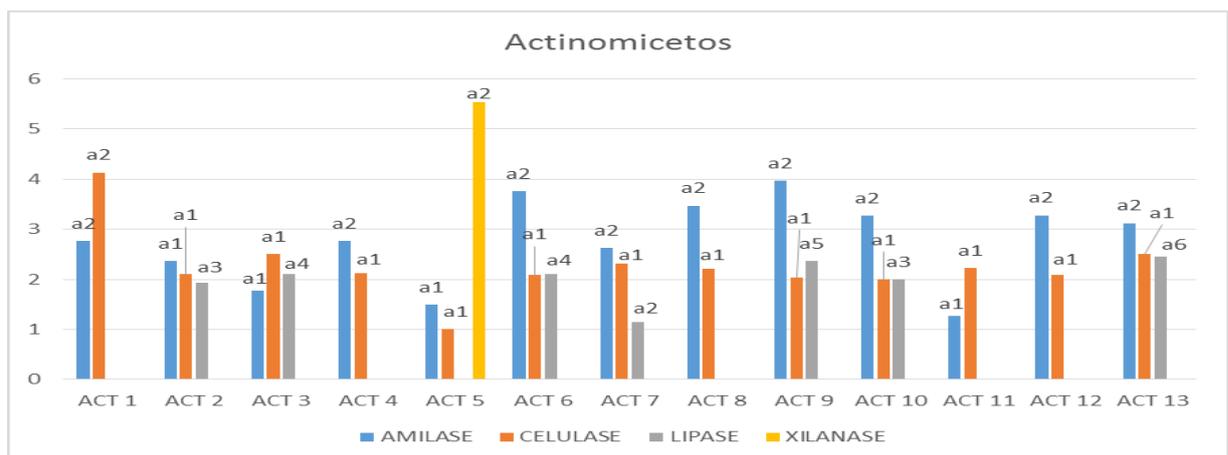


Gráfico 1 – Índice enzimático dos actinomicetos demonstrando diferença significativa por  $p \leq 0,05$  no teste de Scott-Knott.

## 4.2 ATIVIDADE ENZIMÁTICA NOS FUNGOS FILAMENTOSOS

Nos testes enzimáticos realizados nos isolados de fungos filamentosos para a amilase, os valores apresentados foram positivos para 14 (87,5%) destes, sendo que 2 demonstraram serem negativos. Entre os positivos o F27 apresentou maior IE com valor igual a 1,16. Nenhum isolado fúngico apresentou valor de IE > 2 (Gráfico 2). Nas análises realizadas por Soares *et al.* (2010), todos os seus isolados cultivados a 4°C apresentaram IE < 2,0, com melhor valor igual a 1,55. Pode-se dizer então, que as condições de temperatura

podem alterar o metabolismo dos microrganismos proporcionando condições estressantes e com isso produzem maiores quantidade de enzimas.

Entre os testes enzimáticos da celulase, os isolados foram positivos para 12 (75%) destes, sendo que 4 foram considerados como negativos. Entre os positivos, 11 deles apresentaram IE igual a 1, já o isolado F22 apresentou IE superior que os demais com valor de IE igual a 1,4 (Gráfico 2). Nenhum dos isolados de fungos filamentosos demonstraram valores de IE > 2. Nos trabalhos realizados por Florencio (2011), os isolados *Trichoderma* em estudo apresentaram resultados positivos em 97,9% do total dos seus isolados, com IE entre 1 e 1,90 demonstrando valores similares ao presente estudo.

Nos dados encontrados por Frantz *et al.* (2014), 29 cepas (29,3%) foram positivos, o isolados identificado como F76 apresentou o maior índice enzimático, com valor de 3,72 e o F61 o menor valor, igual a 0,67. Nesse trabalho, dos 16 fungos em análise apenas o F29 apresentou resultado positivos para lipase, com IE de 1,12 e nenhum alcançou IE > 2 (Gráfico 2). Com isso, classifica-se como negativo os isolados que não apresentaram halo de hidrólise lipolítica e, observa-se que o trabalho em questão demonstrou resultados inferiores comparados ao autor, com valores de IE > 2.

