



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI
CAMPUS ALTO PARAÓPEBA
CURSO DE ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS

**Isolamento de microrganismos com atividades enzimáticas de interesse
biotecnológico a partir do sistema digestivo de peixes *Prochilodus lineatus***

Samille Henriques Pereira

Orientador: Boutros Sarrouh

Ouro Branco
Novembro, 2016

Isolamento de microrganismos com atividades enzimáticas de interesse biotecnológico a partir do sistema digestivo de peixes *Prochilodus lineatus*

Samille Henriques Pereira

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado em cumprimento às exigências do Curso de Bacharelado em Engenharia de Bioprocessos da Universidade Federal de São João del Rei.

Orientador: Boutros Sarrouh

Ouro Branco
Novembro, 2016



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI
CAMPUS ALTO PARAÓPEBA
CURSO DE ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS

Isolamento de microrganismos com atividades enzimáticas de interesse biotecnológico a partir do sistema digestivo de peixes *Prochilodus lineatus*

Samille Henriques Pereira

A Banca Examinadora, composta pelos membros abaixo, avaliou este TCC:

Boutros Sarrouh – Orientador

José Carlos de Magalhães – Examinador

Enio Nazaré de Oliveira Junior – Examinador

Ouro Branco, 28/11/2016

RESUMO

O Brasil possui um potencial significativo para a piscicultura, devido a sua grande extensão territorial e a grande quantidade de águas doces. Os microrganismos isolados de ambientes aquáticos apresentam um alto potencial biotecnológico. Os peixes Curimbatás são abundantes e correspondem a maior parte da biomassa ictiológica de grandes massas de água. O aumento no consumo de peixes pela população mundial gera uma quantidade significativa de resíduos provenientes do processo de evisceração, provocando dessa forma danos ambientais. Sendo assim, esse trabalho teve por objetivo isolar e identificar microrganismos, com potencial para uso industrial, encontrados no trato digestivo do peixe Curimbatá. Inicialmente, o trato digestivo foi colocado em uma solução salina e em seguida foi retirada uma alíquota e inoculada em placas Petri com meio ágar-nutritivo. As colônias isoladas foram identificadas bioquimicamente pelo teste de coloração Gram e pelo crescimento em meios seletivos (Ágar Eosina, Simmons Citrate e Ágar Manitol). Dentre as cinco colônias isoladas denominadas BI1, BI2, BI3, LE1, BE2, foram identificadas microscopicamente quatro bactérias e uma levedura. Duas bactérias (BI1 e BE2) apresentaram uma coloração violeta (Gram-positiva) e duas (BI2 e BI3) uma coloração vermelha (Gram-negativa). As bactérias BI1 e BE2 fermentaram o meio ágar manitol e apresentaram coloração amarela, indicando serem estafilococcus positivo para coagulase, já a bactéria BI3, após a fermentação, apresentou coloração rosa, indicando estafilococcus negativo para coagulase. A levedura LE1 cresceu no meio ágar Eosina/Lactose, indicando ser capaz de fermentar lactose. Em relação à atividade enzimática, BI1, BI3 e LE1 apresentaram atividade tanásica, da mesma forma todos os microrganismos estudados apresentaram atividade celulolítica e apenas a LE1 apresentou atividade para a enzima fenoloxidase.

Palavras-chave: isolamento de microrganismos, peixe curimbatá, enzimas industriais, testes bioquímicos.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	7
2. OBJETIVOS.....	8
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	8
3.1 Indústria pesqueira no Brasil	8
3.1.1 Potencial biotecnológico dos resíduos gerados pela indústria pesqueira	9
3.1.2 Espécie <i>Prochilodus lineatus</i>	10
3.2 Enzimas.....	11
3.1.1 Tanases.....	13
3.1.2 Celulases	14
3.1.2 Fenoloxidades	15
3.3 Produção de enzimas bactérias	16
3.1.1 Teste de Gram	17
3.1.2 Meios de cultura bacterianos	18
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
4.1 Isolamento e cultivo de bactérias do estômago e intestino do peixe Curimbatá.	19
4.2 Teste de Gram.....	19
4.3 Crescimento em meio seletivo.....	19
4.4 Testes qualitativos de atividade enzimática dos microrganismos isolados ...	20
4.4.1 Atividade Enzimática da Tanase.....	20
4.4.2 Atividade Enzimática da Celulase	20
4.4.3 Atividade Enzimática Fenoloxidasas	20
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	21

5.1 Isolamento e cultivo de bactérias do estômago e intestino do peixe Curimbatá.	21
5.2 Teste de Gram.....	22
5.3 Crescimento em meio seletivo.....	24
5.4 Ensaio da atividade enzimática de microrganismos isolados.....	27
5.4.1 Atividade tanásica.....	27
5.4.1 Atividade celulolítica.....	28
5.4.1 Atividade da enzima fenoloxidasas	30
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	31
7. PERSPECTIVAS PARA TRABALHOS FUTUROS.....	31
8. AGRADECIMENTOS	32
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32

1. INTRODUÇÃO

O Brasil possui um potencial significativo para a piscicultura, devido à vasta extensão territorial que dispõe de aproximadamente 13% das águas doces do planeta, pelas condições naturais e pelo clima favorável para o desenvolvimento de uma diversidade de espécies aquáticas, disponibilidade de infraestrutura de apoio e outras condições.

