



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

CENTRO DE CIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR

BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

DANIEL DE OLIVEIRA MACIEL

**PROSPECÇÃO DE ACTINOBACTÉRIAS DO SEMIÁRIDO NORDESTINO COM
POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO NA PRODUÇÃO DE ENZIMAS RELACIONADAS
À HIDRÓLISE DE CARBOIDRATOS**

FORTALEZA

2021

DANIEL DE OLIVEIRA MACIEL

PROSPECÇÃO DE ACTINOBACTÉRIAS DO SEMIÁRIDO NORDESTINO COM
POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO NA PRODUÇÃO DE ENZIMAS RELACIONADAS À
HIDRÓLISE DE CARBOIDRATOS

Monografia apresentada ao curso de Bacharelado em Biotecnologia do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Suzana Claudia Silveira Martins

Coorientador: Mestre Fernando Gouveia Cavalcante

FORTALEZA

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

M138p Maciel, Daniel de Oliveira.

Prospecção de actinobactérias do semiárido nordestino com potencial biotecnológico na produção de enzimas relacionadas à hidrólise de carboidratos / Daniel de Oliveira Maciel. – 2021.
58 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Biotecnologia, Fortaleza, 2021.

Orientação: Profa. Dra. Suzana Cláudia Silveira Martins.

Coorientação: Prof. Me. Fernando Gouveia Cavalcante.

1. Streptomyces. 2. Catálise enzimática. 3. Índice enzimático. I. Título.

CDD 661

DANIEL DE OLIVEIRA MACIEL

PROSPECÇÃO DE ACTINOBACTÉRIAS DO SEMIÁRIDO NORDESTINO COM
POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO NA PRODUÇÃO DE ENZIMAS RELACIONADAS À
HIDRÓLISE DE CARBOIDRATOS

Monografia apresentada ao curso de
Bacharelado em Biotecnologia do
Departamento de Bioquímica e Biologia
Molecular da Universidade Federal do
Ceará como requisito parcial para obtenção
do título de Bacharel em Biotecnologia.

Aprovada em: 09/04/2021.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Suzana Claudia Silveira Martins (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Claudia Miranda Martins
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Daniele de Oliveira Bezerra de Sousa
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Aos meus queridos pais adotivos, Francimar e Nilo.

Às minhas queridas irmãs, Francilene, Francimara, Francineide e Francileide, por me apoiarem nesta jornada.

A todos os meus amigos, colegas de cursos por sempre me apoiarem e me ajudarem quando eu mais precisei.

AGRADECIMENTOS

A todos que permitiram a minha permanência na universidade, principalmente:

Aos meus pais, Francimar e Nilo que sempre estiveram me apoiando em todas as minhas escolhas.

Ao meu querido pai, Nilo, meu maior exemplo de força, justiça, honra e trabalho. Homem que nunca duvidou de mim e da minha capacidade.

A minha irmã Francilene por acreditar em mim e ser extremamente presente na minha vida.

Ao meu amigo Bruno Gomes por ser tão especial pra mim e por fazer parte deste sonho de entrar na UFC e de me formar, sou extremamente grato a ele.

A minha amiga Marília Freitas por sempre estar comigo e nunca desistir de mim, um ser extremamente importante pra mim, sou extremamente grato nessa vida por ter cruzado essa mulher na minha vida.

Ao meu Co-orientador Fernando Gouveia por ter que me aturar nas tardes do Laboratório de Microbiologia Ambiental e principalmente pela experiência e conhecimento transferido a mim.

A Bruna Araújo a catitona por ser tão empática comigo e ter a sensibilidade de cuidar dos outros.

Aos meus amigos do Curso, Júnior Oliveira, Lucas Calixto, Vinicius Cardoso pelos dias vividos juntos nesta jornada chamada universidade, sou bastante grato pela companhia e relação construída.

Aos meus amigos na sua grande maioria icafesters Livia Cardoso, Ítalo Gomes, Pedro Victor, Caio Correia, Laís Leite, Larissa Welter, Ariel Mesquita, Bruno Perreira, Gabriela Mesquita, Livia Pontes, Gabrieli Sobral, Igor Ferreira, Alessandra Oliveira, Amanda Olímpia entre outros, pelo apoio e força em continuar nessa jornada e sonho de ser Biotecnologista.

A PRAE por sempre pensar e realizar ações que visam a permanência do aluno na Universidade.

A mim pela força, garra e vontade de vencer independentemente dos obstáculos.

“A persistência é o menor caminho do êxito”
Charles Chaplin

RESUMO

As actinobactérias constituem uma parte representativa dos microrganismos do solo. São bactérias Gram-positivas, de organização filamentosa e muitas vezes ramificada. Esse grupo cresce em ambientes extremos onde produzem uma gama de biomoléculas, incluindo as enzimas. Nesse sentido, essas bactérias representam um atraente potencial biotecnológico. Assim, as actinobactérias deste estudo foram coletadas do solo de uma região do semiárido onde as condições abióticas induzem a adaptações metabólicas para catálise de polímeros complexos. O objetivo do trabalho foi isolar e caracterizar actinobactérias do solo do Parque Nacional de Ubajara para avaliação do potencial enzimático. As amostras de solo foram coletadas no período compreendido entre Abril a Junho de 2018. Essas amostras foram preparadas e então inoculadas em meio de cultura seletivo para a contagem e caracterização cromogênica das colônias, que consistiu na observação do micélio aéreo e do micélio reverso de cada isolado, bem como, a presença ou ausência de pigmentos difusivos no meio. Trinta e nove cepas foram isoladas, preferencialmente, com diferentes características culturais e estão mantidas em condições adequadas no (LAMAB) Laboratório de Microbiologia Ambiental do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará. Foi estudada a ação catalítica das enzimas: celulase, amilase, xilanase e pectinase pela medida do Índice Enzimático (IE), um método semi-quantitativo, correspondente à relação, divisão entre o diâmetro em milímetros do halo de catálise e o diâmetro em milímetros da colônia de cada cepa. Os resultados deste trabalho mostraram que as cepas do gênero *Streptomyces* UBJ 25 (IE= 5,6), UBJ 17 (IE = 8,21) UBJ 20 (IE = 11,33) e UBJ 38 (IE = 8,05) apresentaram a maior atividade amilolítica, celulolítica, pectinolítica e xilanolítica, respectivamente, possuindo o potencial biotecnológico, principalmente no que tange a exploração de enzimas relacionadas à degradação de polímeros de carboidratos.

Palavras-chave: *Streptomyces*, catálise enzimática e índice enzimático

ABSTRACT

Actinobacteria are a representative part of soil microorganisms. They are Gram-positive bacteria, filamentous and often branched. This group grows in extreme environments where they produce a range of biomolecules, including enzymes. In that sense, these bacteria represent an attractive biotechnological potential. Thus, the actinobacteria in this study were collected from the soil of a semi-arid region where abiotic conditions induce metabolic adaptations for complex polymer catalysis. The aim of this study was to isolate and characterize actinobacteria from the soil of the National Park of Ubajara to evaluate the enzymatic potential. The soil samples were collected between April and June 2018. These samples were prepared and then inoculated in a selective culture medium for the counting and chromogenic characterization of the colonies, which consisted of the observation of the aerial mycelium and the reverse mycelium of each isolated, as well as, the presence or absence of diffusive pigments in the medium. Thirty-nine strains were isolated, preferably with different cultural characteristics and are kept in adequate conditions at the (LAMAB) Laboratory of Environmental Microbiology of the Department of Biology at the Federal University of Ceará. The catalytic action of the enzymes: cellulase, amylase, xylanase and pectinase was studied by measuring the Enzyme Index (IE), a semi-quantitative method, corresponding to the ratio, division between the diameter in millimeters of the catalysis halo and the diameter in millimeters of the colony of each strain. The results of this work showed that the strains of the genus *Streptomyces* UBJ 25 (IE = 5.6), UBJ 17 (IE = 8.21) UBJ 20 (IE = 11.33) and UBJ 38 (IE = 8.05) presented the greater amylolytic, cellulolytic, pectinolytic and xylanolytic activity, respectively, possessing the biotechnological potential, especially with regard to the exploration of enzymes related to the degradation of carbohydrate polymers.

Keywords: *Streptomyces*, enzymatic catalysis and enzyme index

Sumário

1.	INTRODUÇÃO.....	12
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1	Actinobactérias.....	14
2.2	Amido e Amilase	16
2.3	Celulose e Celulase	18
2.4	Pectina e Pectinase.....	20
2.5	Xilana e Xilanase	22
3.	OBJETIVOS.....	25
3.1	Objetivo Geral.....	25
3.2	Objetivos Específicos	25
4.	MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1	Local de Coleta.....	26
4.2	Preparo do Solo	27
4.3	Isolamento de Actinobactérias.....	27
4.4	Meio de Cultivo dos Isolados	28
4.5	Caracterização Cultural.....	28
4.6	Análise Micromorfológica	28
4.7.	Atividade Enzimática	29
4.7.1	Atividade Amilolítica	29
4.7.2	Atividade Celulolítica	29
4.7.3	Atividade Pectinolítica.....	30
4.7.4	Atividade Xilanolítica	30
4.8	Análise de Dados	30
5.	RESULTADOS	31
5.1	Micélio Aéreo.....	31

5.2 Micélio Reverso	31
5.3 Pigmentos Difusivos	32
5.4 Microcultivo	33
5.5 Dendrograma de Similaridade	34
5.6 Atividade Enzimática	Error! Bookmark not defined.
5.7 Atividade Amilolítica	Error! Bookmark not defined.
5.8 Atividade Celulolítica	Error! Bookmark not defined.
5.9 Atividade Pectinolítica.....	Error! Bookmark not defined.
5.10 Atividade Xilanolítica	Error! Bookmark not defined.
6. DISCUSSÃO.....	44
7. CONCLUSÃO	47
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
APÊNDICE A - ISOLADOS CENTRAIS DAS CEPAS ISOLADAS DA UNIDADE DE CONSERVAÇÃO DO PARQUE NACIONAL DE UBAJARA.....	55
APÊNDICE B - CORES DO MICÉLIO AÉREO E MICÉLIO REVERSO SEGUNDO A CARTELA DE CORES (WINX, 2012).....	59
APÊNDICE C – POSSÍVEL GÊNERO E ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE CADA CEPA DE ACTINOBACTÉRIA DA UNIDADE DE CONSERVAÇÃO DO PARQUE NACIONAL DE UBAJARA.....	60

1. INTRODUÇÃO

As actinobactérias são bactérias Gram-positivas com DNA rico nas bases nitrogenadas guanina e citosina (PEREIRA *et al.*, 2012; PÉREZ CORRAL *et al.*, 2015). São cosmopolitas e estão presentes em todos os ambientes, sendo amplamente distribuídas no solo, na água e em vários outros ambientes naturais (MAATAOUI *et al.*, 2014). São encontradas inclusive em ambientes extremófilos, como fontes termais, solos alcalinos, salinos, sedimentos do fundo do mar e intestino de animais (GONG *et al.*, 2018).

As actinobactérias morfologicamente se assemelham a fungos (SHOUCHE; BHATI, 2019) e fisiologicamente se assemelham a bactérias (SULTAN *et al.*, 2002). Crescem como hifas assim como os fungos, mas a composição da parede celular é similar à das bactérias Gram-positivas (SHOUCHE; BHATI, 2019).

As actinobactérias são consideradas as principais produtoras de antibióticos do solo, porém, além dos antibióticos, substâncias antivirais, antitumorais, imunomoduladores, compostos agrobiológicos e enzimas de alto valor comercial, também têm sido isoladas (SEMÊDO *et al.*, 2004).

A heterogeneidade bioquímica das actinobactérias, sua diversidade ecológica e sua capacidade excepcional para a produção de metabólitos secundários a tornam um bom alvo para a produção de enzimas, desempenhando novas atividades e especificidades, sendo uma fonte promissora para uma ampla faixa de importantes enzimas (SEMÊDO *et al.*, 1997).

As enzimas das actinobactérias são capazes de degradar compostos nitrogenados orgânicos, carboidratos, vários esteróides como o colesterol, uma variedade de compostos aromáticos, acetileno e muitos outros. Elas também são capazes de utilizar o agar, a borracha, a parafinas e a ligninas, substâncias que são reconhecidamente resistentes ao ataque da grande maioria de bactérias e fungos, como substrato. Algumas dessas enzimas já têm sido produzidas em escala industrial, mas a grande maioria ainda não (SEMÊDO *et al.*, 2000).

O potencial enzimático das actinobactérias é outro aspecto importante a ser considerado, pois apesar das enzimas ocorrerem amplamente em plantas e animais, as de origem microbiana representam as melhores fontes devido à sua ampla diversidade bioquímica e suscetibilidade à manipulação genética (ALTIMARANO *et al.*, 2000). Depois dos antibióticos, as enzimas são os produtos mais explorados pela indústria biotecnológica e são utilizadas em larga escala nas indústrias têxtil, de papel, de detergente, de couro, de alimento, entre outras (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

Esses microrganismos representam uma das classes mais importantes de bactérias devido sua capacidade de produzir uma ampla gama de biomoléculas com atividade atrativa economicamente (GANESAN *et al.*, 2017). Produzem cerca de dois terços de todos os antibióticos de origem natural em uso clínico atual, bem como muitos anticancerígenos, anti-helmínticos e antifúngicos (BARKA *et al.*, 2016). No semiárido existem relatos de produção de enzimas hidrolíticas por essas bactérias, como celulase, amilase (ALVES *et al.*, 2016; LOPES *et al.*, 2018) e xilanase (SOUSA *et al.*, 2018).

Microrganismos que vivem em condições extremas, como as presentes na Caatinga, passaram a ter uma atenção especial de muitos pesquisadores e consequentemente algumas descobertas foram feitas sobre a diversidade bacteriana da Caatinga, como a predominância de alguns filos no período de chuva e de seca (KAVAMURA *et al.*, 2013; TAKETANI *et al.*, 2015) e potencial biotecnológico nesse ambiente (SANTOS *et al.*, 2013).

Com base nesses estudos ficou possível destacar que esse ambiente abriga uma variedade e diversidade de microrganismos, algumas vezes levando à descrição de novas espécies (SANTOS *et al.*, 2015) entre estas as que produzem enzimas com aplicações biotecnológicas (OLIVEIRA *et al.*, 2016).

O objetivo do estudo foi realizar uma prospecção de actinobactérias com potencial biotecnológico enzimático, isoladas de amostras de solo da Unidade de Conservação do Parque Nacional de Ubajara, Ubajara (CE). Este trabalho servirá para dar suporte científico para futuras pesquisas acerca da aplicação biotecnológica de actinobactérias, principalmente explorando o potencial enzimático destas bactérias.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Actinobactérias

São bactérias Gram-positivas que possuem uma elevada concentração de G + C, com cerca de 65-75% dessas bases nitrogenadas (guanina, citosina) no DNA (SHARMA; DAVID, 2012), encontradas em diversos ambientes, principalmente no solo (LEWIS, 2016).

A distribuição das espécies e diversidade biológica do Filo Actinobactéria são bastantes influenciadas por alguns fatores ambientais, como temperatura, pH e disponibilidade de nutrientes, atuando no desenvolvimento e proliferação das actinobactérias (ZHAO *et al.*, 2011). Esses microrganismos apresentam distribuição cosmopolita, sendo encontrados em plantas, principalmente, em folhas e raízes (ZHAO *et al.*, 2011) solo, sendo este o habitat mais comum, abundante na rizosfera, região do solo influenciada pelas raízes da planta (MEHRAVAR.; SARDARI; OWLIA, 2011) deserto (NOROVSUREN; ZENOVA; MOSINA, 2007) incluindo habitats extremos, como sedimentos marinhos (PATHOM-AREE *et al.*, 2006), geleira (REDDY *et al.*, 2010) e solos desérticos hiperáridos (OKORO *et al.*, 2009). Outros são patógenos de plantas e animais, simbiontes, comensais ou habitantes do trato gastrointestinal de alguns animais (GOODFELLOW; FIEDLER, 2010).

No solo estas bactérias realizam funções importantes no processo de ciclagem de nutrientes, degradando compostos complexos de difícil decomposição como lignocelulose, lignina, celulose e outros materiais recalcitrantes, devido à sua capacidade em produzir diversas enzimas hidrolíticas e lipolíticas (OLIVEIRA *et al.*, 2017). São mais abundantes na rizosfera, região do solo influenciada pelas raízes da planta onde ocorre uma grande diversidade de microrganismos, especialmente o gênero *Streptomyces* (BENIZRI; BAUDOUIN; GUCKERT, 2001).

As actinobactérias são importantes representantes de bactérias produtoras de compostos bioativos e representam o maior grupo de microrganismos produtores de metabólitos secundários (DE OLIVEIRA *et al.*, 2017). A produção de uma grande variedade e diversidade de compostos bioativos fazem desses microrganismos uma fonte de grande interesse para biotecnologia. Algumas das aplicações que esses microrganismos podem ter são na produção de antibióticos (HASSAN; EL-BARAWY; EL MOKHTAR, 2011), pigmentos (ABREU *et al.*,

2014), vitaminas (PONTES; ESCHER, 2014) e enzimas (SAHA *et al.*, 2013). O gênero *Streptomyces* é o de maior importância biotecnológica dentro deste grupo, pois é responsável por sintetizar metabólitos que apresentam atividades antibiótica, herbicida, pesticida e antiparasitária (RODRIGUES; BEZERRA; COELHO, 2006).

A caracterização taxonômica das actinobactérias, especialmente as produtoras de metabólitos bioativos, é um aspecto muito importante para a seleção de compostos com ação farmacológica de interesse, pois garante informações sobre o microrganismo produtor em estudo, sobre a natureza do metabólito gerado, e associar se o mesmo já foi isolado ou não (ADEGBOYE; BABALOLA, 2012).

O potencial enzimático das actinobactérias é outro aspecto importante a ser considerado, pois apesar das enzimas ocorrerem amplamente em plantas e animais, as de origem microbiana representam as melhores fontes devido à ampla diversidade bioquímica e suscetibilidade à manipulação genética (ALTIMARANO *et al.*, 2000).

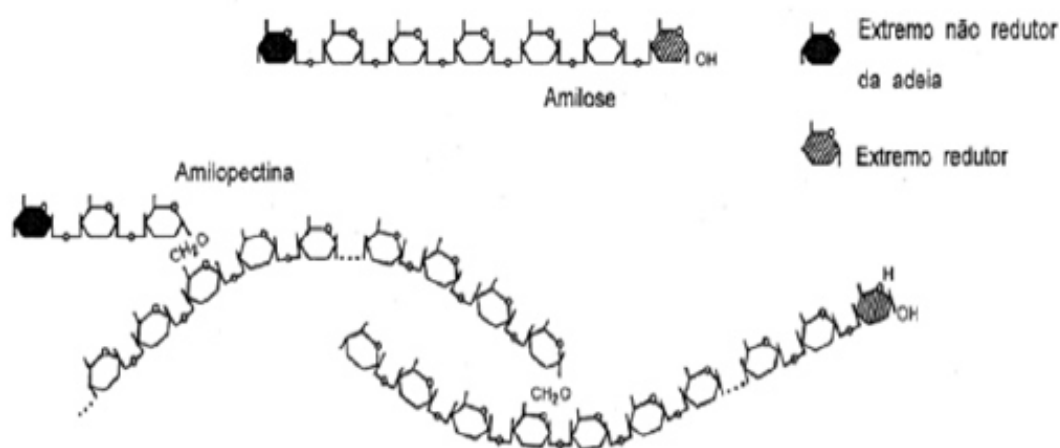
Depois dos antibióticos, as enzimas são os produtos mais explorados pela indústria biotecnológica e são utilizadas em larga escala nas indústrias têxtil, de papel, de detergente, de couro, de alimento, entre outras (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

Vários estudos apontam as actinobactérias como fontes emergentes promissoras de uma ampla faixa de importantes enzimas de interesse industrial e ambiental, como aquelas envolvidas na degradação de materiais lignocelulósicos (GOODFELLOW *et al.*, 1988; FLORES *et al.*, 1997).