Para a enzima xilanase, 13 isolados foram considerados como positivos, destes 11 apresentaram valores de IE igual a 1. Os outros dois isolados, F18 e F29 demonstraram valores de IE igual a 1,57 e 1,89 respectivamente, no qual nenhum deles atingiu o valor de IE > 2, considerados com moderado potencial biotecnológico (Gráfico 2). Segundo Lopes *et al.* (2009), os isolados de fungos filamentosos de feijão apresentaram resultados positivos para a xilanase, com maior índice enzimático igual a 1,12. Sendo assim, os valores encontrados neste trabalho foram superiores aos resultados do autor em comparação.

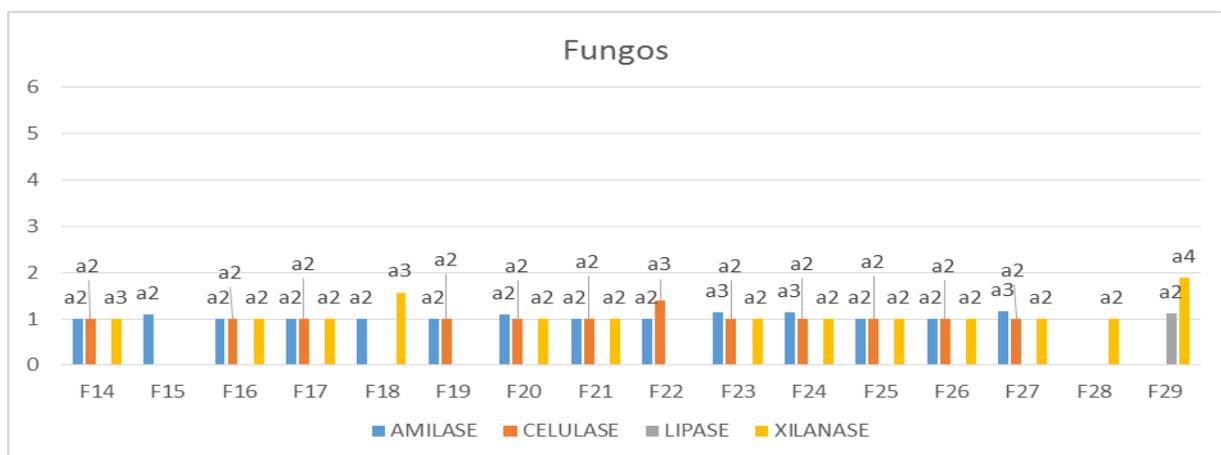


Gráfico 2 - Índice enzimático dos fungos demonstrando diferença significativa por  $p \leq 0,05$  no teste de Scott-Knott.

### 4.3 ATIVIDADE ENZIMÁTICA DAS LEVEDURAS

Dentre os 16 isolados de leveduras, apenas 3 foram considerados positivos para atividade amilolítica, todos com IE < 2. As leveduras identificadas como LEV32 e LEV42 apresentaram IE igual a 1,0, sendo os maiores produtores dessa classe. Já o isolado LEV45, apresentou valores de IE igual a 0,92 (Gráfico 3). Os demais microrganismos apesar de se desenvolverem no meio rico em amido, não apresentaram nenhum indício de degradação enzimática, sendo considerados como negativos. A baixa porcentagem de leveduras positivas foram encontrados também por Costa *et al.* (2014), onde apenas 16,3% dos seus isolados da batata-doce foram positivos para amilase. O crescimento dos microrganismos em meio onde a única fonte é o carbono do amido, propõe que todos produzam amilase extracelular, sendo que a molécula do amido não penetra na célula microbiana devido seu peso molecular. Com isso, pode-se dizer que todos os isolados possuem atividade enzimática, porém não difundiram-se no meio ficando adsorvidas a parede celular, não permitindo a formação de halo de hidrólise.

Nas enzimas celulases, as leveduras apresentaram valores negativos em 93,7% dos isolados, onde apenas o LEV42 apresentou resultado positivo com IE igual a 1,65 (Gráfico 3). Nenhum dos isolados das leveduras apresentaram valores de IE > 2, no qual não são considerados como bons produtores enzimáticos. Segundo Souza (2011), dentre os isolados analisados 94% apresentaram valores de IE > 2, com valores variando entre 1,89 a 3,16 apresentando ótimo potencial enzimático para celulase comparados aos isolados deste trabalho.

Entre os isolados de leveduras, nenhum apresentou halo de hidrólise para a enzima lipase (Gráfico 3), apesar de terem se desenvolvidos no meio com presença de óleos, sendo classificados então como negativos. Nas análises realizadas por Gonçalves (2007), em função da produção enzimática relacionada ao tempo, apresentaram resultados positivos. As cepas de leveduras crescidas em meio de cultura desenvolveram atividade lipolítica com melhores valores pela cepa 77, com IE de 1,56. Com isso, os resultados fornecidos por Gonçalves (2007) foram superiores a este trabalho mesmo não atingindo IE > 2.