Cada vez mais os peixes são introduzidos na dieta da população e isso gera um aumento da produção e do consumo de pescado pela indústria pesqueira. Esse aumento está diretamente relacionado à geração de resíduos proveniente do processamento do peixe para consumo, sua evisceração, com ônus ambiental.

O sistema digestivo dos peixes é considerado como uma fonte promissora para o isolamento de microrganismos com atividade enzimática de interesse industrial, a utilização de enzimas digestivas como catalisadores de processos industriais é de fundamental importância para a obtenção de produtos de alta qualidade e de maior valor agregado através da utilização de tecnologias limpas, e em sintonia com as necessidades tecnológicas, de mercado e de preservação ambiental que norteiam os processos produtivos internacionais. Os Curimatás (*Prochilodus lineatus*) são peixes abundantes e correspondem à maior parte da biomassa ictiológica dos grandes corpos de água. São peixes detritívoros, alimentam-se de restos orgânicos, como sedimentos orgânicos e vegetais.

As enzimas apresentam características que se destacam quando comparadas aos catalisadores químicos devido a sua especificidade pelo substrato ou por uma reação bioquímica. O setor industrial sofre constante pressão para utilização de processos que beneficiam o meio ambiente, tornando assim seu produto mais competitivo. Com isso, o uso de enzimas nos diferentes segmentos da indústria tem sido amplamente estudado.

Entre as enzimas de interesse industrial produzidas por bactérias e avaliadas neste estudo estão as celulasas utilizadas na degradação de biomassa ligocelulósica, as tanases que hidrolisam ésteres e ligações laterais de taninos hidrolisáveis e as fenoloxidasas que degradam lignina, estas de grande interesse para o uso em biorrefinarias.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Isolar microrganismos do sistema digestivo de peixe *Prochilodus lineatus* e a expressão das enzimas tanase, celulase e fenoloxidase pelos mesmos.

2.2 Objetivos específicos

- Isolar e cultivar de microrganismos do estômago e intestino do peixe Curimbatá;
- Identificar bioquimicamente os microrganismos isolados pelo teste de Gram;
- Avaliar o crescimento microbiano em meios seletivos;
- Avaliar da atividade tanásica, celulolítica e da enzima fanoloxidase dos microrganismos isolados.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Indústria pesqueira no Brasil

O Brasil é uns dos países que possuem o maior número de água doce do planeta, tendo um grande potencial para a piscicultura, pelas condições naturais, pelo clima favorável e pela sua matriz energética. Este potencial está relacionado à sua extensão costeira de mais de oito mil quilômetros, à sua zona econômica exclusiva (ZEE) de 3,5 milhões de km² e à sua dimensão territorial, que dispõe de, aproximadamente, 13% da água doce renovável do planeta. Além disso, possui um clima favorável ao desenvolvimento de uma diversidade de espécies aquáticas, disponibilidade de infraestrutura de apoio e outras condições favoráveis, possui, portanto, um grande potencial de mercado para a produção pesqueira quanto para produtos advindos da piscicultura. (SOUZA et al., 2013).

O pescado tem sido cada vez mais utilizado pela população, contribuindo para manutenção de uma boa saúde humana, por constituir uma fonte de proteína animal balanceada. O peixe faz parte da dieta de muitos países, por apresentar alta qualidade e proteínas de fácil absorção, além de uma grande variedade de vitaminas e minerais, contribuindo assim com ¼ da oferta mundial de proteína animal. Além do que, peixes, moluscos, crustáceos e bivalves são fontes relevantes de emprego em indústrias de processamento e de lucro para pescadores artesanais e industriais (FAO, 2012).

No Brasil o consumo de pescado ainda é baixo comparado aos outros países. A média de consumo da população brasileira é de 11,17 kg por habitante/ano, enquanto o recomendado é de 18 kg por habitante/ano. Porém esse mercado tem experimentado expansão sem precedentes e mudança nos padrões alimentares, tornando-se mais homogêneo e globalizado. As previsões de consumo realizadas em 2013 é que deve chegar a 20 kg por habitante/ano nas próximas décadas, com produção estimada de mais de 160 milhões de toneladas (FAO, 2012). O consumo de produtos à base de pescado também deve aumentar por razões socioeconômicas, cultural, de saúde ou religiosas. Essa tendência vem sendo observada e, atualmente, quase metade da produção de pescado já é originada da piscicultura. Assim, o aumento do consumo per capita de pescado será cada vez mais dependente da disponibilidade dos produtos da piscicultura e sua capacidade de adequação às exigências do mercado consumidor (SOUZA et al., 2013).