2.2 Amido e Amilase

O amido é o mais importante polissacarídeo de reserva do reino vegetal. Possui em sua constituição amilose (25%) e amilopectina (75%) (FERNANDES, et al, 2007) . Amilose é um polímero linear constituído de cerca de 6000 resíduos de glicose unidos por ligações glicosídicas do tipo α -1,4. Amilopectina consiste de pequenas cadeias laterais de 15 a 45 resíduos unidos por ligações do tipo α -1,6, além das ligações α -1,4 (BULÉON et al., 1998). As proporções em que essas estruturas aparecem diferem em relação às fontes botânicas, variedades de uma mesma espécie e, mesmo numa mesma variedade, de acordo com o grau de maturação da planta (ELIASSON, 2004; TESTER *et al.*, 2004).

Figura 01: Estrutura dos componentes da molécula de amido



Fonte: REGULY (1996)

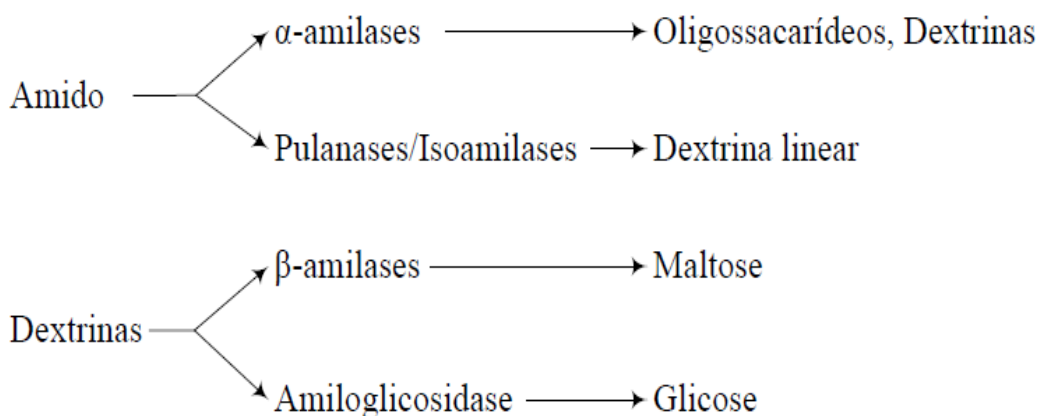
O amido encontra-se amplamente distribuído em diversas espécies vegetais como um carboidrato de reserva, sendo abundante em grãos de cereais (40% a 90% do peso seco), leguminosas (30% a 50% do peso seco), tubérculos (65% a 85% do peso seco) e frutas imaturas ou verdes (40% a 70% do peso seco) (LAJOLO, MENEZES., 2006). Ele é também a fonte mais importante de carboidratos na alimentação humana, representando 80% a 90% de todos os polissacarídeos da dieta (WALTER., 2005).

As endoenzimas tais como amilases agem em qualquer lugar das estruturas dos grânulos de amido e na cadeia de amido danificado ou degradado, Os produtos da hidrólise da α -amilase

são a glicose, maltose e dextrinas, dependendo da extensão da hidrólise que ocorre, podendo ser desejável em processos industriais (SCIPIONE., 2011).

As exoenzimas como a β -amilase atuam nas extremidades redutoras finais e em cadeias de amilose ou amilopectina. Esta hidrolisa o amido em duas unidades de glicose, produzindo maltose. A β -amilase não pode hidrolisar o amido além dos pontos de ramificações da amilopectina. A enzima amiloglicosidase hidrolisa as ligações α -(1,4) produzindo glicose e, lentamente ligações α -(1,6), no amido. A dextrina pode ser degradada pela amiloglicosidase fazendo a liberação de glicose da dextrina oriunda do amido (SCIPIONE., 2011).

Figura 02: Hidrólise enzimática do Amido pelas enzimas amilolíticas



Fonte: (SCIPIONE., 2011, adaptado de Aehle.,2007)

Amilases apresentam grande importância biotecnológica tais como aplicações nas indústrias têxteis, papel e celulose, de couro, detergentes, cervejas, bebidas destiladas, panificação, cereais para alimentação infantil, liquefação e sacarificação do amido, ração animal, indústria química e farmacêutica (FERNANDES., 2007). Apesar de poderem ser derivadas de diversas fontes, incluindo plantas, animais e microrganismos, enzimas microbianas geralmente encontram grande demanda industrial. Atualmente, grandes quantidades de amilases microbianas estão disponíveis comercialmente e têm aplicação quase completa na hidrólise do amido em indústrias de processamento do amido (GUPTA, *et al.*, 2003; PANDEY *et al.*, 2005).

2.3 Celulose e Celulase

A celulose, o maior carboidrato sintetizado pelos vegetais, é um homopolissacarídeo compreendendo cerca de 8000 -12000 unidades de β -D-glucopiranoose, unidas entre si por ligações β -1,4 (TAO *et al.*, 2010), sendo a celobiose, o dissacarídeo 4-O- β -D-glucopiranosil-D-glucopiranoose, a unidade repetitiva do polímero (JIANG *et al.*, 2011). O ataque às fibras de celulose é realizado por intermédio das celulasas, que agem em sítios onde a estrutura do substrato é mais acessível, ou seja, onde a fibra perdeu seu aspecto reticulado (cristalino), em proveito de um aspecto mais frouxo e amorfo (BHAT., 2000).

As cadeias de celulose formam numerosas ligações de hidrogênio intra e intermolecular, o que conta para a formação de microfibrilas rígidas e insolúveis (BÉGUIN, AUBERT., 1994). Estas apresentam regiões com elevado grau de cristalinidade, com cadeias de glicana fortemente ligadas em paralelo. Estas regiões são denominadas regiões cristalinas. A celulose apresenta também regiões com menor grau de ordenação, denominadas regiões amorfas. Essas propriedades estruturais resultam em uma elevada resistência a hidrólise ácida ou enzimática (BON *et al.*, 2008), protegendo a célula vegetal contra a ação da pressão osmótica e estresses mecânicos (BÉGUIN, AUBERT., 1994).

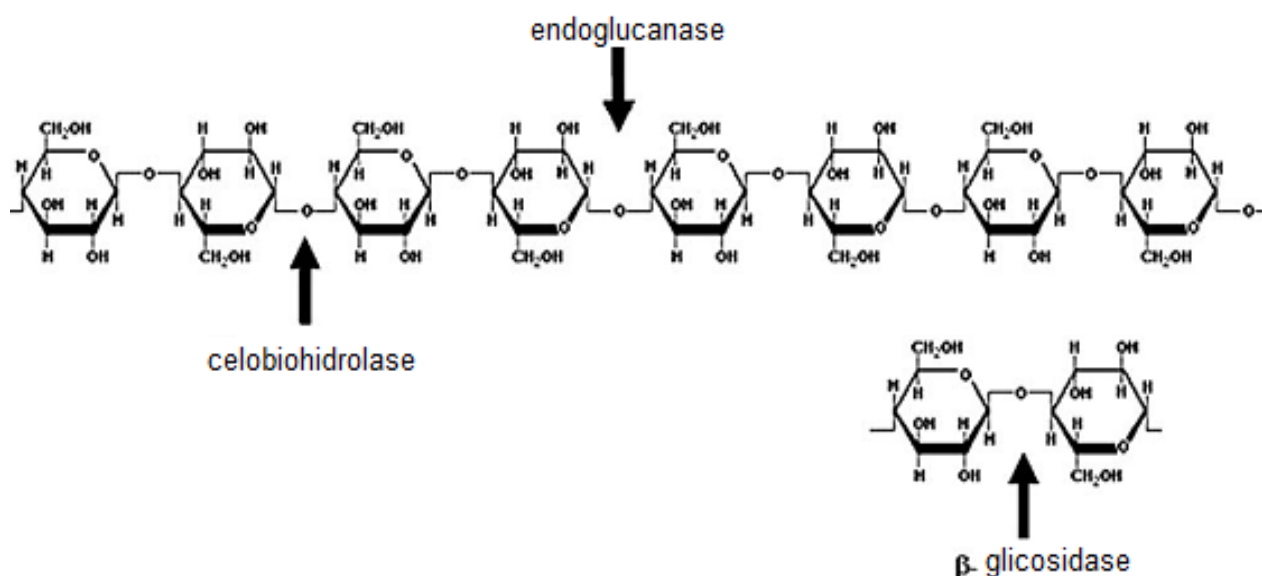
A decomposição da celulose parece depender da habilidade das enzimas responsáveis em penetrar entre as cadeias adjacentes da fibra. A hidrólise das fibras de celulose é realizada pelos microrganismos celulolíticos por intermédio das celulasas, que agem em sítios onde a estrutura do substrato é mais acessível, ou seja, onde a fibra perdeu seu aspecto cristalino, em proveito de um aspecto mais frouxo e amorfo (BAYER, LAMED., 1992; BÉGUIN, AUBERT., 1994).

O processo de hidrólise enzimática da celulose envolve a ação sinérgica de um complexo celulolítico, formado por endoglucanases, exoglucanases e β -D-glicosidases; porém, este processo apresenta alto custo e baixa produtividade (ZHANG *et al.*, 2006).

As endoglucanases ou carboximetilcelulasas hidrolisam aleatoriamente as cadeias de celulose e liberam celo-oligossacarídeos (JUHÁSZ *et al.*, 2005). Atuam somente na porção amorfa da celulose, sendo que sua atividade diminui com o encurtamento da cadeia de celulose. Seu substrato natural é a celulose e a xiloglicana (BHAT, BHAT., 1997; LYND *et al.*, 2002;

ZHANG *et al.*, 2006).

Figura 03: Estrutura molecular da celulose e os sítios de ação da endoglucanase, celobiohidrolase e β -glicosidase.



FONTE: KUMAR *et al.*, 2008.

As exoglucanases ou celobiohidrolases hidrolizam o polímero nos terminais não-redutores, liberando glicose ou celobiose como produtos 12 principais (ARISTIDOU, PENTTILÄ., 2000), este último, pode agir como fator de inibição das celobiohidrolases, necessitando da ação de outras enzimas do complexo celulolítico, as β -glicosidases (BON, GIRIO, PEREIRA JUNIOR., 2008).

As exoglucanases possuem ação limitada sobre substratos como o carboximetilcelulose (CMC) (SINGH, HAYASHI., 1995). As β -glicosidases são responsáveis pela hidrólise dos oligossacarídeos de cadeia curta e conversão da celobiose em glicose (JUHÁSZ *et al.*, 2005).

As celulasas têm sido investigadas principalmente no que diz respeito ao seu potencial como aditivos na indústria de detergentes, na indústria têxtil, e também na bioconversão de biomassa agrícola em produtos com valor comercial. Neste aspecto tem havido uma atenção crescente no que diz respeito a conversão de biomassa em etanol, considerado atualmente o combustível mais ambientalmente adequado como alternativa aos combustíveis fósseis (LIN, TANAKA., 2006)

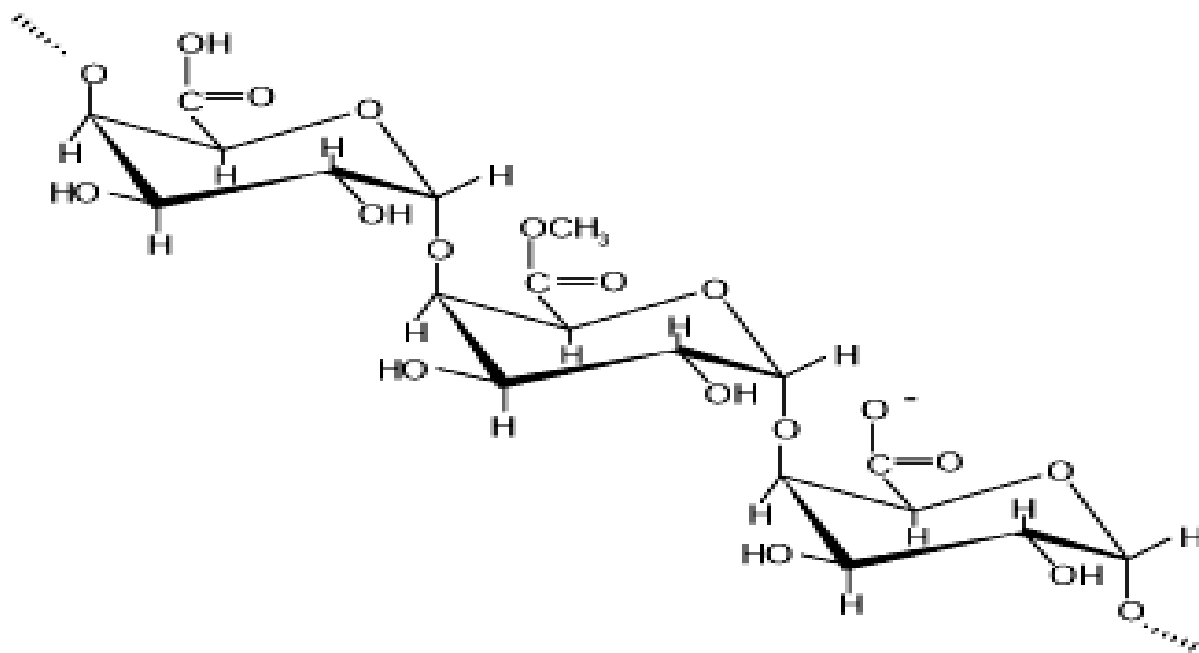
2.4 Pectina e Pectinase

A pectina ou substâncias pécticas refere-se a família de oligossacarídeos e polissacarídeos que contêm, predominantemente, resíduos de ácido galacturônico (GalA) ligados em α (1 $\rightarrow$ 4) (Figura 2) (CANTERI *et al.*, 2012; VORAGEN *et al.*, 2009). As pectinas são macromoléculas de alto peso molecular que compõem a lamela média, uma fina camada de material que possui função adesiva entre as paredes celulares dos vegetais superiores (UENOJO, PASTORE., 2007).

O teor de substâncias pécticas varia de acordo com o vegetal e com sua origem. Como exemplo de fonte dessas substâncias tem-se o bagaço de maçã, albedo cítrico (maracujá, laranja, entre outras), polpa de beterraba, sementes de girassol e muitos outros frutos (CANTERI *et al.*, 2012). Essas fontes de pectinas podem ser utilizadas como substrato para a produção de pectinases.

As enzimas pectinolíticas ou pectinases são um grupo de enzimas que catalisam a degradação de substâncias pécticas. No mercado mundial, as pectinases correspondem a 10% da produção enzimática total e são produzidas por muitos organismos como bactérias, fungos, leveduras, insetos, nematoides, protozoários e plantas (MUKESH KUMAR, 2012).

Figura 04: Estrutura Molecular da Pectina



Fonte: HOURDET & MULLER (1991).

As pectinases são divididas em três grandes grupos, essa divisão se baseia nos modos de ataque à molécula dos polímeros pécticos, o grupo das protopectinases diz respeito a enzimas que degradam protopectina insolúvel e dá origem a pectina polimerizada altamente solúvel; as esterases catalisam a desesterificação da pectina pela remoção do grupo metoxil das substâncias pécticas, formando ácido péctico; já as despolimerases catalisam a clivagem hidrolítica das ligações glicosídicas α -(1,4) entre os monômeros do ácido D-galacturônico de substâncias pécticas (JAYANI *et al.*, 2005).

As enzimas pectinolíticas têm diversas aplicações industriais, sendo uma das primeiras enzimas a serem empregadas comercialmente. Segundo UENOJO, PASTORE (2007) e SANTI *et al.* (2014) são bastante empregadas nas indústrias de sucos de frutas, onde as pectinases são adicionadas nos purês de frutas e vegetais para degradar a pectina e outros componentes de alto peso molecular, diminuindo a viscosidade e aumentando os rendimentos dos sucos, além de ocasionar uma aparência cristalina ao produto final e reduzir o tempo de filtração.

Na indústria de vinhos, as pectinases são utilizadas durante o esmagamento das uvas, com o objetivo de melhorar a extração do suco e reduzir o tempo de clarificação. Também são bastante empregadas na indústria têxtil para degradar a camada de pectina que recobre as fibras

de celulose, liberando-as para posterior processamento, no tratamento de resíduo líquido e na degomagem das fibras naturais; e por fim na ração animal, as pectinases, em conjunto com outras enzimas, tem a finalidade de reduzir a viscosidade do produto, propiciando o aumento da absorção e a liberação de nutrientes através da hidrólise das fibras não biodegradáveis e dos nutrientes bloqueados pelas fibras (UENOJO, PASTORE, 2007).

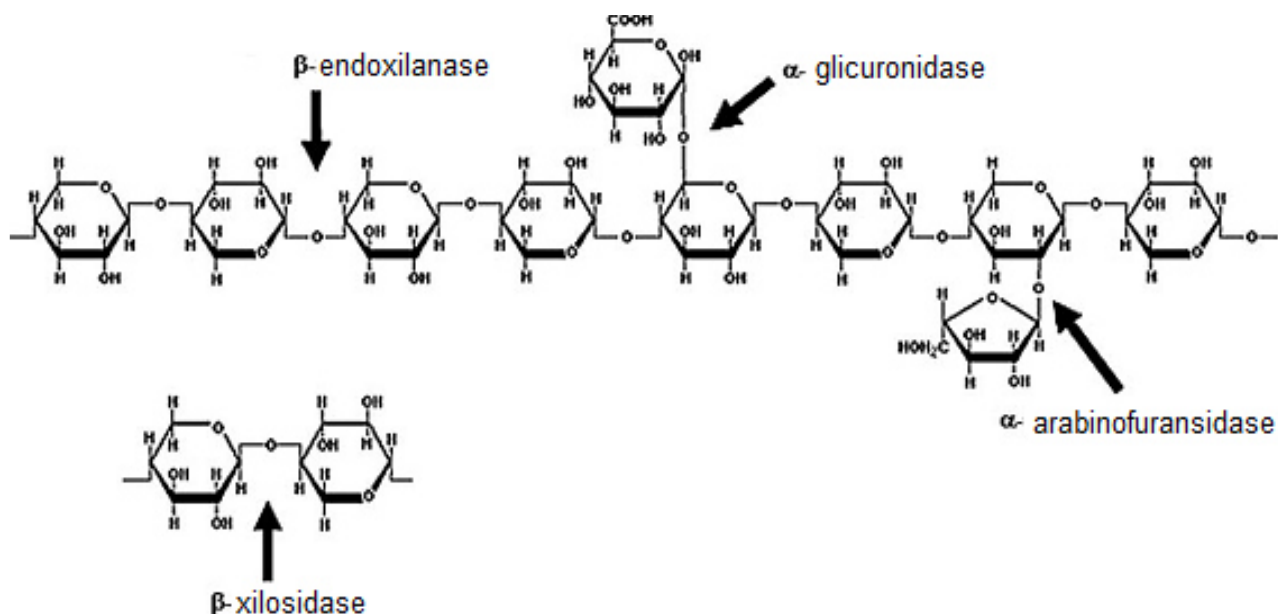
2.5 Xilana e Xilanase

A xilana é o polissacarídeo hemicelulósico mais comum, representando de 25–35% da biomassa lignocelulósica (KUMAR *et.al.*, 2008) A xilana é um polissacarídeo formado por unidades residuais de β -D-xilopiranosil integrados entre si por ligações α -1,4, sendo o principal componente hemicelulósico depositado durante a fase de diferenciação do xilema (FLORES *et al.*, 1997; GREGORY *et al.*, 1998; NASCIMENTO *et al.*, 2002).