As análises realizadas para atividade xilanolítica foram negativas em todos os 16 isolados (Gráfico 3), sendo assim, nenhum dos isolados foram considerados como produtores enzimáticos apesar das colônias terem se desenvolvido no meio de cultura sólido, onde a única fonte de carbono é a xilana. Nos trabalhos encontrados por Guedes (2016), do seu total

de isolados apenas 9 (6%) destes foram classificados como positivos, onde somente 6 apresentaram  $IE > 2$ , com valores variando entre 2,20 e 6,16 considerados com bom potencial biotecnológico.

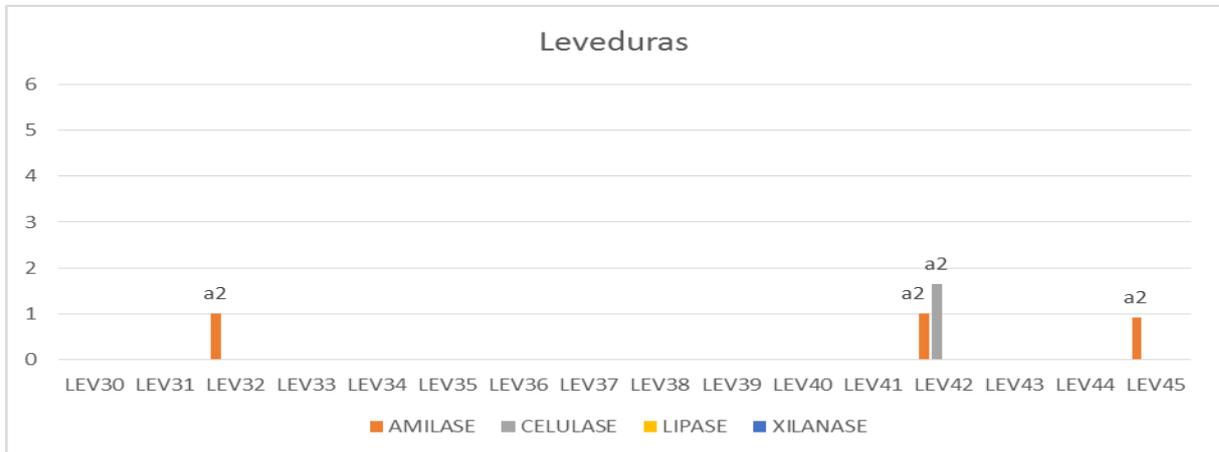


Gráfico 3 - Índice enzimático das leveduras demonstrando diferença significativa por  $p \leq 0,05$  no teste de Scott-Knott.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os biocombustíveis são considerados como uma excelente alternativa para a solução da atual escassez das energias fósseis. Para que isso aconteça da forma mais natural possível, pode-se utilizar enzimas hidrolíticas produzidas por microrganismos. Através dos resultados alcançados neste trabalho, podemos observar que 32 dos 45 isolados avaliados produziram pelo menos uma das enzimas hidrolíticas testadas, considerando também que a maioria dos isolados produzem mais de uma das enzimas de interesse. Os actinomicetos foram os microrganismos promissores para a produção enzimática, apresentando os maiores índices enzimáticos. Sendo assim, pode-se sugerir que todos os microrganismos considerados com bom potencial biotecnológico, sejam utilizados para posterior síntese de biocombustíveis como Biodiesel através das enzimas lipases e Bioetanol por meio das amilases, celulasas e xilanases.

## REFERÊNCIAS

ALMEIDA, J. R. M. **Anais de Simpósio. Microrganismos em Agroenergia: da Prospecção aos Bioprocessos.** Embrapa Agroenergia. Brasília, nov. 2013.

BARBOSA, E. C. **Isolamento, identificação e avaliação das atividades enzimática e antibacteriana de micro-organismos endofíticos de *Hyptis suaveolens* (L.) Poit.,** *Centro Científico Conhecer*, 2015.

BISPO, A. S. **Bioprospecção de actinomicetos isolados de solos no estado da bahia e seu potencial biotecnológico na produção de enzimas lignocelulolíticas.** 2010. f.104. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola). UFRB. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. Cruz das Almas, 2010.