Com esse grande aumento do consumo de peixes e de produtos a base de pescado, ocorre um aumento considerável da geração de resíduos com ônus ecológico gerado pela poluição oriunda de seu processamento, visto que ao realizar a limpeza do peixe para consumo é realizada evisceração (retirada de órgãos como estômago, intestino e bexiga) (BOUGATEF, 2013). O aumento da produção e do consumo de pescado está diretamente relacionado à necessidade de se viabilizarem tecnologias para o reaproveitamento dos resíduos gerados pela indústria pesqueira (LIMA, 2013).

3.1.1 Potencial biotecnológico dos resíduos gerados na indústria pesqueira

À cada dia estudos apontam o potencial biotecnológico de microrganismos isolados de ambientes aquáticos. A causa do aumento desses estudos está relacionada a uma aceleração na investigação pesqueira e nos sistemas de piscicultura intensiva, além do comércio internacional de animais aquáticos vivos e produtos, e o surgimento de novas doenças (BULLER, 2004).

As fontes aquáticas para obtenção de microrganismos de interesse é vasta, podem ser provenientes de peixes de aquário, peixes tropicais e animais aquáticos cultivados, tais como ostras, cavalos marinhos, lagosta, lagostim e camarões. Todos estes hospedeiros têm a sua própria microbiota e potencial de patógenos bacterianos e são encontrados em uma grande variedade de habitat nos mais diversos climas (BULLER, 2004).

Os peixes, assim com outros animais aquáticos, estão predispostos a infecções bacterianas da mesma maneira como os animais terrestres. As doenças podem ocorrer sistemicamente ou limitar-se a superfícies externas. Além das bactérias patogênicas também é possível encontrar as que fazem parte da flora bacteriana normal dos animais aquáticos (BULLER, 2004).

Com o problema do aumento de resíduos gerados pela indústria de pescados, várias pesquisas vêm sendo realizadas para possibilidades de aplicações biotecnológicas para esses subprodutos (MARCHUSCHI et al., 2010; JUNIOR et al., 2012; COSTA et al., 2013; SILVA et al., 2011)

3.1.2 Espécie *Prochilodus lineatus*

A espécie *Prochilodus lineatus* (Figura 1), é um peixe de água doce, conhecido com Curimbatá, porém pode receber outros nomes como Curibatá, Curimatá, Curimatã, Curimataú, Curimba, Curumbatá e Crumatá. Habita tanto o fundo dos rios como as margens. Sua desova total ocorre a partir de novembro, que realiza a piracema (período em que os peixes sobem para a cabeceira dos rios para realizar sua reprodução). Sua primeira maturação sexual ocorre em indivíduos com cerca de 24 cm de comprimento. É encontrado no sul da América, entre Paraná e o Paraguai e também nas extensões do rio Paraíba do Sul. O máximo comprimento já registrado na literatura é de 74 cm (CASTRO, VARI, 2011).

É um peixe que se alimenta de restos orgânicos, consumindo a vasa do fundo dos rios, como sedimentos orgânicos e vegetais. Um estudo realizado por MORAES e colaboradores (1997), mostra que a maior parte da alimentação destes peixes é composta por sedimentos e algas de diversas espécies.

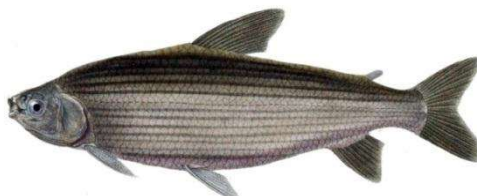


Figura 1: Espécie *Prochilodus lineatus*. Fonte: WIKIMEDIA COMMONS.

A utilização de órgãos do sistema digestivo para obtenção de microrganismos e consequentemente obtenção de enzimas de interesse se torna uma alternativa promissora. A utilização de enzimas digestivas como catalisadores de processos industriais é de fundamental importância para a obtenção de produtos de alta qualidade

e de maior valor agregado através da utilização de tecnologias limpas, e em sintonia com as necessidades tecnológicas, de mercado e de preservação ambiental que norteiam os processos produtivos internacionais (POLITZER, BON, 2006).

3.2 Enzimas

As enzimas são definidas como catalizadores biológicos, geralmente de natureza proteica. São moléculas que aceleram reações termodinamicamente favoráveis, sendo versáteis e de elevada importância nos processos biotecnológicos (COELHO, SALGADO, RIBEIRO, 2008). Pode-se dizer que as enzimas são as moléculas usadas há mais tempo pelo homem, como na produção de pães e vinhos, mesmo que inconscientemente (MONTEIRO, SILVA, 2009).

Nas indústrias as enzimas apresentam características importantes em relação aos catalizadores químicos devido a sua importância na redução de efluentes pesados, inexistência de toxidez, baixa concentração e reações em temperaturas e pH brandos (COELHO, SALGADO, RIBEIRO, 2008). A cada dia é possível notar mais processos industriais que utilizam enzimas como catalizadores, com isso existe um aumento mundial no consumo de enzimas industriais (MONTEIRO, SILVA, 2009).

