

Isolamento de microrganismos produtores de amilase em sistema de biodigestão anaeróbia de dejetos bovinos¹

Diego Santos Cunha ²

Larice Aparecida Rezende Santana ³

Júnior César Fernandes Lima ⁴

Mirian Pereira Rodarte ⁵

Marcelo Henrique Otenio ⁶

Resumo: As enzimas aminolíticas são biocatalizadores que podem ser aplicadas em diferentes setores industriais. Bioprocessos, como a biodigestão anaeróbia, contém microrganismos hidrolíticos produtores de amilase, porém é um ambiente pouco explorado. Portanto, o screening de microrganismos produtores de amilase foi realizado de biodigestor modelo canadense operado com dejetos bovinos. As análises foram realizadas através de diluição seriada em solução salina 0,9% e cultivadas em ágar amido em aerobiose e anaerobiose. A produção de amilase foi observada quanto à formação de halo ao redor das colônias, por um indicador de amido, solução de iodo 2%. Foram isolados 15 microrganismos potencialmente produtores de amilase, obtidos em pH e temperatura de 7,21 ($\pm 0,2$) e 18,7 °C ($\pm 1,01$), respectivamente. A metodologia empregada foi suficiente para a obtenção de microrganismos produtores de amilase.

Palavras-chave: amylase, biodigestão anaeróbia, enzimas, screening.

Isolation of amylase-producing microorganisms in an anaerobic biodigestion system of bovine manure Isolation of amylase

Abstract: The amylolytic enzymes are biocatalysts that can be applied in different industrial sectors. Bioprocesses, such as anaerobic biodigestion, contain hydrolytic amylase-producing microorganisms, but it is in an unexplored environment. Therefore, the screening of amylase-producing microorganisms was performed using a Canadian model biodigester operating with bovine manure. The analysis were performed by serial dilution in 0.9% saline solution and cultivated on starch agar in aerobiosis and anaerobiosis conditions. Amylase production was observed regarding halo formation around colonies, by a starch indicator, 2% iodine solution. Fifteen potential amylase producers microorganisms were isolated, obtained at 7.21 (± 0.2) pH and a t 18.7 °C (± 1.01) temperature. The methodology used for the production of amylase microorganisms was sufficient.

Keywords: amylase, anaerobic biodigestion, enzymes, screening.

Introdução

As enzimas microbianas hidrolíticas, como as amilases, são biocatalizadores, com aplicabilidade em diversos setores industriais (BHARDWAJ *et al.*, 2021). A biodigestão

¹O presente trabalho foi realizado com o apoio do CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Brasil: (a) Parte do projeto "Produção de biogás a partir de misturas de genótipo de caldo de capim-elefante com esterco bovino", liderado por Marcelo Henrique Otenio; (b) Parte da tese de doutorado de Larice Santana, financiada pela Embrapa, (c) Bolsista da Embrapa.

²Graduando em Engenharia Ambiental e Sanitária – UFJF/Juiz de Fora, MG. Bolsista PIBIC CNPq. e-mail: diego.cunha@engenharia.

³Doutoranda em Ciência Farmacêuticas, UFJF e-mail: laricerende.santana@estudante.ufjf.br

⁴Analista, Embrapa Gado de Leite/ Juiz de Fora, MG, Brasil. e-mail: junior.lima@embrapa.br

⁵Professora, Faculdade de Farmácia – UFJF. e-mail: mirianpereira.rodarte@ufjf.edu.br

⁶Orientador, Embrapa Gado de Leite/ Juiz de Fora, MG, Brasil. e-mail: marcelo.otenio@embrapa.br

anaeróbia (BA) é um bioprocesso que envolve grande diversidade microbiana, possível de ser considerada uma fonte de microrganismos produtores de potencial enzimático hidrolítico, entre outras enzimas (FERREIRA, 2016; MENDONÇA et.al., 2020).