Os constituintes mais comuns encontrados na cadeia principal da xilana são resíduos de acetil, arabinofuranosil e/ou glucuronil (SUNNA, ANTRANIKIAN, 1997). Baseado nos substituintes comuns encontrados na cadeia principal, as xilanas são categorizadas como homoxilana linear, arabinoxilana, glucuroxilana e glucuroarabinoxilana. Entretanto, em cada categoria delas existe uma heterogeneidade com respeito ao grau e natureza da ramificação. A cadeia principal da xilana está demonstrada na figura 05 (KULKARNI *et al.*, 1999).

Existem várias enzimas responsáveis pela degradação da hemicelulose. Na degradação da xilana, por exemplo, a β -1,4 endoxilanase, β -xilosidase, α -glucuronidase, α -L-arabinofuranosidase e acetilxilana esterase, todos atuam sobre os diferentes heteropolímeros disponíveis na natureza (KUMAR *et al.*, 2008).

Figura 05: Estrutura química da hemicelulose e as enzimas hidrolíticas envolvidas na sua degradação.



Fonte: KUMAR *et al.*, (2008).

A heterogeneidade e complexidade estrutural das xilanas resultam numa abundância de enzimas xilanolíticas com variações na especificidade, nas sequências primárias e tamanho, além das limitações destas enzimas pela especificidade ao substrato (COLLINS *et al.*, 2005). Dentre as enzimas do complexo enzimático destacamos as β-1,4-endoxilanasas (β-1,4-D-xilana xilanhidrolase; EC 3.2.1.8), que despolimerizam a xilana pela hidrólise randômica do esqueleto principal e as β-xilosidasas (β-1,4-D-xilosidase xilohidrolase; EC 3.2.1.37), que quebram pequenos oligossacarídeos. Os grupamentos laterais presentes na xilana são liberados pela ação das α-L-arabinofuranosidasas, α -glucuronidasas e acetilxilana esterases. Todas estas 13 enzimas agem cooperativamente, de modo a converter a xilana em seus açúcares constituintes figura 05. A presença de tais sistemas xilanolíticos multifuncionais é comum em bactérias e fungos (SUNNA, ANTRANIKIAN, 1997; BELFAQUIH, PENNINCKX, 2000; SUBRAMANIYAN, PREMA, 2002).

As β -1,4-endoxilanases podem ser encontradas tanto em vegetais como em microrganismos (NASCIMENTO *et al.*, 2003). A hidrólise enzimática de heteroxilanas vegetais envolve a ação de uma série de enzimas, na qual a β -1,4-endoxilanase é a enzima crucial para a despolimerização completa da xilana (BIELY *et al.*, 1992).

As xilanases que são responsáveis pela degradação das xilanas, utilizadas em indústrias de alimento e papel, para a fabricação de produtos dietéticos e clareamento de polpas de papel, respectivamente (STUTZENBERGER e BODINE, 1992; BRECCIA *et al.*, 1995).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Prospectar Actinobactérias com potencial biotecnológico enzimático.

3.2 Objetivos Específicos

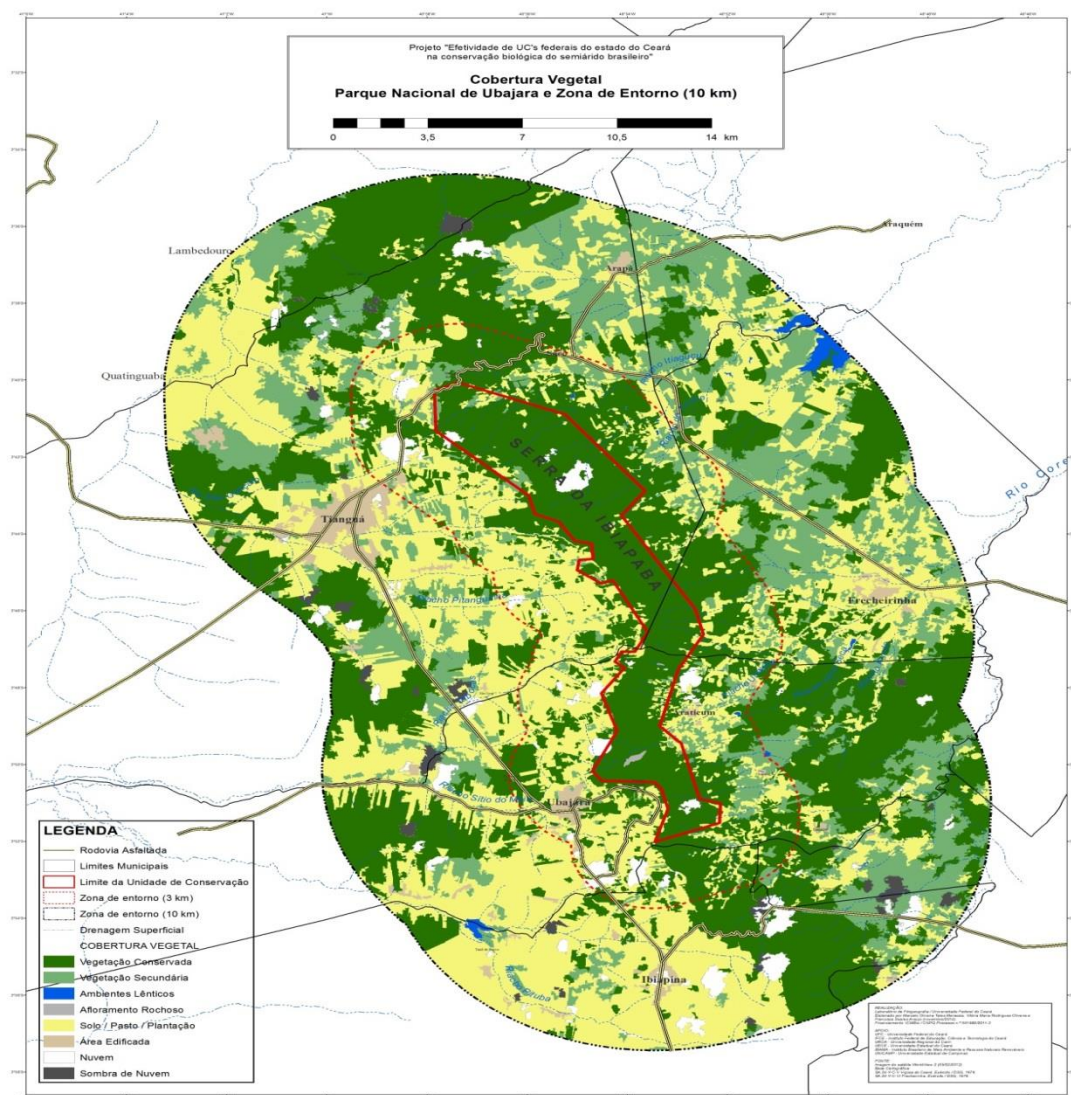
- Isolar cepas de Actinobactérias da Unidade de Conservação Parque Nacional de Ubajara;
- Caracterizar culturalmente estas cepas de actinobactérias;
- Caracterizar micromorfológicamente as cepas de actinobactérias;
- Identificar o Índice Enzimático das cepas de Actinobactérias.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local de Coleta

O estudo foi realizado no município de Ubajara (Ceará). As amostras de solo foram coletadas entre Abril de 2018 a Junho de 2018 na Unidade de Conservação do Parque Nacional de Ubajara e nas áreas de entorno da respectiva Unidade de Conservação. O Parque Nacional de Ubajara figura 6 contém aproximadamente 88,7% do seu interior de vegetação preservada, com apenas 1,9% de vegetação secundária. Fonte: Projeto CNPq/ICMBio/FAPS nº 18/2017. O Projeto possui autorização do ICMBio para realizar a coleta dos solos na Unidade de Conservação do Parque Nacional de Ubajara.

Figura 6 – Mapa do Parque Nacional de Ubajara (CE) considerando o tipo de cobertura vegetal.

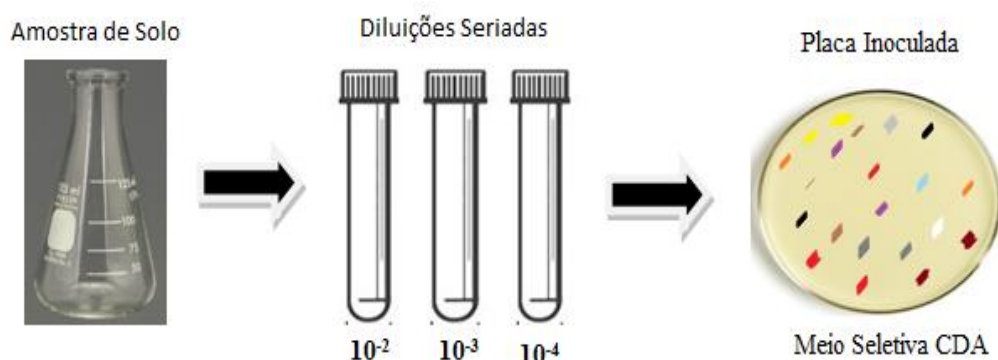


Fonte: Projeto ICMBIO "Efetividade de UC's federais do estado do Ceará na conservação biológica do semiárido brasileiro".

4.2 Preparo do Solo

Pesou-se 10g de solo das áreas preservadas, conservadas e secundárias aleatoriamente. Após a pesagem cada amostra foi colocada em Erlenmeyer contendo 90 mL de uma solução salina de 0,85% p/v (10^{-1}), previamente autoclavada. Essa mistura foi agitada por 30 minutos e após esse período foram preparadas as diluições seriadas: 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} (Figura 7)

Figura 7 - Representação do preparo do solo, diluições seriadas e a inoculação em placa de Petri.



Fonte: Elaborado pelo Autor.

4.3 Isolamento de Actinobactérias

As actinobactérias foram isoladas do solo através da técnica spread plate, utilizando o meio caseína dextrose ágar (CDA) e o resultado expresso em UFC.mL^{-1} , para determinar a diversidade em cada área.

Alíquotas de 1 mL de cada diluição foram espalhadas em placas de Petri contendo o meio Caseína Dextrose Agar (CDA). As placas foram incubadas em B.O.D, 28°C , por sete dias. Após esse período foi realizado uma triagem nas placas com alta diversidade de actinobactérias, selecionando apenas uma colônia, por vez, dentre várias colônias, com a finalidade de isolar as bactérias de interesse. Estas novas placas foram incubadas em B.O.D., 28°C , por 14 dias. Após esse período 39 colônias foram isoladas analisando aspectos diferentes.

As colônias isoladas foram codificadas de acordo com o local de coleta e com o número de isolados em ordem crescente: UBJ 01, UBJ 02, UBJ 04, UBJ 05, UBJ 06, UBJ 07, UBJ 08, UBJ 09, UBJ 10, UBJ 11, UBJ 13, UBJ 14, UBJ 15, UBJ 16, UBJ 17, UBJ 18, UBJ 20, UBJ 21, UBJ 22, UBJ 23, UBJ 24, UBJ 25, UBJ 26, UBJ 27, UBJ 28, UBJ 29, UBJ 30, UBJ 31, UBJ 32, UBJ 33, UBJ 34, UBJ 35, UBJ 36, UBJ 37, UBJ 38, UBJ 39, UBJ 40, UBJ 41 e UBJ 42. As possíveis cepas UBJ 03, UBJ 12 e UBJ 19 foram descartadas devido as análises de caracterização cultural mostrarem que estes isolados na realidade eram fungos. Os isolados

foram mantidos em caldo caseína dextrose (CD), a 25°C no Laboratório de Microbiologia Ambiental (LAMAB) do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará.

4.4 Meio de Cultivo dos Isolados

As cepas foram cultivadas em meio CDA: 0,5 g de K_2HPO_4 (fosfato de potássio), 0,2 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (sulfato de magnésio), 2 g de glicose, 0,01g de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (sulfato de ferro), 0,2 g de caseína (dissolvida em 10 mL de NaOH 0,1 N anteriormente), 15 g de ágar, 10 mL NaOH e 2,5 mL de nistatina (antifúngico), concentrações para 1000 mL (pH 6,5).

4.5 Caracterização Cultural

Os isolados foram inoculados em placas de Petri através da técnica de estriamento contendo o meio CDA e assim realizou-se a caracterização cultural. As cores do micélio aéreo e reverso foram descritas tendo como referência a cartela de cores (WINK, 2012), no padrão de cores (RAL color charts). A presença ou ausência de pigmentos difusivos foi avaliado a partir destas mesmas placas. Aqui analisou-se a presença de pigmentos difusivos no meio, levando em consideração a alteração total da cor do meio de cultura, após inoculação das bactérias e seu crescimento (AMAL *et al.*, 2011, adaptado com troca do meio de cultura).

4.6 Análise Micromorfológica

A análise micromorfológica foi realizada segundo a técnica de (KERN; BLEVINS 1999) adaptada. Foram utilizadas placas de Petri esterilizadas, contendo em seu interior uma lâmina e um pedaço de algodão umedecido, com água destilada. Uma fração de meio de cultura CDA foi cortada em forma cilíndrica e colocada sobre a lâmina contida no interior da placa. As cepas foram inoculadas nas laterais da fração de meio e no centro de cada meio fracionado, onde as duas frações de meio foram cobertas por uma lamínula esterilizada em cada fração de meio. Por fim, foi colocado algodão umedecido na placa e adicionou-se uma lamínula em cada uma das duas inoculação das placas, onde esta foi fechada e incubada em estufa B.O.D por 10 dias, a 28°C. Após esse tempo, a lamínula foi retirada e colocada sobre outra lâmina limpa contendo uma gota do corante Lactofenol de Amann, sendo as bordas vedadas com esmalte incolor. As lâminas preparadas foram observadas sob um microscópio de luz Zeiss a uma ampliação de 100x.

4.7. Atividade Enzimática

A atividade enzimática foi analisada através do Índice Enzimático (IE) medida de característica semi-quantitativa que fornece a quantidade de enzima secretada pela bactéria difundida no meio, isto, através da divisão ($IE = Dh/Dc$). Sendo Dh o diâmetro em mm do halo de hidrólise e Dc o diâmetro em mm da colônia das actinobactérias (STAMFORD *et al.*, 1998). As bactérias foram divididas em 3 grupos em relação ao (IE): Cepas fortemente produtoras com ($IE \geq 2$), cepas moderadamente produtoras com ($1,5 \leq I.E < 2,0$), cepas fracamente produtoras com ($1,0 \leq IE < 1,5$), como sugere (SILVA, 2015). Levando em consideração as 4 enzimas testadas neste trabalho de prospecção. As cepas foram testadas em duplicatas e houve um terceiro teste para as cepas que estavam com divergência nos dados.

4.7.1 Atividade Amilolítica

A atividade amilolítica foi realizada segundo (ALARIYA *et al*, 2013). As 39 cepas de Actinobactérias foram inoculadas na forma de spots e em quadruplicata no meio de cultura ágar-amido de acordo com a composição por litro a seguir: Peptona (10g), extrato de carne (3,0g), NaCl (5,0g), amido solúvel (2,0g), ágar (15g) e pH 6,5. Depois disto, as culturas foram incubadas em câmara de crescimento B.O.D a $\pm 28^\circ \text{C}$ por 10 dias. Após este período, adicionou-se 10 mL de solução lugol (solução com 1g de Iodo, 2g de Iodeto de Potássio em 300 mL de água destilada), nas placas. A presença da enzima amilase foi detectada pela descoloração do meio em torno da colônia, devido à ação catalítica da enzima em seu substrato.

4.7.2 Atividade Celulolítica

As cepas de actinobactérias foram inoculadas na forma de spots e em quadruplicata, no meio de cultivo descrito por (COURI; FARIAS., 1995) de acordo com a composição por litro a seguir: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,5 g), KCl (0,5g), Carboximetilcelulose (5,0g previamente dissolvido, overnight, em água destilada), ágar (15g) e pH 6,0. Depois disto, as culturas foram incubadas em câmara de crescimento B.O.D a $\pm 28^\circ \text{C}$ por 10 dias. Após a incubação, foram adicionados 10 mL de solução vermelho congo a 0,5% em cada placa, deixando agir por 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, o excesso da solução foi drenado e 10 mL de solução NaCl (2M) foi adicionado em cada placa, deixando agir por 30 minutos a temperatura ambiente. Terminado o tempo, remove-se o excesso da solução salina e observou-se zonas de hidrólise em torno das colônias (Hankin; Anagnostakis., 1977).

4.7.3 Atividade Pectinolítica

A atividade pectinolítica foi verificada através da inoculação das actinobactérias, previamente isoladas, em placa de Petri estéreis contendo meio TSA (Tryptona Soja Ágar) composto de: Tryptona (1,5g); Peptona de Soja (0,5g); NaCl (1,5g); ágar (15g) em 1000 mL de água destilada e pH 7,3, suplementado com 1% de pectina cítrica. O meio foi autoclavado a 121° C por 15 minutos e logo após vertido em placas de Petri estéreis. As placas foram divididas em quatro quadrante onde as cepas foram inoculadas em spots e em quadruplicatas e incubadas em câmara de crescimento B.O.D a $\pm 28^{\circ}$ C por 10 dias. A análise da atividade pectinolítica foi feita utilizando 10 mL de lugol (solução com 1g de Iodo, 2g de Iodeto de Potássio em 300 mL de água destilada), onde observou-se o aparecimento do halo de hidrólise das colônias (MINOTTO *et al.*, 2014).

4.7.4 Atividade Xilanolítica

A atividade pectinolítica foi verificada através da inoculação das actinobactérias, previamente isoladas, em placa de Petri estéreis, na forma de spots e em quadruplicata em meio de cultivo mínimo de sais com a composição a seguir por litro: NaNO_3 (0,5 g), K_2HPO_4 (1 g), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,5 g), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,01 g), extrato de levedura (1 g), ágar (15 g) suplementado com 1 g de xilana e pH 6,0 conforme (KUMAR *et al.*, 2012). Depois disto, as culturas foram incubadas em câmara de crescimento B.O.D a $\pm 28^{\circ}$ C por 10 dias. Após a incubação, foram adicionados 10 mL de solução vermelho congo a 0,5% em cada placa, deixando agir por 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, o excesso da solução foi drenado e 10 mL de solução NaCl (2M) foi adicionado em cada placa, deixando agir por 30 minutos a temperatura ambiente. Terminado o tempo, drena-se o excesso da solução salina e observa-se zonas de hidrólise em torno das colônias (HANKIN, ANAGNOSTAKIS., 1977).