Esses biocatalizadores, podem ser obtidos de tecidos vegetais, animais e de microrganismos, sendo este último o mais utilizado, pela sua produção independente de fatores sazonais, possibilidade de utilização de substratos baratos e pelo alto rendimento na produção a partir da otimização dos processos fermentativos (MONTEIRO, SILVA, 2009).

As enzimas mais utilizadas na indústria são as hidrolíticas, proteolíticas, lipolítica e aminolíticas (TAVARES et al., 2012).

O mercado está dividido em enzimas industriais e especiais, sendo as enzimas industriais representam 60% do mercado, a utilização destas enzimas está dividida em maior número para as indústrias farmacêuticas, indústrias de processamento de amido, pesquisa e biotecnologia, processamento de alimentos e bebidas, papel e celulose, biocombustíveis, biorrefinaria e rações animais (MONTEIRO, SILVA, 2009).

Alguns exemplos da utilização desses biocatalizadores que podem ser citados são a sua aplicação em indústrias têxtil por serem utilizadas durante o processamento de fibras, reduzindo o volume e o conteúdo poluente dos efluentes, sendo uma grande vantagem em cima dos métodos químicos (ANDREAUS et al., 2008). Na indústria de couro as proteases degradam a queratina e a elastina presente, também podem ser

utilizadas em indústrias de detergentes. As celulasas podem ser utilizadas na indústria de papel e celulose, substituir o uso de pedra polmes na fabricação de jeans. Outra importante utilização está nas indústrias alimentícias, como por exemplo, o uso de amilases e proteases na panificação, na produção de leites e derivados (ORLANDELLI et al., 2012). As lipases são amplamente utilizadas nas indústrias de química fina, tratamento de água residual, cosmética e ensaios biomédicos ((BURKERT, MAUGERI, RODRIGUES, 2004; ELIBOL, OZER, 2000; KAMINI et al., 2000).

América Latina representa 3,4% da demanda mundial de enzimas, sendo que o Brasil ocupa 60% dessa parte. O Brasil apresenta ainda um número reduzido de utilização nos processos industriais quando comparado a países desenvolvidos. Hoje é um país importador de enzimas, mesmo apresentando um alto potencial para produzi-las por possuir uma grande variedade biológica e uma abundância de materiais orgânicos (resíduos agrícolas, como, a palha de arroz, o bagaço de cana, dentre outros) que podem ser utilizados como substratos de baixo custo. Porém, esse cenário pode mudar através do avanço no mercado de biocombustíveis, além de novas leis e parcerias entre o setor privado e as universidades (MONTEIRO, SILVA, 2009; BON, FERRARA, CORVO, 2008).

O mercado mundial de enzimas industriais alcançou um valor de US\$ 3,3 bilhões em 2010 (BBC RESEARCH, 2011). Os principais produtores de enzimas estão localizados na Europa, Estados Unidos e Japão. O ritmo de desenvolvimento em mercados emergentes sugere que as empresas da Índia e da China participem deste grupo restrito em um futuro muito próximo (SAHA, 2004).

Setores como a indústria farmacêutica e de bioetanol chamaram atenção significativa dos investidores por serem autossuficientes no desenvolvimento de novos produtos, oferecendo novas oportunidades para os fabricantes de enzimas industriais. Enquanto empresas de tratamentos químicos, tratamento de efluentes e de papel e celulose, não têm recursos para o desenvolvimento de novos produtos, despertando menos interesse da indústria de biocatalizadores (WALTON, BANERJEE, SCOTT-CRAIG, 2010).

3.2.1 Tanases

A tanase é uma enzima que hidrolisa ésteres e ligações laterais de taninos hidrolisáveis, como ácido tânico, em glicose e ácido gálico. É uma enzima extracelular, induzível pela presença de ácido tânico, por fungos, bactérias e leveduras, tanto em

fermentação sólida, quanto em líquida ou submersa (MUKHERJEE, BANERJEE, 2006).

A tanase apresenta duas isoformas, uma possui maior atividade sobre a ligação éster entre o anel aromático e o resíduo de glicose e a outra possui maior atividade sobre a ligação éster entre os anéis aromáticos, conforme mostrado na Figura 2 (BATTESTIN, MATSUDA, MACEDO, 2004).