Na indústria farmacêutica, as enzimas microbianas, como a amilase, têm aplicabilidade no desenvolvimento de fármacos e na otimização de processos (BHARDWAJ *et al.*, 2021; GOPINATH, et.al., 2017). O que demonstra a relevância de conduzir pesquisas direcionadas à bioprospecção de microrganismos produtores de amilase em ambientes pouco explorados, como na BA (BHARDWAJ *et al.*, 2021).

Portanto, esta pesquisa tem como objetivo o screening de microrganismos produtores de amilase de biodigestor tipo lagoa coberta (modelo canadense) operado com dejetos bovinos.

Material e Métodos

O screening de microrganismos produtores de amilase foi realizado de amostras de água de lavagem do piso free-stall, antes do separador de sólidos e do efluente de biodigestor tipo lagoa coberta (modelo canadense), plug flow, operado à temperatura ambiente em processo de BA de dejetos bovinos em escala real na fazenda experimental da Embrapa Gado de Leite, em Coronel Pacheco, MG, Brasil.

As coletas foram realizadas, entre junho e julho de 2022 (4 semanas), em frascos estéreis na rotina de funcionamento do biodigestor, considerando a estabilidade do processo de BA (CHERNICHARO, 1997). Transportadas, assepticamente, em caixa térmica até o Laboratório de Microbiologia do Rúmen, na sede da EMBRAPA Gado de Leite em Juiz de Fora, MG, Brasil.

As amostras foram analisadas com microbiologia clássica, através do método de diluição seriada em solução salina 0,9% (MANNI; FILALI-MALTOUF, 2022). As amostras da água de lavagem do piso, antes do separador de sólidos em diluições 10⁻², 10⁻⁴ e 10⁻⁶, e as amostras do efluente do biodigestor de 10⁻² a 10⁻⁴.

As amostras (0,1 mL) foram inoculadas por espalhamento superficial, com auxílio de alça de Drigalsky, em duplicata no meio de cultura ágar amido (contendo por litro 5 g de amido, 5 g de peptona, 5 g de NaCl, 3 g de extrato de levedura e 20 g de ágar, pH 7) e incubadas a 37 °C por 48 horas em aerobiose e anaerobiose (D'ROSE; JOHNY; BHAT, 2019; NAVABHARATH *et al.*, 2017). Após a incubação a produção de amilase foi observada quanto à formação de halo ao redor das colônias, por um indicador de amido, solução de iodo 2% (PRANAY *et al.*, 2019). As colônias produtoras de amilase foram subcultivadas em ágar Brain Heart Infusion (BHI), passadas para 500 µL de caldo BHI e após 24 horas de crescimento, foi adicionado 500 µL de glicerol 40% e preservados em triplicata a -20 °C.

Os isolados armazenados serão utilizados na próxima fase do projeto onde serão caracterizadas a capacidade individual de produção e a concentração de enzima de cada isolado.

Resultados e Discussão

O isolamento de microrganismos produtores de amilase de ambiente (manejo de dejetos) onde a temperatura no momento da coleta era de 18,7 °C (±1,01) demonstrou que é possível

isolar esses microrganismos hidrolíticos em diferentes faixas de temperatura (Tabela 1). Dado que outros trabalhos referem que seus microrganismos produtores de amilase foram isolados em temperaturas maiores que 30°C (CARRASCO *et al.*, 2016; AWASTHI *et al.*, 2017; ASRAT & GIRMA, 2018).

Tabela 1: Resultado microrganismos amilolíticos cultivados próximos ao neutro e temperatura média do dia.

Coleta	Amostra	pH	Temperatura (°C)	Diluição	Condição de cultivo	Isolados
Semana 1	água de lavagem do piso free-stall	7,41	19,0 °C	10 ⁻²	Aerobiose	4
	efluente do biodigestor	7,03		10 ⁻²	Aerobiose	3
Semana 2	água de lavagem do piso free-stall	7,40	17,0 °C	10 ⁻⁴	Aerobiose	1
	efluente do biodigestor	7,00		10 ⁻²	Aerobiose	3
				10 ⁻⁴	Aerobiose	1
Semana 3	água de lavagem do piso free-stall	7,43	19,7 °C	10 ⁻²	Aerobiose	1
	efluente do biodigestor	7,06		10 ⁻³	Aerobiose	1
Semana 4	efluente do biodigestor	7,13	19,0 °C	10 ⁻²	Anaerobiose	1

Das oito amostras coletadas, foram isolados 15 microrganismos produtores de amilase, em pH 7,21 ($\pm 0,2$), que reforça a faixa de pH (4 a 10) de isolamento deste microrganismo (Tabela 1) (AWASTHI *et al.*, 2017).