CARVALHO, A. P. C.; FERREIRA, R. L. **A utilização de biocombustível como alternativa sustentável na matriz energética brasileira.** *Meio Ambiente e Sustentabilidade*, v. 5, n. 3, 2017.

CARVALHO, G. B. M.; BENTO, C. V.; SILVA, J. B. A. **Elementos Biotecnológicos Fundamentais no Processo Cervejeiro: 3ª parte–A Maturação.** *Revista Analytica*, v. 27, p. 69-74, 2007.

CINELLI, B. A. **Produção de etanol a partir da fermentação simultânea à hidrólise do amido granular de resíduo agroindustrial.** 2012. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). UFRJ. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

CONN, H. J. **Routine tests for the identification of bacteria.** *Manual of microbiological methods*, p. 140-168, 1957.

COSTA, S. T. C.; ABREU-LIMA, T. L.; CARREIRO, S. C. **Atividade amilolítica de leveduras isoladas de batata-doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam).** *Revista Biociências*, v. 17, n. 2, 2014.

DOMINGOS, C. A. **Biodiesel – proposta de um combustível alternativo,** 2012.

DRUMM, F. C. *et al.* **Poluição atmosférica proveniente da queima de combustíveis derivados do petróleo em veículos automotores.** *Electronic Journal of Management, Education and Environmental Technology (REGET)*, v. 18, n. 1, p. 66-78, 2014.

FLORENCIO, C. *et al.* **Microrganismos produtores de celulases: seleção de isolados de *Trichoderma spp.*** 2011.f.86. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). UFSC. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

FRANTZ, S. C.; CARREIRO, S. C.; SILVA, AGUIAR. J. B. **Produção de enzimas hidrolíticas por fungos isolados de folhas em decomposição.** Palmas, 2014.

GOLDEMBERG, J.; LUCON, O. **Energia, meio ambiente e desenvolvimento.** 2008.

GOMES, K. de S. *et al.* **Purificação e caracterização de xilanases do fungo *Chrysosporthe cubensis* e utilização na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar.** 2014. f.72. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Agrícola). UFV. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

GONÇALVES, F. A. G. **Produção de lipase extracelular por leveduras em cultivo submerso**. 2007.f67. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos). UFMG. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

GUEDES, E. H. S. **Produção de celulase e xilanase por leveduras isoladas de frutos de palmeiras**. *Ciência & Tecnologia*, v. 8, n. esp., 2016.

HEINZ, K. G. H. *et al.* **Avaliação da atividade hidrolítica de micro-organismos isolados de resíduo do processamento de papel**. *Revista de Estudos Ambientais*, v. 16, n. 2, p. 37-47, 2015.

LEWIS, K. J. **Biological control mechanism of the mycoparasitae *Phytum oligandum* Dreschler**, 1988.

LOPES, V. R. *et al.* **Atividade de xilanase em cepas de *Colletotrichum* e *Trichoderma***. In: Embrapa Agroindústria Tropical-Artigo em anais de congresso (ALICE). In: SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS. Natal. Anais: Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2009.

MACHADO, M. B. **Uma revisão sobre os impactos causados pela chuva ácida no meio ambiente**, 2010.

MARTINS, S. S. S. *et al.* **Produção de petróleo e impactos ambientais: algumas considerações**. *HOLOS*, v. 6, 2015.

MARDER, F. *et al.* **Produção de biodiesel por biocatálise utilizando método alternativo de Imobilização da lipase em hidrogel**. *Tecno-lógica*. Santa Cruz do Sul, v.12, n.2, p.56-64, jun./dez. 2008.

MAZZOLA, A. *et al.* **Energia fóssil: implantação de refletores na quadra de esportes, utilizando energia fóssil**. *Eventos Pedagógicos*. 2014.

NUNES, T. E. T. **Atividade celulolítica de isolados de actinomicetos oriundos de processo de compostagem frente a diferentes temperaturas**. 2010.

OBREGÓN, C. L. **Obtenção de biodiesel através da transesterificação enzimática: energia alternativa para auto-desenvolvimento**. out. 2004.

OLIVEIRA, L.; BATISTA, R. D. **Perspectivas e situação atual da produção de biocombustíveis**. *Revista Eletrônica de Energia*. v. 5, n. 1, p. 32-42, jan./jun. 2015.

OLIVEIRA, L. A. D.; FLOR, N. S.; OLIVEIRA, A. N. D. **Influência do pH e temperatura sobre a atividade amilolítica de rizóbios isolados de solos da Amazônia**. 2010.