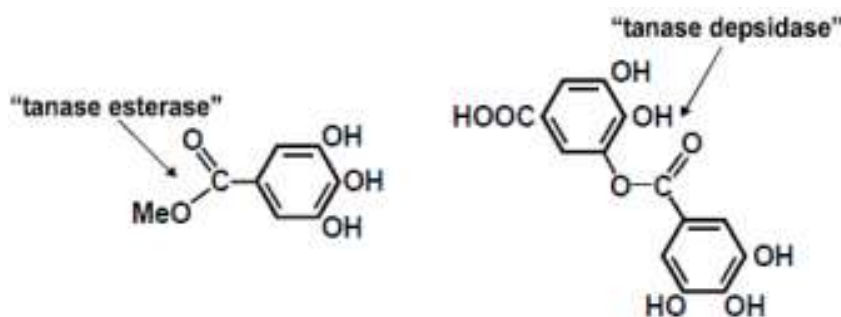


Figura 2: Atividade esterase e depsídica (BATTESTIN, MATSUDA, MACEDO, 2004)

A tanase pode ser obtida de fontes vegetais, animais e microbiana, sendo a microbiana a maior fonte de obtenção. Os microrganismos podem ser cultivados em larga escala em curtos períodos de tempo, tendo assim uma produção contínua em altas quantidades, além do que enzimas produzidas por microrganismos são mais estáveis (MACEDO, MATSUDA, MATTESTIN, 2005).

Uma de suas aplicações industriais é na indústria de sucos, uma vez que pela alta concentração de taninos depois de armazenados, os sucos começam a apresentar escurecimento, formação de sedimentos, gosto amargo e adstringência, com isso o tratamento enzimático consegue reduzir esses efeitos de forma bem mais eficaz que processos convencionais (AGUILAR et al., 2007). Outra aplicação na indústria alimentícia está na produção de chás instantâneos, eliminando complexos solúveis indesejados devido à complexação de polifenóis poliméricos presentes no chá com a cafeína, formados quando a bebida atinge temperaturas inferiores a 4°C. Este problema pode ser resolvido com adição de compostos químicos, porém esta técnica influencia negativamente na qualidade final da bebida. Em contrapartida, o emprego da tanase promove a diminuição da turbidez, aumento da solubilidade em água e preserva os conteúdos aromáticos do chá (BATTESTIN, MATSUDA, MACEDO, 2004; PINTO et al., 2005). Assim como na fabricação de vinho, onde a tanase pode ser utilizada para

remover os compostos fenólicos que se oxidam e causam turbidez indesejável à bebida (BATTESTIN, MATSUDA, MACEDO, 2004).

Outra aplicação da tanase se refere ao tratamento de efluentes proveniente do processamento de couro. Estes efluentes possuem alta carga de taninos e polifenóis que são altamente poluentes. A tanase constitui uma alternativa eficiente para a remoção destes compostos (GONÇALVES, 2010).

Produção de ácido gálico e propilgalato a partir de produtos ricos em taninos é uma aplicação industrial desejável deste biocatalizador, que são utilizados como conservantes e antioxidantes (AGUILAR et al., 2007).

A tanase tem uma ampla utilização industrial, porém o seu alto custo restringe seu uso. Existem várias pesquisas relacionadas ao isolamento e melhoramento de linhagens para a sua produção. Estudos nessa área aumentaram o uso da tanase nas indústrias (AGUILAR et al., 2007).

3.2.2 Celulases

Celulase é nome dado às enzimas que estão envolvidas na degradação da celulose. Podem ser produzidas por microrganismos em condições de aerobiose ou anaerobiose, e sua importância está na obtenção de açúcares utilizando a celulose como fonte de carbono, hidrolisando a celulose através do rompimento das ligações glicosídicas de suas microfibrilas, obtendo a glicose como produto final (FERREIRA, 2012; DILLON, 2004). A glicose apresenta alto interesse industrial nesse processo devido a sua possibilidade de conversão em etanol (CASTRO, PEREIRA, 2010).

Existem basicamente três classes de celulases, classificadas de acordo com a sua funcionalidade, as endoglucanases, as β -glucosidases e exoglucanases. As endoglucanases iniciam o processo de hidrólise atuando na região interna da estrutura amorfa da fibra celulósica promovendo a hidrólise aleatória da ligação β -(1-4)-glicosídicas liberando oligossacarídeos de diversos graus de polimerização. As exoglucanases agem nas extremidades das fibras de celulose e liberam glicoses solúveis ou celobioses, que são compostos formados por duas unidades de glicose. As β -glucosidases clivam as celobioses, liberando a glicose e finalizando o processo de sacarificação da celulose. Essas enzimas atuam melhor em sinergia do que isoladamente uma das outras (LYND, 2012; HARGREAVES, 2008).

As celulases possuem grande importância econômica por serem aplicadas a uma ampla gama de atividades industriais. As enzimas do complexo celulolítico são

fundamentais para a transformação da biomassa, produção de etanol e bioprodutos (ZHANG et al., 2006). Devido à complexidade da biomassa lignocelulósica, a conversão requer múltiplas atividades enzimáticas. Porém essas enzimas ainda apresentam um alto custo e a redução desses custos é importante para o desenvolvimento industrial. Estratégias para o uso da celulase em biorrefinarias incluem um aumento da produtividade volumétrica das enzimas comerciais, produção das enzimas utilizando substratos mais baratos, produção de coquetéis enzimáticos com maior estabilidade para processos específicos, além de produzir celulases com maior atividade específica sobre substratos sólidos (ZHANG et al., 2006).