A diferença da quantidade de isolados de acordo com o local de amostragem demonstrou a eficiência do processo de BA na degradação de matéria orgânica e seleção de microrganismos hidrolíticos, entre os quais produtores de amilase (Tabela 1). Devido a relação com diferentes características e fases do bioprocesso presente em cada ambiente (ASRAT & GIRMA, 2018).

Conclusões

A metodologia empregada demonstrou ser capaz de isolar microrganismos produtores de amilase. Portanto, obtivemos resultados positivos, que viabilizam a continuação da pesquisa.

Agradecimentos

Ao financiamento ao projeto SEG 20.018.01.016.00.07.004.

Referências

- ALMEIDA, P.Z.de, PEREIRA, M. G., CARVALHO, C. C., HEINEN, P. R., ZIOTTI, L. S., MESSIAS, J. M., JORGE, J. A., POLIZELI, M. L. T. M. Bioprospection and characterization of the amylolytic activity by filamentous fungi from Brazilian Atlantic Forest. **Biota Neotropica [online]**, v. 17, e20170337, 2017. doi: 10.1590/1676-0611-BN-2017-0337.
- ASRAT, B, GIRMA, A. Isolation, production and characterization of amylase enzyme using the isolate *Aspergillus niger* FAB-211. **Academic Journals**. v. 9, p 7-14, 2018. doi: 10.5897/IJBMBR2018.0289
- BHARDWAJ, N., KUMAR, B., AGRAWAL, K., VERMA, P. Current perspective on production and applications of microbial cellulases: a review. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 6, Article 95, 2021. doi: 10.1186/s40643-021-00447-6
- CALZA, L. F. *et al.* Avaliação dos custos de implantação de biodigestores e da energia produzida pelo biogás. **Engenharia Agrícola [online]**. v. 35, 2015. doi: 10.1590/1809-4430-Eng.Agric.v35n6p990-997/2015
- CARRASCO, M., VILLAREAL, P., BARAHONA, S., ALCAÍNO, J., CIFUENTES, V., BAEZA, M. Screening and characterization of amylase and cellulase activities in psychrotolerant yeasts. **BCM Microbiology**, v. 16, Article 21, 2016. doi: 10.1186/s12866-016-0640-8
- CHERNICHARO, C. AU. L. **Reatores Anaeróbios**. 5. ed. [S.l: s.n.], 1997. 245 p. .85-7041-130-8.
- D'ROSE, V., JOHNY, T., BHAT, S. Comparative analysis of metagenomic DNA extraction methods from gut microbiota of zebrafish (*Danio rerio*) for downstream next-generation sequencing. **Journal of Applied Biology and Biotechnology** v. 7, p.11-15, 2019. doi: 10.7324/JABB.2019.70103
- FERREIRA, M. S., BRANCO, P. M. P., NOGUEIRA, R. G. S. Avaliação da adição de biorremediador para a produção de biogás em biodigestores contínuos abastecidos com dejetos de bovino leiteiro. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, v. 14, p. 76, 2016.
- GOPINATH, S. C. B., ANBU, P M. K., VOON, T.L., VOON, C. H., HASHIM U., CHINNI, S.V. Biotechnological Processes in Microbial Amylase Production. **BioMed Research International**, vol. 2017, Article ID 1272193, 9 pages, 2017. doi: 10.1155/2017/1272193
- MENDONÇA, H. V., OTENIO, M. H., PAULA, V. R. Anerobic digestion for production renewable energy. **Tecnologias Limpas**, v 14, n. 3, p. 793-805, 2021.