PALUDO, G. B. **Microrganismos geneticamente modificados e sua relação com o aumento na produção de biocombustíveis**. *Enciclopédia Biosfera*. Centro Científico Conhecer. Goiânia. 2014.

- PEREIRA, C. R. *et al.* **Produção de amilases por *Aspergillus niger*: potencial de aplicação na hidrólise do amido granular da batata-doce.** 2015. f.88. Dissertação (Mestrado em Bioenergia). UNICENTRO. Universidade Estadual do Centro Oeste, Guarapuava.
- PEREIRA, D. E. P. *et al.* **Análise de celulases e xilanases por fungo isolado a partir do bioma cerrado.** 2013.f.101. Dissertação (Mestrado em Biologia). UFG. Universidade Federal de Goiás, Goiânia.
- RODRIGUES, A. A. *et al.* **Atividade antimicrobiana e produção de enzimas de interesse biotecnológico de bactérias isoladas de diferentes habitats.** 2009.f.80. Dissertação (Mestrado em Microbiologia). UFG. Universidade Federal de Goiás, Goiânia.
- RODRIGUES, R. C. **Síntese de biodiesel através de transesterificação enzimática de óleos vegetais catalisada por lipase imobilizada por ligação covalente multipontual.** 2009.f.183. Dissertação (Doutorado em Engenharia Química). UFRGS. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- SALES, M. **Produção de enzimas do complexo celulolítico e da xilanase por *Aspergillus spp.* da coleção de culturas Micoteca URM, UFPE, utilizando bagaço de cana-de-açúcar como substrato.** 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). UFP. Universidade Federal de Pernambuco, Recife.
- SALIHU, A. *et al.* **Optimization of lipase production by *Candida cylindracea* in palm oil mill effluent based medium using statistical experimental design.** *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 69, n. 1, p. 66-73. 2011.
- SANTOS, J. B.; ALMEIDA, J. V. **Os biocombustíveis e seus impactos ambientais e suas medidas mitigadoras,** p.1. 2010.
- SANTOS, R. S. D. **Produção de enzimas celulolíticas e xilanolíticas por fungos filamentosos utilizando resíduos da cadeia do biodiesel como fonte de carbono.** 2012. f.113. Dissertação (Mestrado em Química) Programa de Pós-graduação em Química. UFVJM. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina.
- SAVITHA, J. *et al.* **Identification of potential fungal strain (s) for the production of inducible, extracellular and alkalophilic lipase.** *African journal of biotechnology*, v. 6, n. 5, p. 564, 2007.
- SILVA, M. J. **Produção de enzimas celulolíticas e xilanolíticas por *Trichoderma reesei* rut c-30 em meios com diferentes capacidades de indução.** 2014. f.93. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial). UFP. Universidade Federal de Pernambuco, Recife.
- SILVA, W. C. **Produção enzimática de biodiesel de óleos láuricos em reatores de leito fixo duplo estágio incorporando coluna extratora do glicerol formado como subproduto.** 2013. f.125. Dissertação (Mestrado em Ciências). USP. Universidade de São Paulo, Lorena.
- SILVA, V. M. A. *et al.* **Atividade enzimática de Actinobactérias do Semiárido.** *Revista Brasileira de Geografia Física. Revista Brasileira de Geografia Física*, v.8, 2015.
- SILVEIRA, C. *et al.* **Produção via enzimática de biodiesel a partir de óleo de soja.** Florianópolis. 2015. Editora Blucher.

SOARES, I. A. *et al.* **Identificação do potencial amilolítico de linhagens mutantes do fungo filamentoso *Aspergillus nidulans***. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 30, n. 3, 2010.

SOUZA, A. C. D. **Utilização de celulases de leveduras para produção de bioetanol de segunda geração**. 2011.f.90. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola). UFL. Universidade Federal de Lavras, Lavras.

SOUZA, V. H. A. **Aspectos sustentáveis da biomassa como recurso energético**. 2015.

STAMFORD, T. L. M.; STAMFORD, N. P.; ARAÚJO, J. M. **Atividade enzimática de microrganismos isolados do jacatupé (*Pachyrhizus erosus* L.Urban)**, 1998.

ULHOA, S. A. **Produção de Biocombustíveis: um panorama sobre o discurso ambiental e econômico**. *Acervo da Iniciação Científica*, n. 2. 2014.