Os fungos filamentosos são os mais utilizados para a produção de celulases, porém podem ser produzidas por uma gama de microrganismos, como as bactérias anaeróbicas e aeróbicas (LYND, 2012).

3.2.3 Fenoloxidasas

As fenoloxidasas são enzimas que pertencem ao grupo das metaloenzimas, que são os biocatalizadores capazes de degradar lignina. A lignina é um heteropolímero composto por fenilpropano ligada de forma não hidrolisável formando uma molécula extremamente complexa. A lignina torna a parede celular de vegetais rígida (ARANTES, MILAGRES, 2009; SCHEUFELE, 2011).

As fenoloxidasas são de extrema importância, pois podem ser aplicadas na produção de etanol de segunda geração a partir de resíduos lignocelulósicos, além de degradar poluentes como hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, hidrocarbonetos aromáticos, corantes sintéticos e explosivos (FOLTRAN, 2009).

As fenoloxidasas são divididas em duas classes: as lacases e as tirosinases. As lacases possuem três tipos de átomos de cobre no centro catalítico e possuem ampla especificidade de ação sobre compostos fenólicos ou relacionados. A aplicação das lacases está na deslignificação de resíduos lignocelulósicos para utilização nas indústrias de etanol de segunda geração, também na polpação e branqueamento na indústria de polpa e papel para eliminação da lignina, assim como no clareamento de corantes provenientes da indústria têxtil e também na oxidação de compostos xenobióticos que são encontrados em efluentes (JUNIOR, 2010). Já as tirosinases atuam, sobre os grupos fenólicos, catalisando a orto-hidroilação de monofenóis a catecóis e a desidrogenação dos catecóis a orto-quinonas, sendo que após algumas horas os substratos dessas reações precipitam, favorecendo a aplicação dessa enzima o tratamento de efluentes.

As reações de oxidação dos compostos fenólicos realizados por essa enzima podem ser observado na Figura 3.

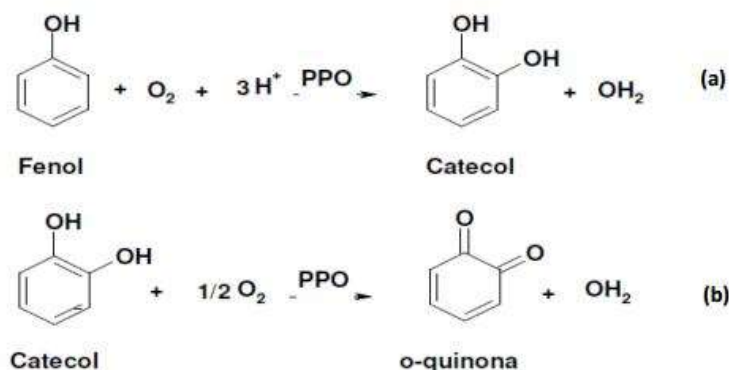


Figura 3: Reação de oxidação de compostos fenólico por Polifenoloxidase, (a) atividade monofenolásica, (b) atividade catecolásica (PIGATTO, 2013).

3.3 Produção de enzimas bacterianas

O domínio *Bacteria* engloba uma diversidade de microrganismos que conseguem utilizar diversas fontes energéticas, apresentando uma grande variedade de vias metabólicas e a capacidade em produzir e degradar vários compostos orgânicos e inorgânicos. São capazes de adaptar aos mais diversos climas e microambientes (GLAZER, NIKAIDO 2007), essa capacidade de adaptação faz com as bactérias consigam suportar alterações de temperatura, pH, pressão, concentração de nutrientes e recursos (MARCIANO, SOARES, BARRETO, 2016).

Os microrganismos sintetizam inúmeros compostos de interesse industrial, como vitaminas, antibióticos, ácidos orgânicos e enzimas. Dentre esses metabólitos, as enzimas são as mais utilizadas em processos industriais.

O uso de microrganismos na produção de biocatalizadores deve respeitar algumas exigências importantes, tais como: não ser patogênicos, não exigir condições de processo muito complexas, não exigir meios de cultura de alto custo, apresentar constância no comportamento fisiológico (VIEIRA, FERNANDES, 2012).

A obtenção de microrganismos produtores de enzimas de interesse industrial pode ser feita de diversas formas, como isolamento de recursos naturais (solo, ar, águas, plantas, alimentos ou órgão), obtenção de mutantes naturais ou induzidos por métodos convencionais ou através de microrganismos recombinantes (VAZ, PRADO, CARVALHO, 2007).

A utilização de meios sólidos se tornou a forma mais eficiente para o isolamento de microrganismos devido ao fato de que as células viáveis originam colônias que podem ser vistas a olho nu e sendo assim as mesmas podem ser transferidas para outro meio fresco sem a presença de outros contaminantes. Mesmo sendo empregadas há mais de 100 anos em bioprocessos, as culturas puras continuam com uma significativa importância econômica (LYND et al., 2008).