4.8 Análise de Dados

Os dados quantitativos, obtidos a partir dos índices enzimáticos foram submetidos ao teste de normalidade e posteriormente submetidos a análise de variância, seguido do teste de Tukey ($p < 0,05$), utilizando-se o Programa (PAST). As análises de variância consideraram as diferenças de IE entre as cepas de cada enzima estudada.

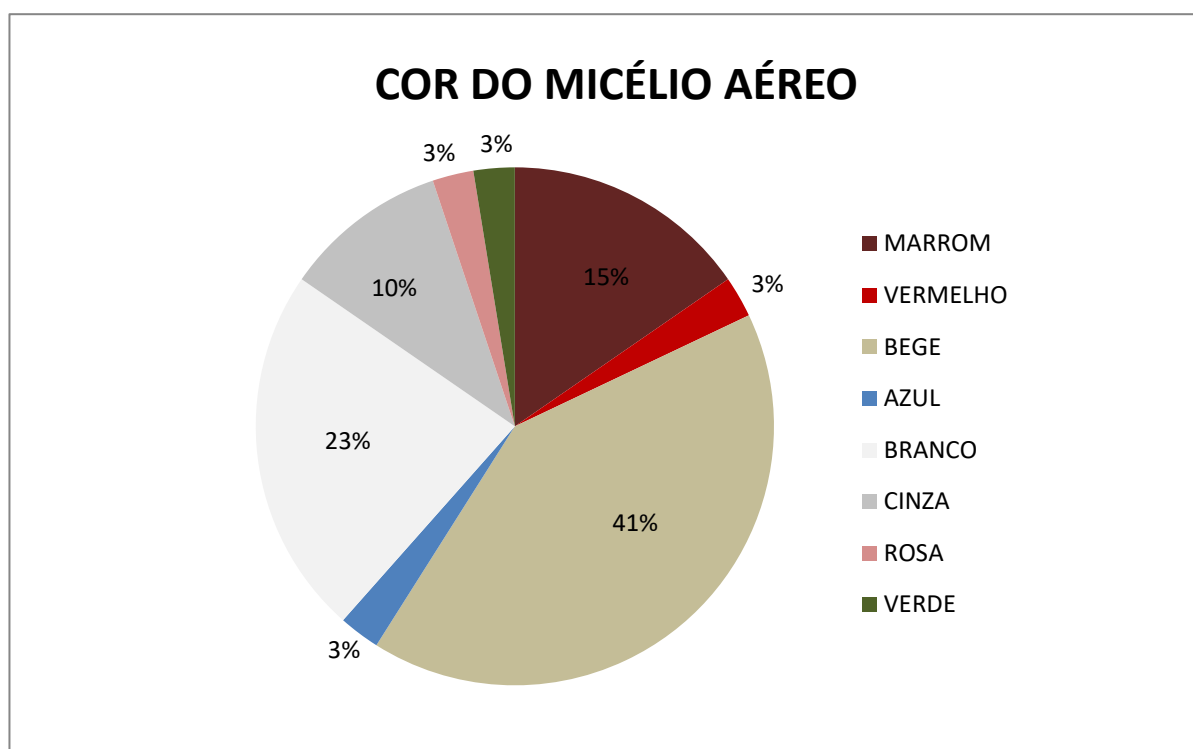
Os dados qualitativos obtidos a partir da caracterização cultural e micromorfológica foram convertidos em uma matriz binária que foi utilizada para elaboração de um dendrograma de similaridade que permitiu o agrupamento de cepas semelhantes. Adotou-se o algoritmo UPGMA (unweighted pair-group method) e coeficiente de Jaccard.

5. RESULTADOS

5.1 Micélio Aéreo

A observação do micélio aéreo das cepas isoladas da Unidade de Conservação do Parque Nacional de Ubajara (CE) tornou possível identificar a presença de um total de oito cores (Figura 8). As cores identificadas foram: bege, cinza, marrom, rosa, vermelho, azul, branco e verde.

Figura 8- Percentual das cores observadas no micélio aéreo das cepas de actinobactérias isoladas de amostras de solo da Unidade de Conservação do Parque Nacional de Ubajara (Ce).

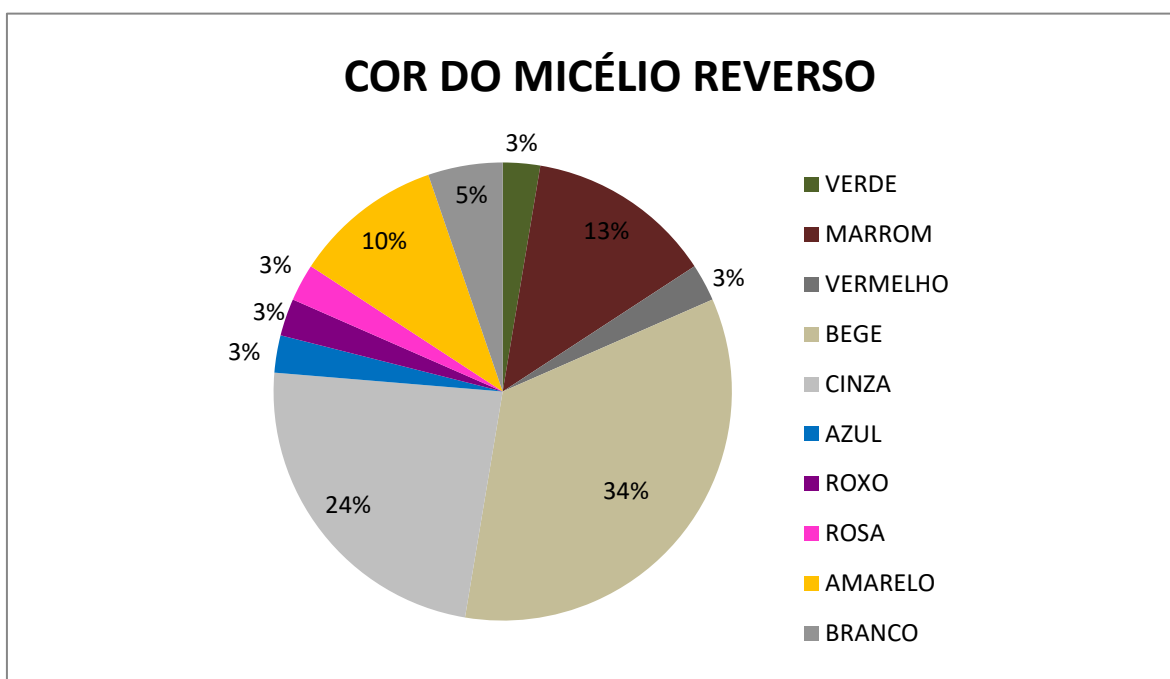


Fonte: o autor

5.2 Micélio Reverso

A observação do micélio reverso das cepas isoladas da Unidade de Conservação do Parque Nacional de Ubajara (CE) tornou possível identificar um total de dez cores (Figura 9). As cores identificadas foram: amarela, bege, cinza, azul, marrom, rosa, roxa, branca, vermelho e verde.

Figura 9- Percentual das cores observadas no micélio reverso das cepas de actinobactérias isoladas de amostras de solo da Unidade de Conservação do Parque Nacional de Ubajara (Ce).

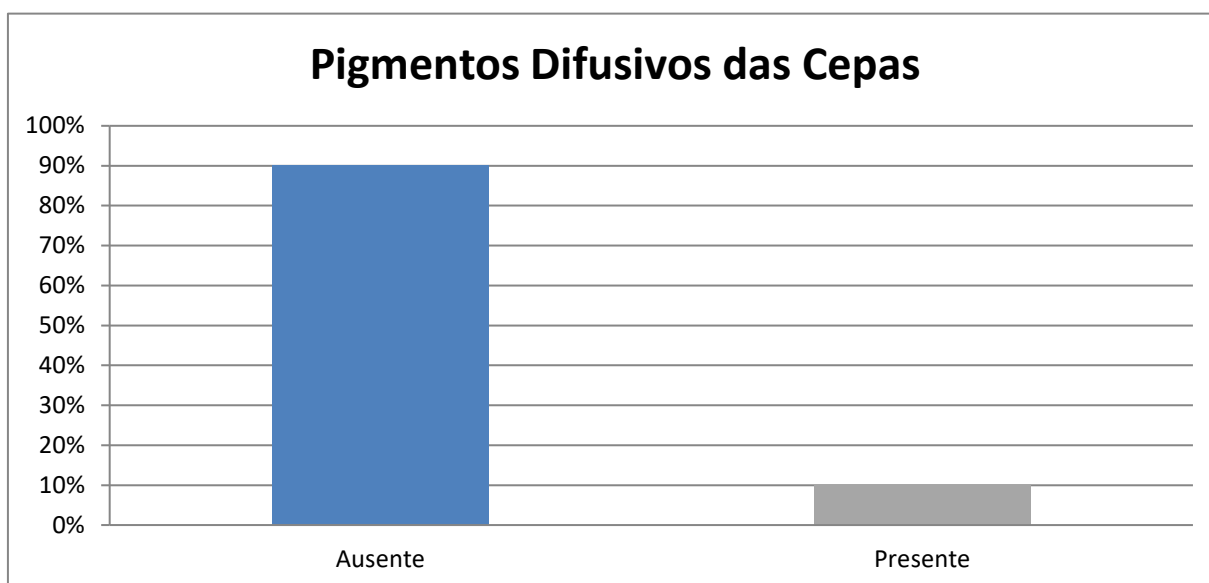


Fonte: Elaborado pelo Autor.

5.3 Pigmentos Difusivos

A análise dos pigmentos difusivos mostrou que 10 % das cepas isoladas apresentaram a presença de pigmento difusivo no meio, os representantes deste dado são: UBJ 02, UBJ 08, UBJ 14 e UBJ 18, em contrapartida 90 % das cepas isoladas apresentaram a ausência de pigmentos difusivos.

Figura 10 – Presença ou ausência de pigmentos difusivos das cepas de actinobactérias isoladas de amostras de solo da Unidade de Conservação do Parque Nacional de Ubajara (Ce).

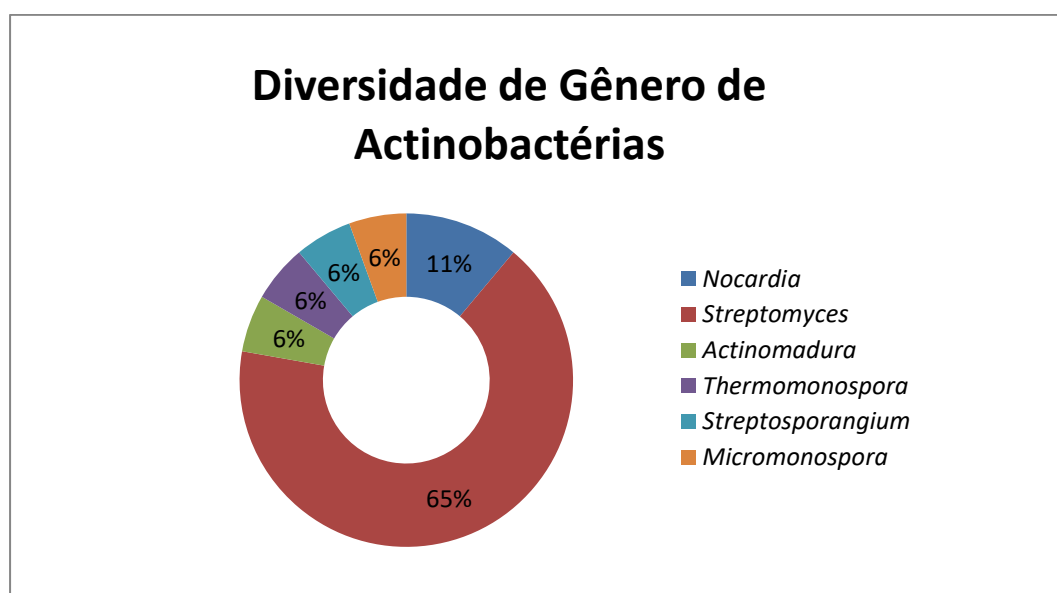


Fonte: Elaborado pelo Autor.

5.4 Microcultivo

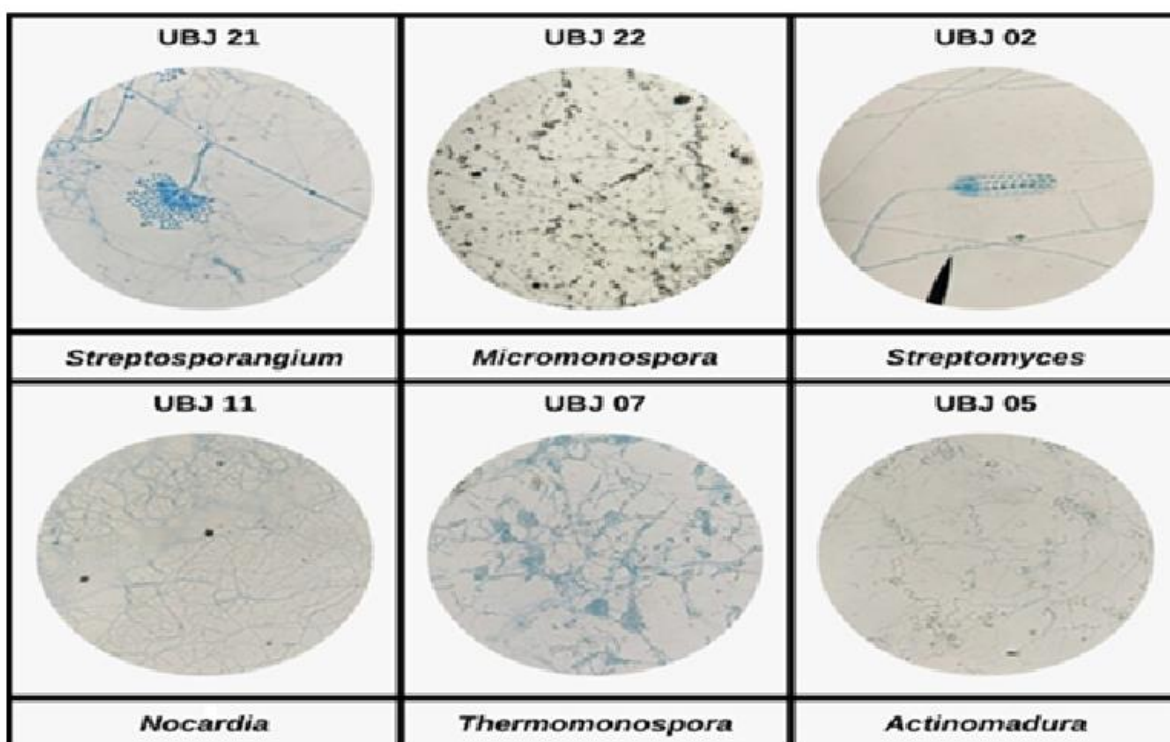
A análise micromorfológica realizada pela observação da cadeia de esporos permitiu identificar seis gêneros diferentes (Figura 10), *Streptomyces* (65%), *Nocardia* (11%), *Micromonospora* (6%), *Streptosporangium* (6%), *Actinomadura* (6%) e *Thermomonospora* (6%).

Figura 11 – Diversidade de gêneros das cepas de actinobactérias isoladas de amostras de solo da Unidade de Conservação do Parque Nacional de Ubajara (Ce).



Fonte: o autor.

Figura 12 – Morfologia da cadeia de esporos e identificação a nível de gênero.



Fonte: Elaborado pelo Autor.

5.5 Dendrograma de Similaridade

Utilizando-se os dados obtidos foi gerado um dendrograma de similaridade (Figura 13), onde a partir de 61% de similaridade já apresenta-se o seguinte agrupamento: 25 grupos, onde, 19 são compostos por cepas isoladas, que apresentam características únicas. Os outros 6 grupos agrupam 20 cepas, distribuídas em 2 grupos com 2 cepas, 2 grupos contendo 3 cepas e 1 composto por 4 cepas e o último grupo com 6 cepas (UBJ 25, UBJ 28, UBJ 30, UBJ 32, UBJ 34 e UBJ 37) sendo o maior grupo formado, onde todas cepas que o constituem possuem as seguintes características: Gênero *Streptomyces* com micélio aéreo e reverso na cor bege e bege respectivamente e que não produzem pigmentos difusivos. Estas cepas representam 15,4 % das bactérias isoladas deste trabalho.

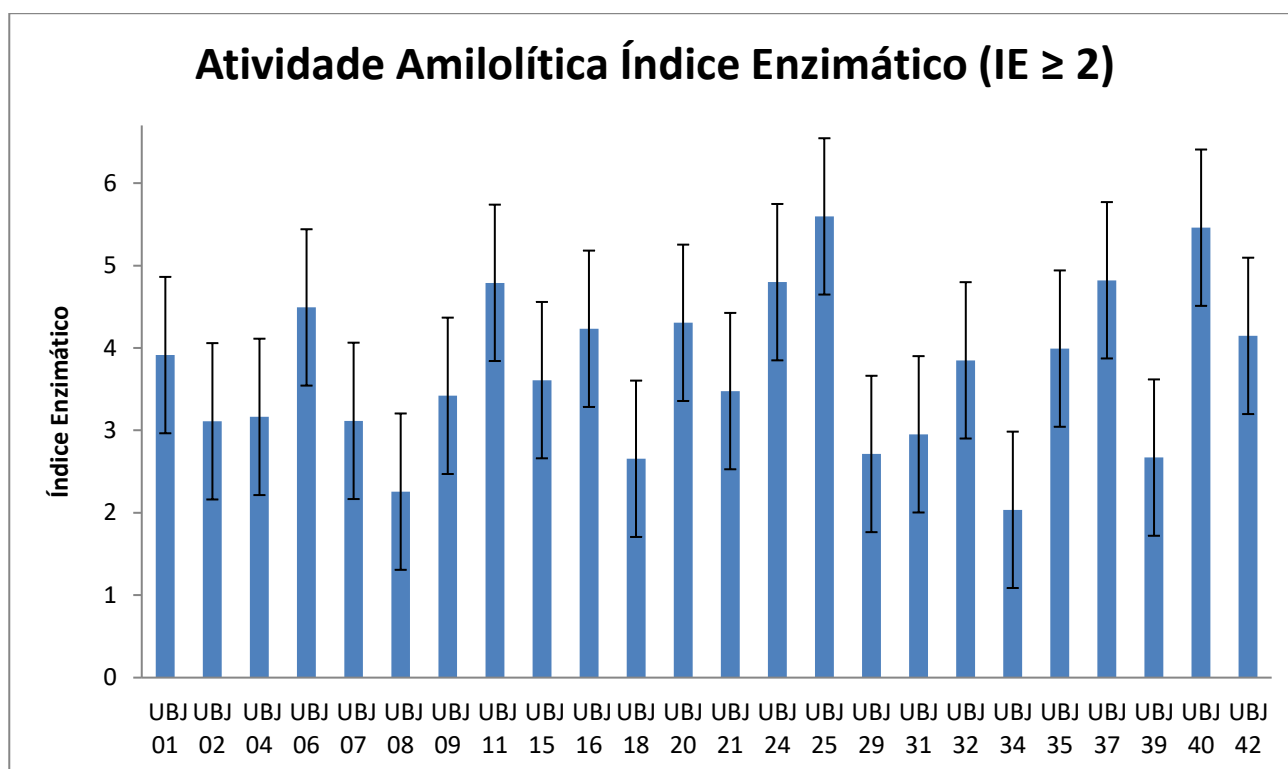
5.6 Atividade Enzimática

Todos os IE apresentaram diferenças estatísticas significativas entre si. O teste de Shapiro-Wilk apontou para dados não normais, entretanto, a partir do teorema do limite central, pode-se afirmar que os dados são sim normais, visto que, o teorema esclarece que para amostras com tamanho $n > 50$ a distribuição das médias amostrais pode ser aproximada satisfatoriamente por uma distribuição normal (FREIRE, 2017). A partir dos IE de cada cepa nos quatro substratos/enzimas estudados, criaram-se gráficos em barras, a fim de transparecer as cepas de acordo com o seguinte critério: Cepas Fortemente Produtoras com ($IE \geq 2$), Cepas Moderadamente Produtoras com ($1,5 \leq IE < 2,0$), Cepas Fracamente Produtoras com ($1,0 \leq IE < 1,5$).