Após a obtenção da cultura pura, é necessário avaliar a capacidade do microrganismo na produção de enzimas de interesse com atividades promissoras visando a sua aplicação em processos industriais. Uma forma de avaliação é através de testes bioquímicos, como a coloração de Gram e o crescimento em meios seletivos.

3.3.1 Teste de Gram

O teste de Gram foi desenvolvido em 1884 pelo dinamarquês Hans Christian Gram e até hoje é um dos testes mais simples para divisão das bactérias em dois grandes grupos: Gram-positivas e Gram-negativas. O método consiste em tratar sucessivamente um esfregaço bacteriano, fixado pelo calor, com os reagentes de cristal violeta, lugol, etanol-acetona e fucsina básica. As bactérias que adquirem a coloração azul violeta são chamadas de Gram-positivas e aquelas que adquirem a coloração vermelho são chamadas de Gram-negativas, como pode ser observado na Figura 4. Isso se deve a composição da parede celular, nas bactérias Gram-positivas, a parede celular consiste de muitas camadas de peptidoglicana, formando uma estrutura rígida, com isso a parede retém o cristal violeta no citoplasma, enquanto a parede das Gram-negativas não consegue reter (TORTORA, FUNKE, CASE, 2011).

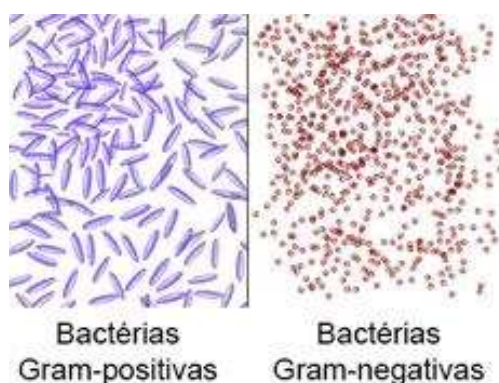


Figura 4: Visualização microscópica de bactérias Gram positivas e Gram negativas.
Fonte: AbcMed

3.3.2 Meios de cultura microbianos

Os meios de cultura são comumente utilizados em laboratórios de pesquisa. A finalidade do meio de cultura é proporcionar os nutrientes necessários às bactérias. Os meios de cultura podem ser encontrados em forma sólida, líquida ou semi-sólida. Os meios de cultura enriquecidos são utilizados para o desenvolvimento de bactérias em geral, pois possui os nutrientes básicos para o crescimento de qualquer microrganismo. Os meios seletivos inibem o crescimento de alguns grupos de microrganismos permitindo assim o crescimento de outros (ANVISA, 2004).

Alguns meios de cultura foram utilizados durante o desenvolvimento deste trabalho e suas principais características estão listadas abaixo.

O meio de cultura Ágar Eosina é utilizado para isolar bactérias Gram negativas encontradas em diferentes amostras, mas principalmente de bacilos entéricos, por conter lactose em sua composição e consegue separar as bactérias em grupos que fermentadores de lactose e não fermentadores. O meio é composto de ágar, lactose, sacarose, fosfato dipotássio, eosina y, azul de metileno e extrato de carne (BD, 2013).

O meio Simmons Citrate teste determina se a bactéria é capaz de utilizar o citrato de sódio como única fonte de carbono para o seu metabolismo e crescimento. Os meios capazes de metabolizar o citrato crescem com exuberância, o meio é alcalinizado e por isso quando ocorre fermentação ele muda sua cor para azul escuro depois de 48 horas. É recomendado para o crescimento de bacilos entéricos Gram negativos. A sua formulação é composta por ágar, di-hidrogenofosfato de amônio, fosfato dipotássico, cloreto de sódio, sulfato de magnésio e azul de bromotimol (ACUMEDIA, 2011).

O Ágar Manitol é um meio utilizado para detecção de estafilococos. Quando ocorre a degradação do manitol em ácidos ele pode produzir duas cores, amarelo ou rosa. É composto por ágar, protease peptona n^o 3, extrato de carne, D-manitol, cloreto de sódio e vermelho de fenol (BRITO, 2010).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Isolamento e cultivo de bactérias do estômago e intestino do peixe Curimbatá

Os órgãos do peixe Curimatá foram conservados em 30 mL de solução salina 0,85%. A partir desta solução, foram realizadas diluições seriadas decimais de 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} . De cada diluição, retirou-se 100µL e transferiu-se para placas de Petri contendo meio Ágar Nutriente, contendo 3 g.L⁻¹ de extrato de carne, 5 g.L⁻¹ de peptona e 15 g.L⁻¹ de ágar. As placas foram incubadas por 5 dias a 36°C. Após o crescimento das bactérias, as colônias foram selecionadas, isoladas e repicadas para placas de Petri contendo o meio Ágar Nutriente.