5.7 Atividade Amilolítica

Com base nas análises feitas sobre a atividade amilolítica (IE's médios) das bactérias (Figura 14), as seguintes cepas foram classificadas como Fortemente Produtoras ($IE \geq 2$): UBJ 01, UBJ 02, UBJ 04, UBJ 06, UBJ 07, UBJ 08, UBJ 09, UBJ 11, UBJ 15, UBJ 16, UBJ 18, UBJ 20, UBJ 21, UBJ 24, UBJ 25, UBJ 29, UBJ 31, UBJ 32, UBJ 34, UBJ 35, UBJ 37, UBJ 39, UBJ 40 e UBJ 42. Isso representa 61,5% das bactérias isoladas deste estudo que obtiveram atividade amilolítica e são classificados como Fortemente Produtoras de Amilases.

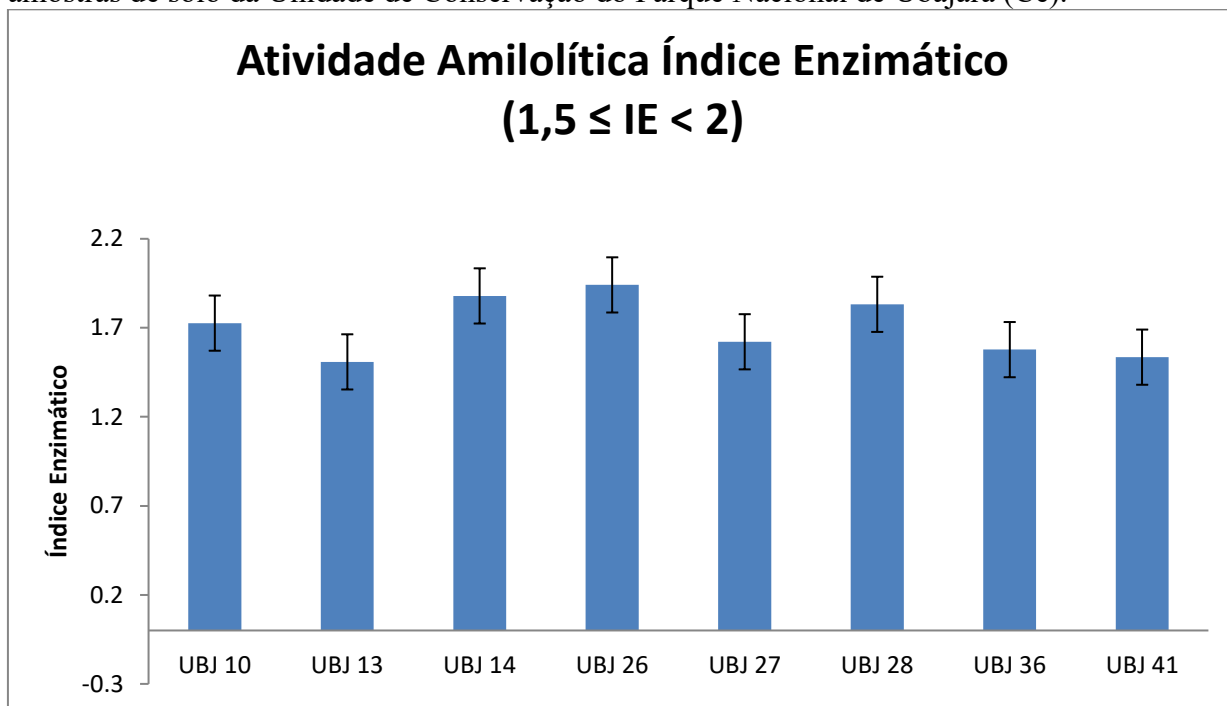
Figura 14 – Atividade amilolítica ($IE \geq 2$) das cepas de actinobactérias isoladas de amostras de solo da Unidade de Conservação do Parque Nacional de Ubajara (Ce).



Fonte: Elaborado pelo Autor.

Com base nas análises feitas sobre a atividade amilolítica (IE's médios) das actinobactérias (Figura 15), as seguintes cepas foram classificadas como Moderadamente Produtoras ($1,5 \leq IE < 2$): UBJ 10, UBJ 13, UBJ 14, UBJ 26, UBJ 27, UBJ 28, UBJ 36 e UBJ 41. Isso representa 20,5% das bactérias isoladas deste estudo, estas actinobactérias são classificadas como Moderadamente Produtoras de Amilases.

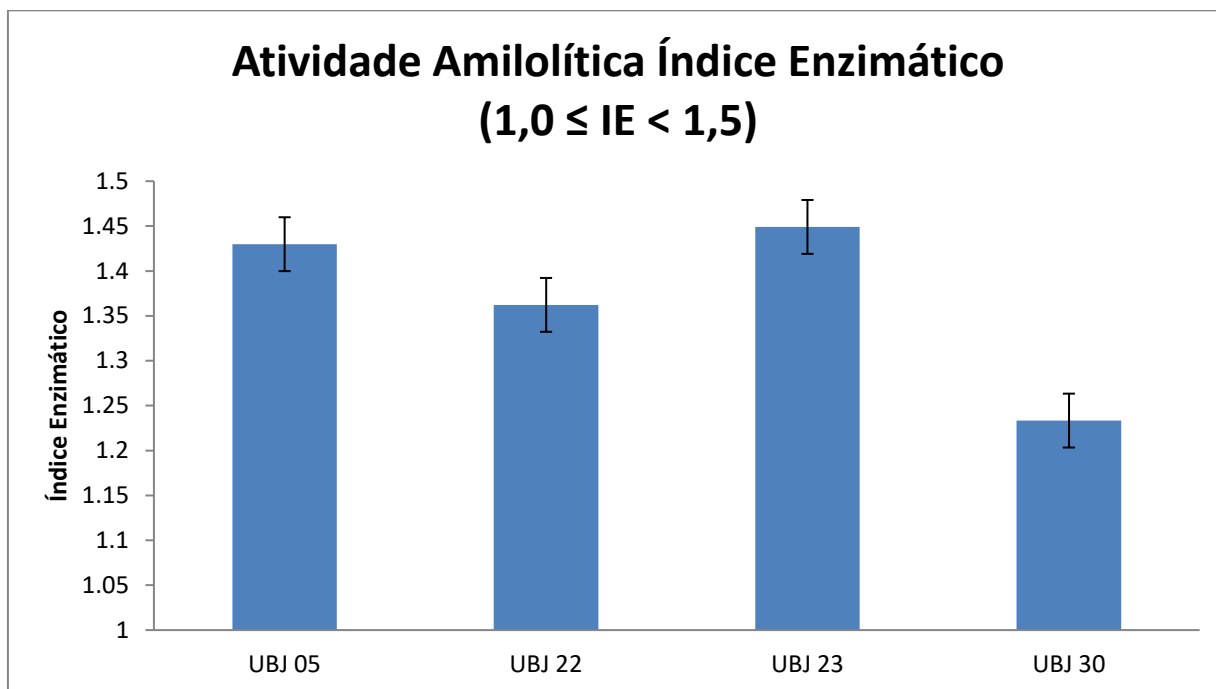
Figura 15 – Atividade amilolítica ($1,5 \leq IE < 2$) das cepas de actinobactérias isoladas de amostras de solo da Unidade de Conservação do Parque Nacional de Ubajara (Ce).



Fonte: Elaborado pelo Autor.

Com base nas análises feitas sobre a atividade amilolítica (IE's médios) das actinobactérias (Figura 16), as seguintes cepas foram classificadas como Fracamente Produtoras ($1,0 \leq IE < 1,5$): UBJ 05, UBJ 22, UBJ 23 e UBJ 30. Isso representa 10,3% das bactérias isoladas deste estudo, estas Actinobactérias são classificadas como Fracamente Produtoras de Amilases.

Figura 16 – Atividade amilolítica ($1,0 \leq IE < 1,5$) das cepas de actinobactérias isoladas de amostras de solo da Unidade de Conservação do Parque Nacional de Ubajara (Ce).



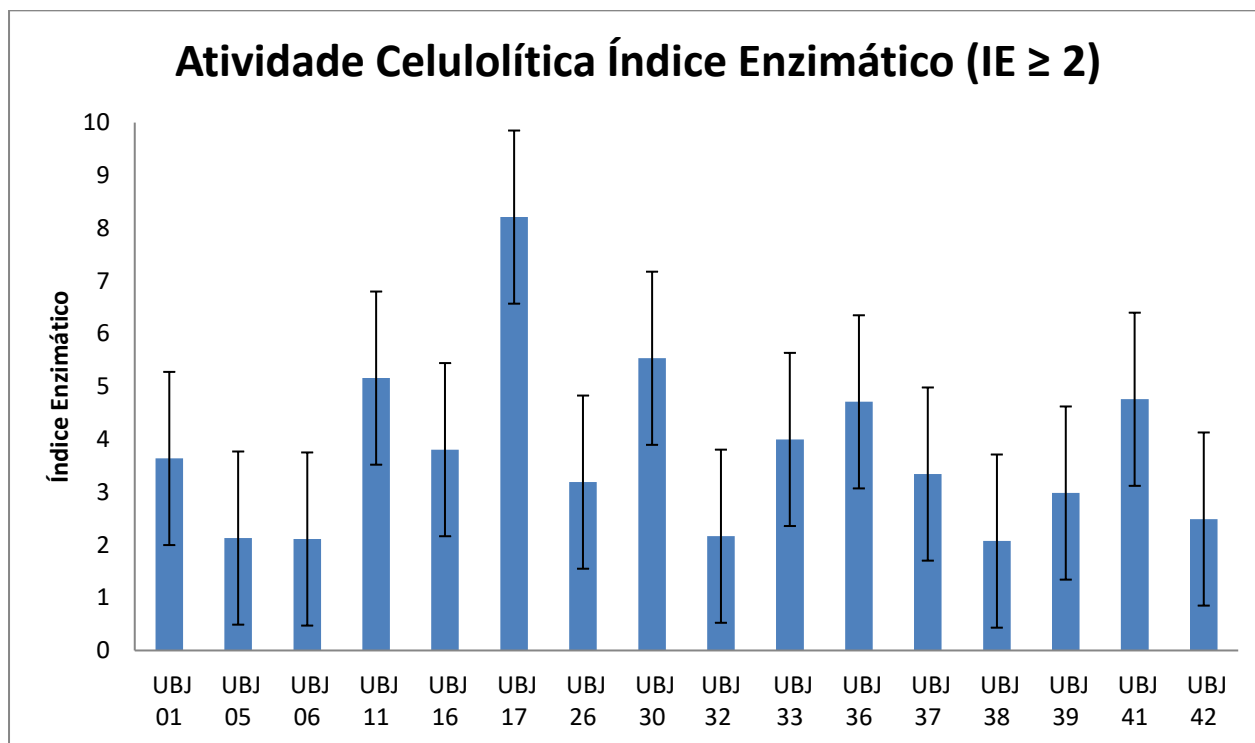
Fonte: Elaborado pelo Autor

Vale ressaltar que as cepas: UBJ 17, UBJ 33 e UBJ 38 não mostraram produção de halo e/ou crescimento de colônia, e por isto não tinham dados para o cálculo dos Índices Enzimáticos Médios, estas cepas representam 7,7 % das actinobactérias isoladas deste trabalho. Isto mostra que as cepas ou não são degradadoras do amido ou não cresceram no meio.

5.8 Atividade Celulolítica

Com base nas análises feitas sobre a atividade celulolítica (IE's médios) das actinobactérias (Figura 17), as seguintes cepas foram classificadas como Fortemente Produtoras ($IE \geq 2$): UBJ 01, UBJ 05, UBJ 06, UBJ 11, UBJ 16, UBJ 17, UBJ 26, UBJ 30, UBJ 32, UBJ 33, UBJ 36, UBJ 37, UBJ 38, UBJ 39, UBJ 41 e UBJ 42. Isso representa 41% das bactérias isoladas deste estudo, estas Actinobactérias, então, são classificadas como Fortemente Produtoras de Celulase.

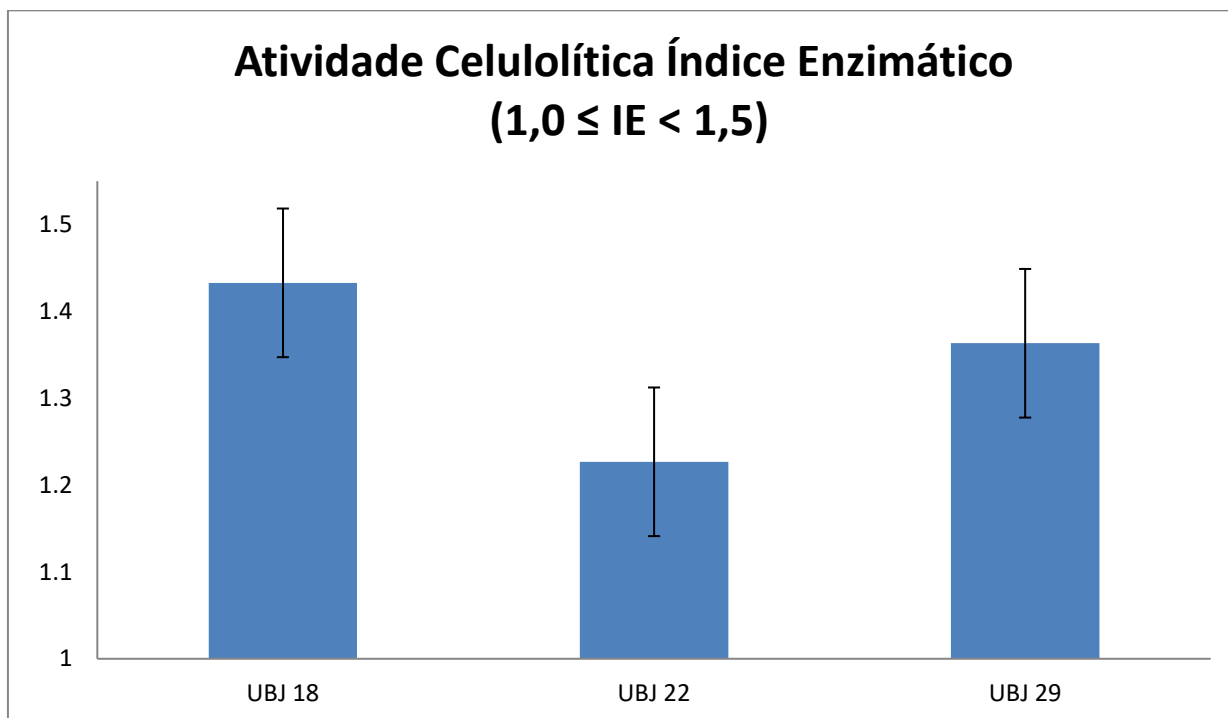
Figura 17 – Atividade celulolítica ($IE \geq 2$) das cepas de actinobactérias isoladas de amostras de solo da Unidade de Conservação do Parque Nacional de Ubajara (Ce).



Fonte: Elaborado pelo Autor.

Com base nas análises feitas sobre a atividade celulolítica (IE's médios) das actinobactérias (Figura 18), as seguintes cepas foram classificadas como Fracamente Produtoras ($1,0 \leq IE < 1,5$): UBJ 18, UBJ 22 e UBJ 29. Isso representa 7,7% das bactérias isoladas deste estudo, estas Actinobactérias, então, são classificadas como Fracamente Produtoras de Celulase.

Figura 18 – Atividade celulolítica ($1,0 \leq IE < 1,5$) das cepas de actinobactérias isoladas de amostras de solo da Unidade de Conservação do Parque Nacional de Ubajara (Ce).



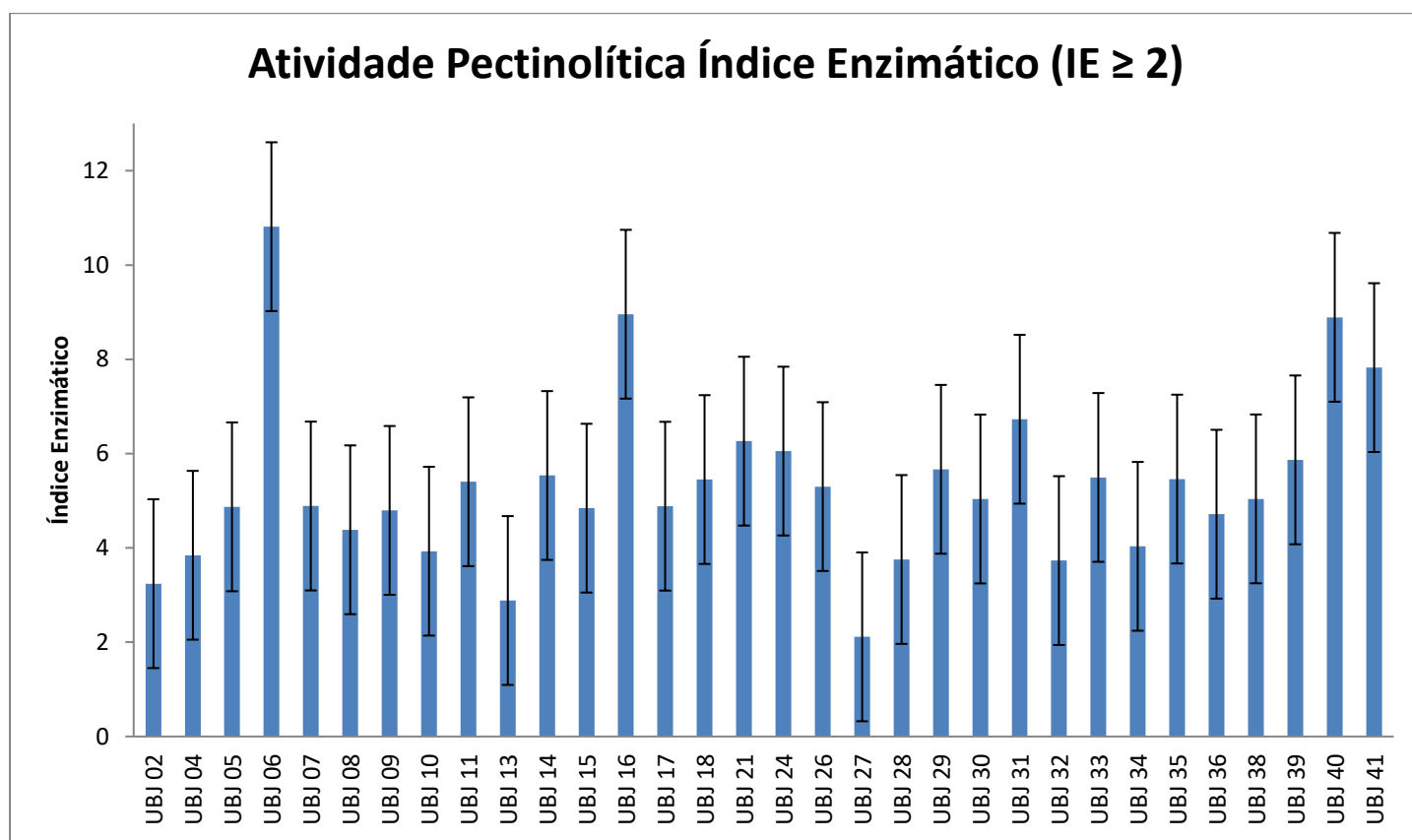
Fonte: Elaborado pelo Autor.

Não houve representantes de Actinobactérias deste teste enzimático classificadas como Moderadamente Produtoras ($1,5 \leq IE < 2$). As cepas: UBJ 02, UBJ 04, UBJ 07, UBJ 08, UBJ 09, UBJ 10, UBJ 13, UBJ 14, UBJ 15, UBJ 20, UBJ 21, UBJ 23, UBJ 24, UBJ 25, UBJ 27, UBJ 28, UBJ 31, UBJ 34, UBJ 35 e UBJ 40 não mostraram produção de halo e/ou crescimento de colônia, dessa forma não foi determinado o índice enzimático médio, estas cepas representam 51,3% das Actinobactérias isoladas deste trabalho. Isto mostra que as cepas ou não são degradadoras da celulose ou não cresceram no meio do teste enzimático.

5.9 Atividade Pectinolítica

Com base nas análises feitas sobre a Atividade Pectinolítica (IE's médios) das actinobactérias (Figura 19), as seguintes cepas foram classificadas como Fortemente Produtoras ($IE \geq 2$): UBJ 02, UBJ 04, UBJ 05, UBJ 06, UBJ 07, UBJ 08, UBJ 09, UBJ 10, UBJ 13, UBJ 14, UBJ 15, UBJ 16, UBJ 17, UBJ 18, UBJ 21, UBJ 24, UBJ 26, UBJ 27, UBJ 28, UBJ 29, UBJ 30, UBJ 31, UBJ 32, UBJ 33, UBJ 34, UBJ 35, UBJ 36, UBJ 38, UBJ 39, UBJ 40 e UNJ 41. Isso representa 79,5 % das bactérias isoladas deste estudo, estas Actinobactérias, então, são classificadas como Fortemente Produtoras de Pectinase.

Figura 19 – Atividade pectinolítica ($IE \geq 2$) das cepas de actinobactérias isoladas de amostras de solo da Unidade de Conservação do Parque Nacional de Ubajara (Ce).



Fonte: o autor.

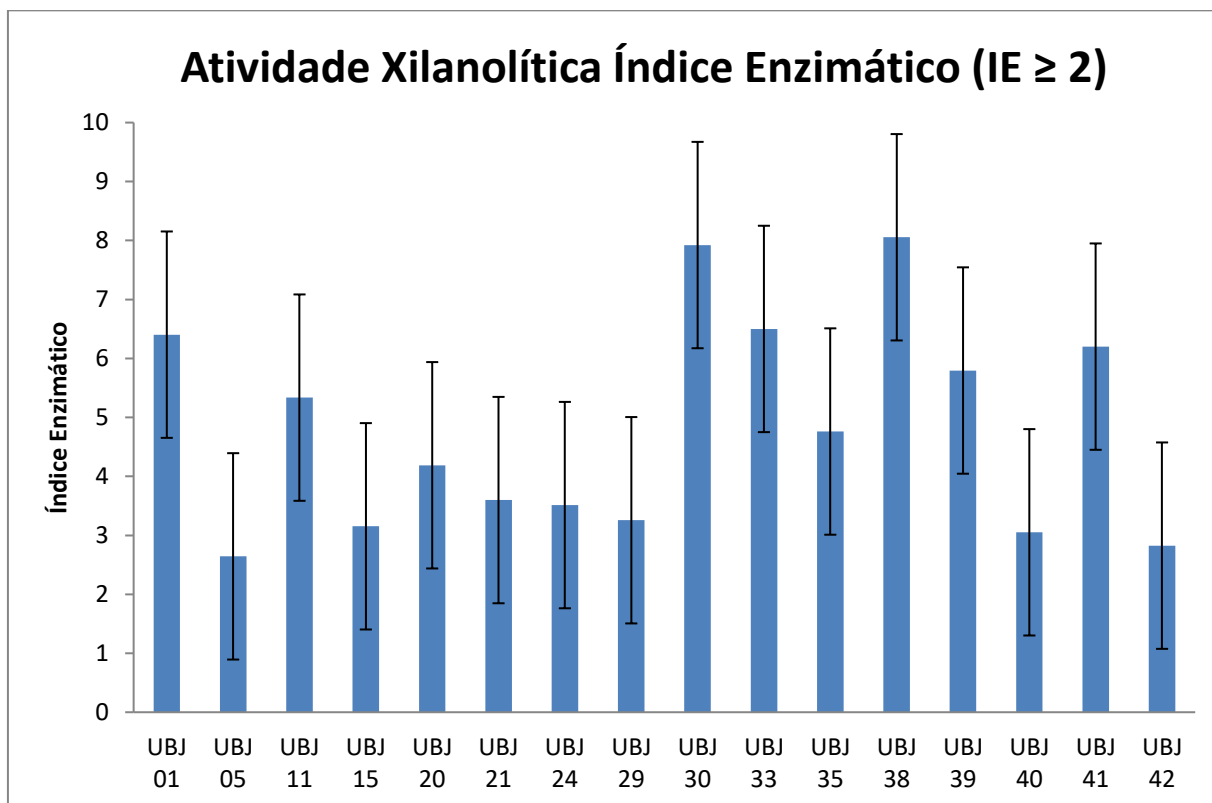
A cepa UBJ 22 ficou classificada como Fracamente Produtora ($1 \leq IE < 1,5$) com ($IE = 1,47$) e a cepa UBJ 23 classificada como Moderadamente Produtora ($1,5 \leq IE < 2$) com ($IE = 1,95$). Cada uma com 2,6% de representatividade em relação ao total de cepas deste trabalho.

As cepas: UBJ 01, UBJ 25, UBJ 37 e UBJ 42 não mostraram produção de halo e/ou crescimento de colônia, dessa forma não foi determinado o índice enzimático médio, estas cepas representam 10,3% das actinobactérias isoladas deste trabalho. Isto mostra que as cepas ou não são degradadoras da pectina ou não cresceram no meio do teste enzimático.

5.10 Atividade Xilanolítica

Com base nas análises feitas sobre a Atividade xilanolítica (IE 's médios) das actinobactérias (Figura 20), as seguintes cepas foram classificadas como Fortemente Produtoras ($IE \geq 2$): UBJ 01, UBJ 05, UBJ 11, UBJ 15, UBJ 20, UBJ 21, UBJ 24, UBJ 29, UBJ 30, UBJ 33, UBJ 35, UBJ 38, UBJ 39, UBJ 40, UBJ 41 e UBJ 42. Isso representa 41 % das bactérias isoladas deste estudo, estas Actinobactérias, então, são classificadas como Fortemente Produtoras de xilanase.

Figura 20 – Atividade xilanólítica ($IE \geq 2$) das cepas de actinobactérias isoladas de amostras de solo da Unidade de Conservação do Parque Nacional de Ubajara (Ce).



Fonte: o autor.

As cepas UBJ 14 e UBJ 23 ficaram classificadas como Moderadamente Produtora ($1,5 \leq IE < 2$) com $IE = 1,74$ e $IE = 1,56$, respectivamente, as duas cepas representam 5% do total de cepas estudadas neste trabalho. A cepa UBJ 27 ficou classificada como Fracamente Produtora ($1 \leq IE < 1,5$) com $IE = 1,07$ e representa 2,5% do total de cepas deste trabalho.

As cepas: UBJ 02, UBJ 04, UBJ 07, UBJ 08, UBJ 09, UBJ 10, UBJ 13, UBJ 16, UBJ 17, UBJ 18, UBJ 22, UBJ 25, UBJ 26, UBJ 28, UBJ 31, UBJ 32, UBJ 34, UBJ 36, UBJ 37 e UBJ 39 não mostraram produção de halo e/ou crescimento de colônia, e dessa forma não foi determinado o índice enzimático médio, estas cepas representam 51,5% das Actinobactérias isoladas deste trabalho. Isto mostra que as cepas ou não são degradadoras da xilana ou não cresceram no meio do teste enzimático.

6. DISCUSSÃO

Os resultados de degradação do amido avaliados corroboraram com os dados obtidos por (RODRIGUES., 2006; SILVA., 2015), os quais isolaram actinobactérias com potencial amilolítico, sendo bactérias do gênero *Streptomyces* as que apresentaram os melhores resultados.

Neste estudo foi observado o predomínio das cores bege, cinza e marrom, em relação ao micélio aéreo e reverso (Figura 8 e 9) esses resultados se assemelham pelo menos a 33% aos encontrados por DORNELAS *et al.*, 2017 que trabalharam com cepas de actinobactérias isoladas de solos tropicais, por SILVA *et al.*, 2015 que descreveu culturalmente cepas de actinobactérias provenientes do semiárido e por SILVA *et al.*, 2019, que fizeram uma análise de diversidade de isolados de actinobactéria do semiárido, nestes trabalhos observaram a predominância das cores cinza, creme e branco.

Cerca de 10% das actinobactérias isoladas e analisadas neste trabalho produziram pigmentos difusivos. Segundo AMAL *et al.*, 2011 essa produção de pigmentos difusivos é um bom critério para estudos taxonômicos de actinobactérias. Os pigmentos retidos nos micélios foram os seguintes: amarelo, azul, bege, branco, cinza, marrom, verde, vermelho, rosa e roxo, AMAL *et al.*, 2011 descreveram que estes pigmentos podem ser em tons de azul, violeta, vermelho, rosa, amarelo, verde, marrom e preto. Lembrando que estes pigmentos são passíveis de exploração e aplicação biotecnológica (ABREU *et al.*, 2014). Um dos motivos de se explorar mais estes pigmentos naturais está diretamente relacionado com os efeitos tóxicos dos corantes sintéticos, em relação aos pigmentos naturais (FRANCALANCI *et al.*, 2001).

Alguns gêneros apresentam cepas com a predominância de cores, o gênero *Micromonospora* apresentou dois representantes UBJ 13 e UBJ 23 com micélio aéreo e micélio reverso: rosa, rosa e verde, verde. Em geral este gênero apresenta colônias com uma coloração que varia entre o amarelo claro e o laranja (LEIVA *et al.*, 2015). Já o gênero *Streptomyces* com o maior número de representantes apresenta colônias com uma vasta gama de cores (RUAN, 2013) e neste trabalho foram as cores: amarelo, azul, bege, branco, cinza, marrom e vermelho.

Com a análise da figura 13, observa-se que houve uma grande diversidade de cepas, principalmente quando analisado, o maior grupo, que apresenta as quatro características em comum a seguir: *Streptomyces*; bege, bege e não apresentou pigmentos difusivos. Pois, este grupo corresponde à apenas 15,4 % das cepas isoladas e caracterizadas neste trabalho e assim mostrando que houve apenas 15,4% de semelhança entre todas as actinobactérias estudadas.

Após a análise de microcultivo houve a predominância do gênero *Streptomyces* (65%), seguindo por: *Nocardia* (11%) e *Micromonospora* que também foi relatado em estudos realizados em cepas de actinobactérias do semiárido por BRITO *et al.* (2015) e Ramos *et al.* (2015). A frequência do gênero *Streptomyces* nos estudos se deve principalmente por este ser o grupo de actinobactérias mais abundante (70%) no solo (ANANDAN *et al.*, 2016). A predominância do gênero *Streptomyces* no solo justifica-se por ser um gênero de actinobactérias que não apresenta muitas exigências nutricionais (LEWIS *et al.*, 2016).

A atividade amilolítica foi bastante representativa neste trabalho, visto que, esta atividade chegou a representar 92,3 % de actinobactérias deste estudo. Porém, o percentual de 82% foi constatado por SILVA, 2015 ao analisar o IE de 4 gêneros distintos e inclusive do mesmo local de coleta e estudo deste trabalho, se considerado uma faixa de $\pm 10\%$ de atividade enzimática em placas, podemos afirmar que estes trabalhos apresentaram IE similares.

Jaralla. (2014) constatam que 80% das cepas do estudo deles apresentaram atividade amilolítica e assim a produção de Amilase. Sathya e Ushadevi (2014) ao analisar a presença de amilase em 35 cepas de actinobactérias de solo do mangue na Índia, estes pesquisadores observaram que 31 (88,6%) das 35 cepas apresentaram a referida atividade enzimática. As três cepas mais promissoras deste trabalho que se destacaram em relação ao IE da atividade amilolítica foram: UBJ 25 (IE= 5,60) gênero *Streptomyces*, UBJ 24 (IE=4,80) gênero *Streptomyces* e UBJ 11 (IE=4,79) gênero *Nocardia*. Houve 7,7 % de actinobactérias que não produziram atividade enzimática.

As três cepas que apresentaram os melhores IE do teste celulolítico foram: UBJ 17 (IE=8,21) gênero *Streptomyces*, UBJ 30 (IE=5,54) gênero *Streptomyces* e UBJ 11(5,16) gênero *Nocardia*, vale comparar aqui a diferença entre a melhor cepa da atividade celulolítica UBJ 17 (IE= 8,21) com a melhor cepa da atividade amilolítica UBJ 25 (IE = 5,6), visto que o CMC é um composto mais complexo em relação ao amido, e são ambos representantes do gênero *Streptomyces* e de fato, as enzimas celulolíticas são produzidas principalmente por actinobactérias, pertencentes a este gênero(SILVA, 2015).

A atividade celulolítica foi de baixa representatividade neste trabalho, visto que, esta atividade chegou a representar apenas 48,7 % de actinobactérias deste estudo e apresentou 41% das cepas com $IE \geq 2$. Contudo, SILVA *et al.* 2013 analisou em 47 cepas de actinobactérias isoladas da rizosfera da catingueira e encontraram que 28% das amostras apresentaram atividades celulolíticas, mas apenas 7% mostraram índice enzimático ($IE \geq 2$).

A atividade enzimática pectinolítica foi bastante expressiva, visto que, 84,7% das actinobactérias apresentaram atividade enzimática distribuídos na classificação sugerida por SILVA, 2015. Por outro lado, houve cerca de 15,3 % de actinobactérias que não formaram halo, porém 79,5 % das actinobactérias deste teste enzimático obtiveram ($IE \geq 2$), o que as classificam como potenciais produtoras de pectinase (LEALEM; GASHE, 1994).

A produção de pectinases por actinobactérias foi descrita para o gênero *Streptomyces sp.* e *Thermomonospora sp.* (STUTZENBERGER, 1987), principalmente as pectato liases produzidas por *Streptomyces viridochromogenes* (AGATE, BHAT e BILIMORIA, 1962) e *Thermomonospora fusca* (STUTZENBERGER, 1987).

As três cepas que possuem os maiores IE são: UBJ 20 ($IE=11,33$) gênero *Streptomyces*, UBJ 06 ($IE=10,81$) gênero *Actinomadura* e UBJ 40 ($IE 8,89$) gênero *Streptomyces*. A cepa UBJ 20 do gênero *Streptomyces* é extremamente produtora de pectinase, Lealem; Gashe, 1994 dão a característica de potenciais produtoras de pectinases as cepas com $IE \geq 2$, como esta cepa, praticamente produziu cinco vezes o valor de IE mínimo para a classificação de produtora de pectinases segundo estes autores.

A atividade xilanolítica foi pouco expressiva em relação ao número de cepas que apresentaram atividade enzimática, onde apenas 48,4 % das cepas apresentaram esta atividade enzimática, principalmente, quando vemos que 51,5 % de cepas não produziram halo. SOUSA *et al.*, 2018 em seu estudo sobre a antropização sobre efeito de produção de xilanase, analisou em 26 cepas, que representa 68% das actinobactérias estudadas que essas possuem presença de atividade xilanolítica, possuindo IE que variam entre 1,04 a 3,02.

As três maiores cepas com maior atividade xilanolítica dentre as 39 cepas de estudo deste trabalho são: UBJ 38 ($IE=8,05$), UBJ 30 ($IE=7,92$) e UBJ 33 (6,5) ambos do gênero *Streptomyces*, isso atesta de fato, que o gênero *Streptomyces* apresenta uma ampla produção de enzimas e que a xilana também faz parte dessa amplitude de enzimas produzidas por este gênero de actinobactéria, principalmente por produzir enzimas hidrolíticas (VUJAKLIJA *et al.*, 2002; MUKHERJEE e SEN, 2006; AÇIKEL, ERŞAN e AÇIKEL, 2010).

O presente trabalho visou prospectar actinobactérias com potencial biotecnológico enzimático, para isso calculou-se os IE e assim pode-se encontrar cepas que são consideradas altamente produtoras das enzimas.

7. CONCLUSÃO

Conclui-se que as actinobactérias são uma importante fonte de enzimas relacionadas com a hidrólise de carboidratos e que as cepas UBJ 25 (IE= 5,6) para a atividade amilolítica, UBJ 17 (IE= 8,21) para a atividade celulolítica, UBJ 20 (IE= 11,33) para a atividade pectinolítica e UBJ 38 IE= 8,05 para a atividade xilanolítica, todas do gênero *Streptomyces*, possuem o potencial biotecnológico, principalmente no que tange a exploração de enzimas relacionadas à degradação de polímeros de carboidratos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, B. T. R. *et al.* BioStudio: cultivando estampas vivas. **2º CONTEXMOD**, v. 1, n. 2, p. 16, 2014

AÇIKEL, Ü.; ERŞAN, M.; AÇIKEL, Y. S. Optimization of critical medium components using response surface methodology for lipase production by *Rhizopus delemar*. **Food and Bioproducts Processing**, v. 88, n. 1, p. 31-39, 2010. ISSN 0960-3085.

AEHLE, Wolfgang. Enzymes in Industry: **Production and Applications**. 3 ed. Darmstadt Wiley-vch, 2007. 516p.

ALARIYA, S. S.; SETHI, S.; GUPTA, S.; LAL, G. B. Amylase activity of a starch degrading bacteria isolated from soil. **Archives of Applied Science Research**, v. 5, n.1, p.15-24, 2013. Disponível em: <https://pdfs.semanticscholar.org/51ef/0b3026947a22ede0e872422909af538e7627.pdf>.

ALVES, D. A. S. *et al.* Produção de celulase e amilase por actinobactérias do semiárido brasileiro. **Enciclopédia Biosfera**, v.13, n.24, p.1303-1315, 2016.

ARISTIDOU, A.; PENTTILÄ, M. Metabolic engineering applications to renewable resource utilization. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 11, p. 187-198, 2000.

BARKA, E. A. *et al.* Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.80, n.1, p.1-43, 2016.

BAYER, E. A.; LAMED, R. The cellulose paradox: pollutant par excellence and/or a reclaimable natural resource? **Biodegradation**, v. 3, p. 171-188, 1992.

BELFAQUIH, N.; PENNINCKX, M. J. A bifunctional β -xylosidase-xylose isomerase from *Streptomyces* sp. EC 10. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, p. 114-121, 2000.

BENIZRI, E.; BAUDOIN, E.; GUCKERT, A. Root colonization by inoculated plant growth-promoting rhizobacteria. **Biocontrol Science and Technology**, v. 11, n. 5, p. 557-574, 2001.

BHAT, M. K.; BHAT, S. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. **Biotechnology Advances**, v.15, n. 3/4, p. 583-620, 1997.

BIELY, P.; VRSANSKÁ, M.; KUCÁR, S. Identification and mode of action of endo-(1 $\rightarrow$ 4)- β -xylanases. In: VISSER, J., BELDMAN, G., KUSTERS-VAN SOMEREN, M. A. and VORAGEN, A. G. J. (Eds.) Xylans and Xylanases, **Progress in Biotechnology** 7. Elsevier. 1992

BON, E. P. S.; GÍRIO, F.; PEREIRA JUNIOR, N. Enzimas na produção de etanol. In: BON, E. P. S.; CORVO, M. L.; VERMELHO, A. B.; PAIVA, C. L. A; FERRARA, M. A. & COELHO, R. R. R. (Eds.). Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado. Rio de Janeiro. **Editora Interciência Brasil**, p. 241-271, 2008.

BRECCIA, J.D.; CASTRO, G.R.; BAIGORÍ, M.D.; SIÑERIZ, F. Screening of xylanolytic bacterium using a colour plate method. **Journal of Applied Bacteriology**, vol. 78, p. 469 – 472, 1995.

BULÉON, A. et al. Starch granules: structure and biosynthesis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.23, p.85-112, 1998.

CANTERI, M.H.G., MORENO, L.; WOSIACKI, G.; SCHEER, A. P. Pectina: da matéria- prima ao produto final. **Polímeros**, v. 22, n. 2, p. 149-157, 2012.

CLARK, F. E. Agar-plate method for total microbial count 1. **Methods of soil analysis**. Part2. Chemical and microbiological properties, n. methods of soil an b, p. 1460-1466, 1965.

COLLINS, T.; GERDAY, C. & FELLER, G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**,v.29, p. 3-23, 2005.

COURI, S.; FARIAS, A. X. Genetic manipulation of *Aspergillus niger* for increased synthesis of pectinolytic enzymes. **Revista de Microbiologia**, v.26, n.4, p.314-317, 1995.

DE OLIVEIRA, S. M. *et al.* Prospecção de enzimas de interesse industrial produzidas por actinobactéria isolado de solo rizosférico da Amazônia. **Scientia Plena**, v. 13, n. 3, 2017.

DORNELAS, J. C. M. *et al.* Characterization and phylogenetic affiliation of Actinobacteria from tropical soils with potential uses for agro-industrial processes. **Embrapa Milho e Sorgo-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2017.

ELIASSON, A.C. Starch in food – Structure, function and applications. **New York: Boca Raton, CRC**, 2004. 605p. Research 5, 16-23.

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.

GANESAN, P. *et al.* Antimicrobial activity of some actinomycetes from Western Ghats of Tamil Nadu, India. **Alexandria Journal of Medicine**, v.53, n.2, p.101-110, 2017.

GONG, Y. *et al.* Phylogenetic diversity and investigation of plant growth-promoting traits of actinobacteria in coastal salt marsh plant rhizospheres from Jiangsu, China. **Systematic and Applied Microbiology**, v.41, n.5, p.516-527, 2018.

GOODFELLOW M, FIEDLER H.P. A guide to successful bioprospecting: informed by actinobacterial systematics **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 98, n. 2, p. 119-142, 2010.

GOODFELLOW, M.; WILLIAMS, S. T.; MORDARSKI, M. Actinomycetes in Biotechnology. M. GOODFELLOW, S. T. WILLIAMS e M. MORDARSKI (Eds.). **Academic Press, London**. 1988.

GREGORY, A. C. E.; O'CONNEL, A. P.; BOLWELL, G. P. Xylans. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 15, p. 439-455, 1998.

GUPTA, R., GIGRAS, P., MOHAPATRA, H., GOSWAMI, V.K., CHAUHAN, B., 2003. Microbial alpha amylases: a biotechnological perspective. **Process Biochemistry** 38, 1599-1616.

GUPTE, M.; KULKARNI, P.; GANGULI, B. N. Antifungal antibiotics. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 58, n.1, p. 46-57, 2002.

HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, SG. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. **Mycolology**, v.67, p.597-607, 1975. <http://dx.doi.org/10.2307/3758395>.

HASSAN A. A, EL-BARAWY A. M, EL MOKHTAR M. N. Evaluation of biological compounds of *Streptomyces* species for control of some fungal diseases. **Journal of American Science**, v. 7, n. 4, p. 752-60, 2011.

HASSAN AA, El-Barawy AM, El Mokhtar MN. Evaluation of biological compounds of *Streptomyces* species for control of some fungal diseases. **J Am Sci**. 2011; 7(4):752-760.

HOUREDET, D.; MULLER, G. Solution properties of pectin polysaccharides—III: Molecular size of heterogeneous pectin chains. Calibration and application of SEC to pectin analysis *Carbohydr. Polymer* 16, p. 409, 1991.

JAYANI, R.S.; SAXENA, S.; GUPTA, R. Microbial pectinolytic enzymes: A review. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2931-2944, 2005.

JIANG, X.; GENG, A.; HE, N.; LI, Q. New iso- lated of *Trichoderma viride* strain for enhan- ced cellulolytic enzyme complex production. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.111, p.121-127, 2011.

JUHÁSZ, T.; SZENGYEL, Z.; RÉCZEY, K.; SIIKA-AHO, M.; VIKARI, L. Characterization of cellulases and hemicellulases produced by *Trichoderma reesei* on various carbon sources. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 3519-3525, 2005.

KAVAMURA V.N. *et al.* Water regime influences bulk soil and rhizosphere of *Cereus jamacaru* bacterial communities in the Brazilian Caatinga biome. **PloS one**, v. 8, n. 9, p. e73606, 2013.

KERN, M.E.; BLEVINS, K.S. *Micologia Médica*. **Editora Premier**, 2º ed., p.256, 1999.

KUMAR, R.; SINGH, S.; SINGH, O. V. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 35, p. 377–391, 2008.

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.

LEWIN, Gina R. *et al.* Evolution and ecology of actinobacteria and their bioenergy applications. **Annual review of microbiology**, v. 70, p. 235-254, 2016.

LIN, Y.; TANAKA, S. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.69, p.627-642, 2006.

LOPES, J. B. A. C. *et al.* Produção de enzimas hidrolíticas extracelulares por actinobactérias oriundas do solo e serrapilheira de região semiárida. **Enciclopédia Biosfera**, v.15, n.27, p.35- 50, 2018.

LYND, R.L.; WEIMER, J. P.; VAN ZYL, W.H.; PRETORIUS, I. S. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, n. 3, p. 506–577, 2002.

MAATAOUI, H. *et al.* Physicochemical characterization of actinomycetes isolated from decayed cedar wood: Contact angle measurement. **Journal of Adhesion Science and Technology**, v.28, n.20, p.2046-2053, 2014.

MEHRAVAR, M; SARDARI, S; OWLIA, P. Screening of membrane active antimicrobial metabolites produced by soil actinomycetes using membrane models. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 49, n. 12, p. 946-52, 2011.

MELO, F, M.P. Bioprospecção de Actinobactérias das Rizoferas de milho *Zea mays* L. com atividade antifúngica. 105 F. **Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Interunidades em Biotecnologia**, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

MINOTTO, E., Milagre, L.P., Oliveira, M.T., Van Der Sand, S.T., 2014. Enzyme characterization of endophytic actinobacteria isolated from tomato plants, **Journal of Advanced Scientific Research** 5, 16-23.

MUKESH KUMAR, D.J.; SARANYA, G.M.; SURESH, K.; ANDAL PRIYADHARSHINI, D.; RAJAKUMAR, R.; KALAICHELVAN, P.T. Production and optimization of pectinase from *Bacillus* sp. MFW7 using cassava waste. **Asian Journal of Plant Science and Research**, v. 2, p. 369-375, 2012.

MUKHERJEE, G.; SEN, S. Purification, characterization, and antifungal activity of chitinase from *Streptomyces venezuelae* P10. **Current microbiology**, v. 53, n. 4, p. 265-269, 2006. ISSN 0343-8651.

NASCIMENTO, R. P., MARQUES, S.; ALVES, L.; GÍRIO, F.; AMARAL-COLLAÇO, M. T.; SACRAMENTO, D. R. BON, E. P. S. AND COE- LHO, R. R. R. A novel strain of *Streptomyces malaysiensis* isolated from Brazilian soil produces high endo-b-1,4-xylanase titres. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 19, p. 879–881, 2003.

NASCIMENTO, R. P.; COELHO, R. R. R.; MARQUES, S.; ALVES, L.; GÍRIO, F. M.; BON, E. P. S. AND AMARAL-COLLAÇO, M. T. Production and partial characterization of xylanase from *Streptomyces* sp. strain AMT- 3 isolated from Brazilian Cerrado soil. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, p. 549–555, 2002.

NOROVSUREN Z; ZENOVA G. M.; MOSINA L. V. Actinomycetes in the rhizosphere of semidesert soils of Mongolia. **Eurasian Soil Science**, v. 40, n. 4, p. 415-418, 2007.

OKORO C. K. *et al.* Diversity of culturable actinomycetes in hyper-arid soils of the Atacama desert, Chile. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.95, p.121-133, 2009.

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, p. 853-860. 2006.

PANDEY; et al. **Enzyme Technology**. 1ª ed. New Delhi: Asiatech Publishers, Inc, 2005.

PATHOM-AREE, W. *et al.* Diversity of actinomycetes isolated from Challenger Deep sediment (10,898 m) from the Mariana Trench. **Extremophiles**, v. 10, n. 3, p. 181-189, 2006.

PEREIRA, D. S., GOMES, R. S., SEMÊDO, L. T. A. S. Potencial das actinobactérias na biodegradação de hidrocarbonetos. **Revista Eletrônica TECCEN**. v.5, p.71, 2012.

PÉREZ CORRAL, D. *et al.* Aislamiento de actinomicetos asociados a rizosfera de árboles de manzano antagonicos a *Fusarium equiseti*. **Revista mexicana de ciências agrícolas**, v. 6, n. 7, p. 1629-1638, 2015.

PONTES, A. F, ESCHER, S. K. S. Antibiose de *Streptomyces aureus* frente a microrganismos de interesse clínico. **Revista EM FOCO-Fundação Esperança/IESPES**, v. 1, n. 22, p. 32-37, 2014.

REDDY, G. S. N. *et al.* *Cryobacterium roopkundense* sp. nov., a psychrophilic bacterium isolated from glacial soil **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 60, n. 4, p. 866-870, 2010.

REGULY, Júlio Carlos, Biotecnologia dos processos fermentativos: Matérias-primas Agrícolas, processos e produtos. PELOTAS : Universitária/UFPEL, 1996 . 1v. 330p.

RODRIGUES, K.; Identificação, produção de antimicrobianos e complexos enzimáticos de isolados de actinomicetos. 2006. 119 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente). Universidade Estadual do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

SAHA S. *et al.* *Nocardia* sp. SD5: a potent feather degrading rare actinobacterium isolated from feather waste in Tamil Nadu, India. **Journal of Basic Microbiology**, v. 53, n. 7, p. 608- 616, 2013.

SANTOS, S. N. “Bioprospecção de Biomoléculas Isoladas de Fungos Endofíticos de *Combretum leprosum* Do Bioma Caatinga”. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ)/ Universidade de São Paulo (USP), Piracicaba - SP. 2012.

SCIPIONI, GUSTACO CALLEGARI, Otimização do processo de sacarificação do amido de Batata (*Solanum tuberosum* L.)utilizando enzimas amilolíticas; **Dissertação (mestrado)** Universidade Federal de Santa Maria , Centro de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processo, RS, 2011.

SEMÊDO, L. T. A. S. (1997). Atividade antimicrobiana e celulolítica de actinomicetos isolados de solos brasileiros. Dissertação p. 128 (Mestrado Biotecnologia Vegetal -Microbiologia Aplicada) Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

SEMÊDO, L. T. A. S.; GOMES, R. C.; BON, E. P. S.; SOARES, R. M. A.; LINHARES, L. F. AND COELHO, R. R. R. Endocellulase and exocellulase activities of two *Streptomyces* strain isolated from a forest soil. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 84, p. 267–76, 2000.

SEMÊDO, L.T.A.S., LINHARES, A.A., GOMES, R. C., MANFIO, G.P., ALVIANO, C.S., Linhares, L.F. and COELHO, R.R.R. (2001). Isolation and characterization of actinomycetes from Brazilian tropical soils. **Microbiological Research**, 155, 291-299.

SHOUCHE, S; BHATI, P. Potencial of actinomycetes as bioremediating and biocontrolling agents. Paripex - **Indian Journal of Research**, v.8, p.36-40, 2019.

SILVA, M. S., SALES, A. N., MAGALHÃES-GUEDES, K. T., DIAS, D. R., SCHWAN, R. F. Brazilian Cerrado soil actinobacteria ecology. **BioMed Research International**, p.1-10, 2013.

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.08, 2015.

SINGH, A.; HAYASHI, K. Microbial cellulases: Protein architecture, molecular properties and biosynthesis. **Advances Applied Microbiology**, v. 40, p. 1-44, 1995.

SOARES, R. M. A., Linhares, L. F. e Coelho, R. R. R. (2004). *Streptomyces drozdowiczii* sp.nov., a novel cellulolytic streptomycete from soil in Brazil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 54, 1323-1328.

SOUSA, J. B., LIRA, I. C., MARTINS, S. C. S., MARTINS, C. M. Efeito da antropização sobre a produção da enzima xilanase em actinobactérias. **Enciclopédia Biosfera**, v.15, n.28, p.1033-1042, 2018. Disponível em: < <http://www.conhecer.org.br/enciclop/2018B/BIO/efeito.pdf>> doi: 10.18677/EnciBio_2018B84.

SUBRAMANIYAN, S.; PREMA, P. Biotechnology of microbial xylanases: enzymology, molecular biology and application. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 22, n. 1, p. 33-64, 2002

SULTAN, M.Z. *et al.* In vitro antibacterial activity of an active metabolite isolated from *Streptomyces* species. **Biotechnology**, v.1, p.100-106, 2002.

SUNNA, A.; ANTRANIKIAN, G. Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 17, n. 1, p. 39-67, 1997.

TAKETANI, R. G. *et al.* Functional congruence of rhizosphere microbial communities associated to leguminous tree from Brazilian semiarid region. **Environmental Microbiology Reports**, v. 7, n. 1, p. 95-101, 2015.

TAO, Y.M.; ZHU, X.Z.; HUANG, J.Z.; MA, S.J.; WU, X.B.; LONG, M.N.; CHEN, Q.X. Purification and properties of endoglucanase from a sugar cane bagasse hydrolyzing strain, *Aspergillus glaucus* XC9. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.58, p.6126-6130, 2010.

TESTER, R.F. *et al.* Starch – composition, fine structure and architecture. **Journal of Cereal Science**, v.39, p.151-165, 2004. Disponível em: http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6WHK4BNMH9W4&_user=687358&_rdoc=1&_fmt=&_orig=search&_sort=d&view=_acct=C000037899&_version=1&_urlVersion=0&_userid=687358&md5=af13c384207409ca760f595fa217b8bd. Doi: 10.1016/j.jcs.2003.12.001.

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

VORAGEN, A.G.J.; COENEN, G.-J.; VERHOEF, R.P.; SCHOLS, H.A. Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls. **Struct Chem**, 20, p. 263-275, 2009.

VUJAKLIJA, D. *et al.* A novel streptomycete lipase: cloning, sequencing and high-level expression of the *Streptomyces rimosus* GDS(L)-lipase gene. **Arch Microbiol**, v. 178, n. 2, p. 124-30, Aug 2002. ISSN 0302-8933.

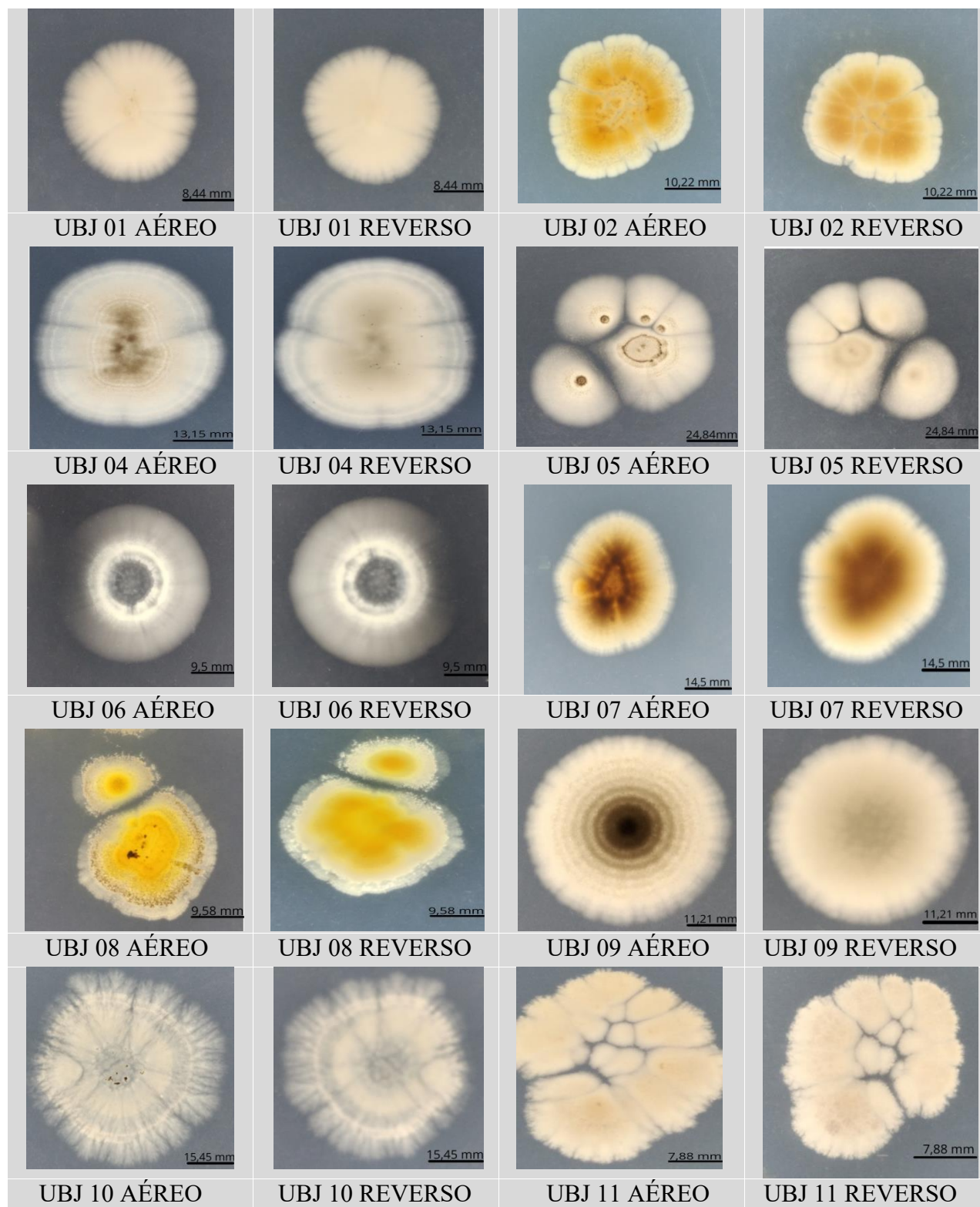
WALTER, M.; PICOLLI, L. S.; EMANUELLI, T. Resistant starch: physico-chemical characteristics, physiological properties and quantification methodologies. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.35, n.4, p.974-980, jul-ago, 2005.

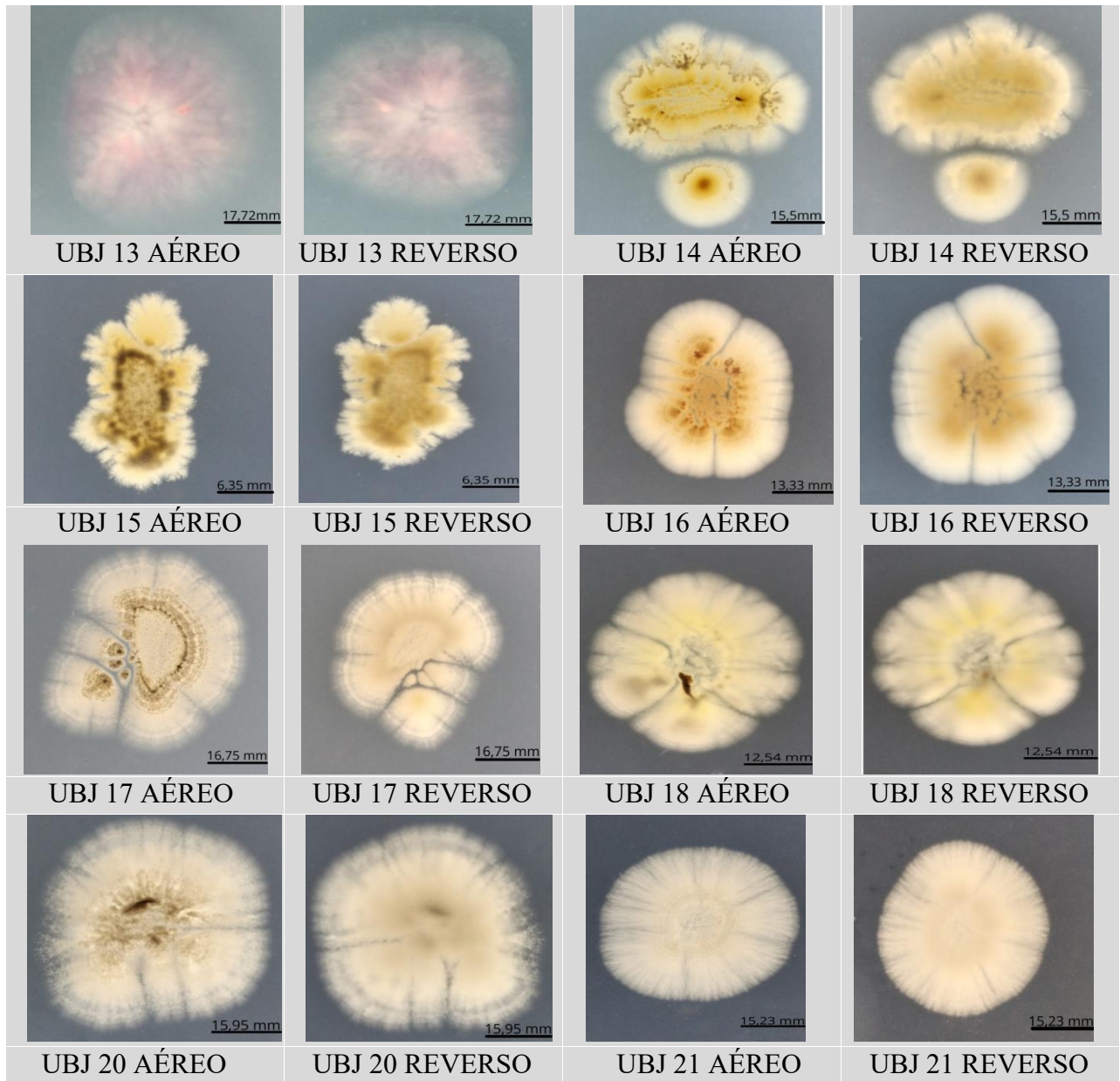
WINK, J. M. **Compendium of actinobacteria**. University of Braunschweig. p.1-37, 2012.

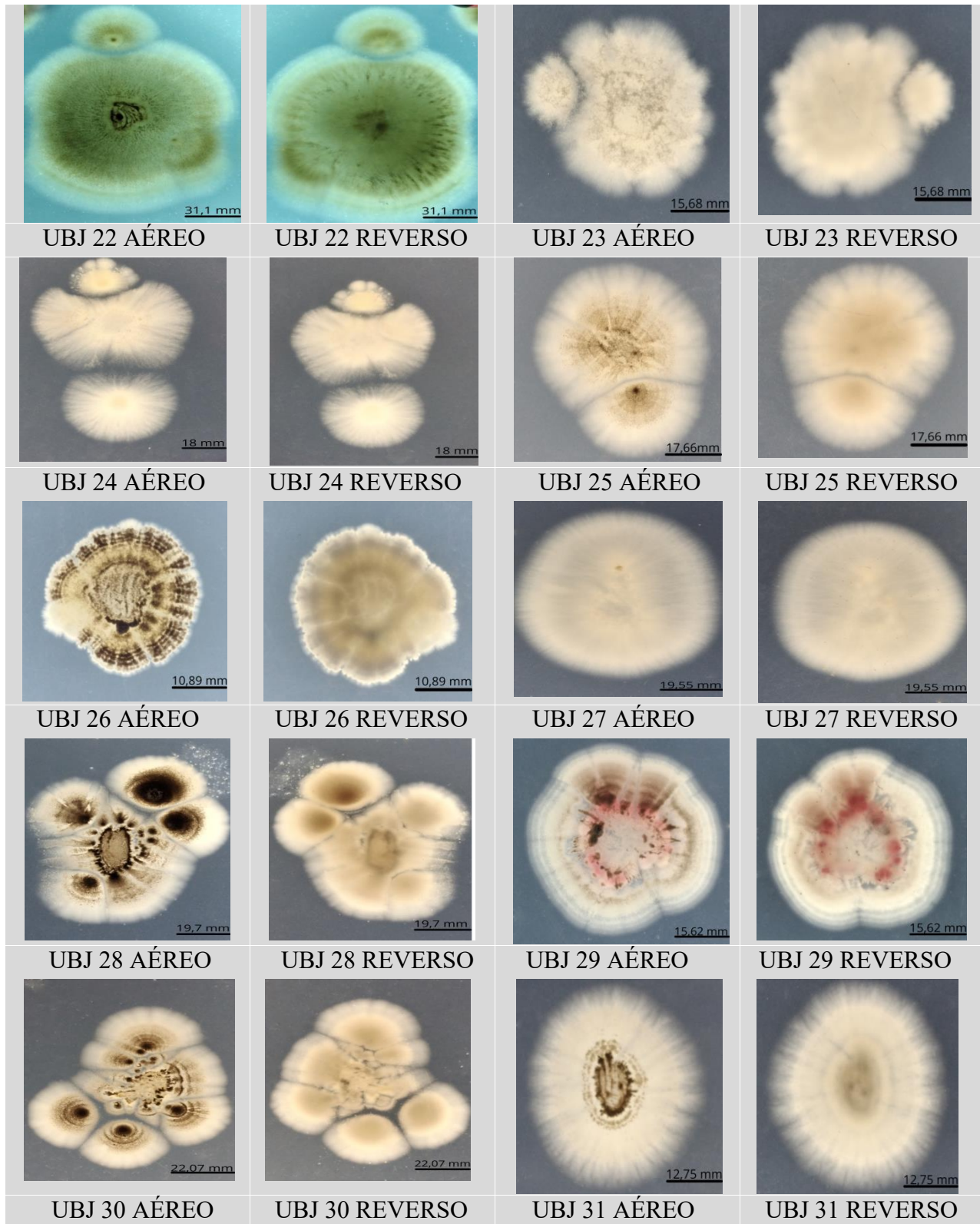
ZHANG, Y. -H. P.; HIMMEL, M. E.; MIELENZ, J. R.; Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. **Biotechnology Advances**, v. 24, p. 452–481, 2006.

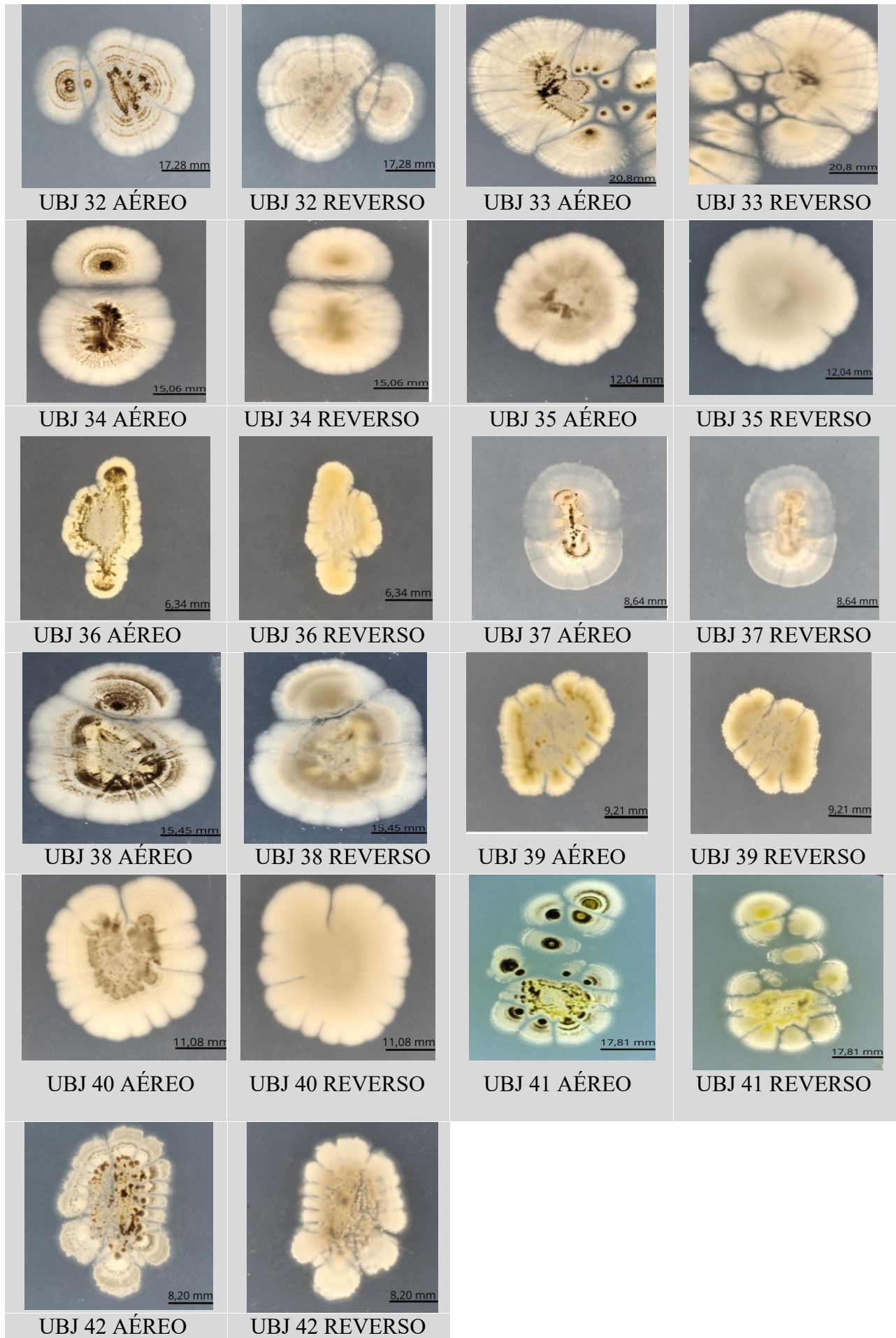
ZHAO K. *et al.* The diversity and anti-microbial activity of endophytic actinomycetes isolated from medicinal plants in Panxi Plateau China **Current microbiology**, v. 62, n. 1, p. 182-190, 2011.

APÊNDICE A – ISOLADOS CENTRAIS DAS CEPAS ISOLADAS DA UNIDADE DE CONSERVAÇÃO DO PARQUE NACIONAL DE UBAJARA









APÊNDICE B - CORES DO MICÉLIO AÉREO E MICÉLIO REVERSO SEGUNDO A CARTELA DE CORES (WINX, 2012)

CEPA	CÓDIGO DA COR	COR DO MICÉLIO AÉREO	CÓDIGO DA COR	COR DO MICÉLIO REVERSO
UBJ 01	RAL 4009	Pastel Violet	RAL 4009	Pastel Violet
UBJ 02	RAL 9001	Light Blue	RAL 4006	Traffic Purple
UBJ 04	RAL 1015	Light Ivory	RAL 1015	Light Ivory
UBJ 05	RAL 8003	Clay Brown	RAL 9001	Cream
UBJ 06	RAL 6027	Light Green	RAL 6027	Light Green
UBJ 07	RAL 8025	Pale Brown	RAL 8017	Chocolate Brown
UBJ 08	RAL 9006	White Alumínio	RAL 8001	Ochre Brown
UBJ 09	RAL 9010	White	RAL 9001	Cream
UBJ 10	RAL 9018	Papyrus White	RAL 9002	Grey White
UBJ 11	RAL 8025	Pale Brown	RAL 8025	Pale Brown
UBJ 13	RAL 3015	Light Pink	RAL 3015	Light Pink
UBJ 14	RAL 9018	Papyrus White	RAL 1011	Brown Beige
UBJ 15	RAL 9002	Grey White	RAL 1011	Brown Beige
UBJ 16	RAL 8017	Chocolate Brown	RAL 8017	Chocolate Brown
UBJ 17	RAL 4009	Pastel Violet	RAL 4009	Pastel Violet
UBJ 18	RAL 9010	White	RAL 2011	Deep Orange
UBJ 20	RAL 7047	Telegrey 4	RAL 9002	Grey White
UBJ 21	RAL 9010	White	RAL 9010	White
UBJ 22	RAL 7021	Black Grey	RAL 7021	Black Grey
UBJ 23	RAL 9010	White	RAL 9010	White
UBJ 24	RAL 9010	White	RAL 9010	White
UBJ 25	RAL 9002	Grey White	RAL 9002	Grey White
UBJ 26	RAL 4009	Pastel Violet	RAL 4009	Pastel Violet
UBJ 27	RAL 9010	White	RAL 9010	White
UBJ 28	RAL 4009	Pastel Violet	RAL 8025	Pale Brown
UBJ 29	RAL 9010	White	RAL 4008	Signal Violet
UBJ 30	RAL 4009	Pastel Violet	RAL 7032	Pebble Grey
UBJ 31	RAL 8008	Olive Brown	RAL 9018	Papyrus White
UBJ 32	RAL 8025	Pale Brown	RAL 8025	Pale Brown
UBJ 33	RAL 8025	Pale Brown	RAL 9002	Grey White
UBJ 34	RAL 8025	Pale Brown	RAL 8025	Pale Brown
UBJ 35	RAL 9010	White	RAL 9001	Cream
UBJ 36	RAL 9002	Grey White	RAL 9002	Grey White
UBJ 37	RAL 8028	Terra Brown	RAL 9018	Papyrus White
UBJ 38	RAL 9002	Grey White	RAL 9002	Grey White
UBJ 39	RAL 8003	Clay Brown	RAL 8003	Clay Brown
UBJ 40	RAL 9010	White	RAL 1011	Beige Brown
UBJ 41	RAL 6008	Green Brown	RAL 6008	Green Brown
UBJ 42	RAL 6008	Green Brown	RAL 8023	Orange Brown

APÊNDICE C – POSSÍVEL GÊNERO E ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE CADA CEPA DE ACTINOBACTÉRIA DA UNIDADE DE CONSERVAÇÃO DO PARQUE NACIONAL DE UBAJARA

CEPA	POSSÍVEL GÊNERO	Índice Enzimático Amilase	Índice Enzimático Celulase	Índice Enzimático Pectinase	Índice Enzimático Xilanase
UBJ 01	<i>Nocardia</i>	3,91	3,64	-	6,40
UBJ 02	<i>Streptomyces</i>	3,11	-	3,24	-
UBJ 04	<i>Nocardia</i>	3,16	-	3,84	-
UBJ 05	<i>Actinomadura</i>	1,43	2,13	4,87	2,64
UBJ 06	<i>Actinomadura</i>	4,49	2,11	10,81	-
UBJ 07	<i>Thermomonospora</i>	3,12	-	4,89	-
UBJ 08	<i>Streptosporangium</i>	2,26	-	4,38	-
UBJ 09	<i>Nocardia</i>	3,42	-	4,80	-
UBJ 10	<i>Streptomyces</i>	1,73	-	3,93	-
UBJ 11	<i>Nocardia</i>	4,79	5,16	5,40	5,34
UBJ 13	<i>Micromonospora</i>	1,51	-	2,88	-
UBJ 14	<i>Streptomyces</i>	1,88	-	5,54	1,75
UBJ 15	<i>Streptomyces</i>	3,61	-	4,84	3,15
UBJ 16	<i>Streptomyces</i>	4,23	3,80	8,96	-
UBJ 17	<i>Streptomyces</i>	-	8,21	4,88	-
UBJ 18	<i>Streptomyces</i>	2,66	1,43	5,45	-
UBJ 20	<i>Streptomyces</i>	4,31	-	11,33	4,19
UBJ 21	<i>Streptosporangium</i>	3,48	-	6,26	3,60
UBJ 22	<i>Micromonospora</i>	1,36	1,23	1,47	-
UBJ 23	<i>Thermomonospora</i>	1,45	-	1,95	1,57
UBJ 24	<i>Streptomyces</i>	4,80	-	6,05	3,51
UBJ 25	<i>Streptomyces</i>	5,60	-	-	-
UBJ 26	<i>Actinomadura</i>	1,94	3,19	5,30	-
UBJ 27	<i>Streptomyces</i>	1,62	-	2,11	1,07
UBJ 28	<i>Streptomyces</i>	1,83	-	3,75	-
UBJ 29	<i>Thermomonospora</i>	2,71	1,36	5,67	3,26
UBJ 30	<i>Streptomyces</i>	1,23	5,54	5,04	7,92
UBJ 31	<i>Streptomyces</i>	2,95	-	6,73	-
UBJ 32	<i>Streptomyces</i>	3,85	2,16	3,73	-
UBJ 33	<i>Streptomyces</i>	-	4,00	5,49	6,50
UBJ 34	<i>Streptomyces</i>	2,04	-	4,03	-
UBJ 35	<i>Streptomyces</i>	3,99	-	5,46	4,76
UBJ 36	<i>Streptomyces</i>	1,58	4,71	4,71	-
UBJ 37	<i>Streptomyces</i>	4,82	3,34	-	-
UBJ 38	<i>Streptomyces</i>	-	2,07	5,04	8,05
UBJ 39	<i>Streptomyces</i>	2,67	2,98	5,87	5,79
UBJ 40	<i>Streptomyces</i>	5,46	-	8,89	3,05
UBJ 41	<i>Streptomyces</i>	1,54	4,76	7,82	6,20
UBJ 42	<i>Streptomyces</i>	4,15	2,49	-	2,82