4.2 Teste de Gram

Para avaliar grande grupo as bactérias isoladas pertenciam, foi realizado o teste de coloração de Gram. Primeiramente foi preparado um esfregaço em uma lâmina de vidro com uma porção de bactérias e uma gota de água destilada, após secar a lâmina foi passada no bico Bunsen para fixação da amostra. Foram adicionadas algumas gotas de cristal violeta por 1 minuto e depois lavou-se com água destilada. Em seguida adicionou-se solução de lugol por 1 minuto e meio e depois lavou-se com água destilada. Rapidamente a lâmina foi lavada com álcool absoluto e posteriormente com água destilada. Adicionou-se corante safranina por 30 segundos e lavou-se novamente com água destilada. As lâminas foram secadas com cuidado para não remover o esfregaço e examinadas em microscópio ótico.

4.3 Crescimento em meios seletivos

Para a caracterização bioquímica das bactérias isoladas, as mesmas foram crescidas em meios sintéticos seletivos. O primeiro meio avaliado foi o Ágar Eosina, composto por 10 g.L⁻¹ de peptona de carne, 3 g.L⁻¹ de lactose, 2 g.L⁻¹ de fosfato dipotássico, 0,4 g.L⁻¹ de eosina Y, 0,065 g.L⁻¹ de azul de metileno, 5 g.L⁻¹ de sacarose e 15 g.L⁻¹ de ágar. O segundo meio foi o Ágar Manitol, composto por 10 g.L⁻¹ de protease peptona nº 3, 1 g.L⁻¹ de extrato de carne, 10 g.L⁻¹ de D-manitol, 75 g.L⁻¹ de cloreto de sódio, 0,02 g.L⁻¹ de vermelho de fenol e 15 g.L⁻¹ de ágar. O terceiro meio foi o Simmons Citrate, composto por 0,20 g.L⁻¹ de sulfato de magnésio, 1 g.L⁻¹ de di-hidrogenofosfato de amônio, 1 g.L⁻¹ de fosfato dipotássico, 5 g.L⁻¹ cloreto de sódio, 2 g.L⁻¹ de citrato de sódio e 0,08 g.L⁻¹ de azul de bromotimol. Após 5 dias inoculadas a 36°C analisou a fermentação de cada colônia nos meios estudados.

4.4 Testes qualitativos da atividade enzimática dos microrganismos isolados

4.4.1 Atividade enzimática da tanase

Para avaliar a atividade da enzima tanase, os microrganismos foram inoculados em meio sintético enriquecido com 1% ácido tânico, composto por: $3,0 \text{ g.L}^{-1} \text{ NaNO}_3$, $1,0 \text{ g.L}^{-1} (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $0,5 \text{ g.L}^{-1} \text{ MgSO}_4$, $0,5 \text{ g.L}^{-1} \text{ KCl}$, $10 \text{ mg.L}^{-1} \text{ FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10 g.L^{-1} ácido tânico, 30 g.L^{-1} ágar, por 5 dias a 36°C . Após este período mediu-se o diâmetro dos halos castanhos formados em voltas das colônias, indicando a degradação do ácido tânico (NADAF, GHOSH, 2011). Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

4.4.2 Atividade enzimática da celulase

Para realizar a avaliação qualitativa da atividade da celulase, os microrganismos isolados foram transferidos com o auxílio de uma alça para o meio sintético Carboximetilcelulose (CMC 1%), composto por: $3 \text{ g.L}^{-1} \text{ NaNO}_3$, $1 \text{ g.L}^{-1} (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $0,5 \text{ g.L}^{-1} \text{ MgSO}_4$, $0,5 \text{ g.L}^{-1} \text{ KCl}$, $10 \text{ mg.L}^{-1} \text{ FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $10 \text{ g.L}^{-1} \text{ CMC}$, 20 g.L^{-1} ágar, por 5 dias a 36°C (BORTOLAZZO, 2011). Para a visualização do halo de hidrólise, a superfície da placa foi coberta com uma solução de vermelho congo 0.1% por 30 minutos, em seguida o excesso foi descartado e a placa foi lavada com uma solução de NaCl 1,0M,. Os halos translúcidos formados, que indicam a atividade da celulase, foram medidos com auxílio de um paquímetro. Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

4.4.3 Atividade enzimática da fenoloxidase

Para avaliar a produção da enzima fenoloxidase, os microrganismos isolados foram incubados em meio ágar malte acrescido de 0,5% de ácido gálico, composto por 30 g.L^{-1} de ágar malte, 5 g.L^{-1} ácido gálico; ágar, durante 5 dias a 36°C . Decorrido este período, mediu-se o diâmetro dos halos de cor âmbar formados em volta da colônia, que comprovam a ação da fenoloxidase (CONCEIÇÃO et al., 2005). Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

4.4.4 Determinação do Índice Enzimático (IE)

Para a determinação enzimática extracelular por difusão radial em meio sólido, avaliou-se a relação direta entre o diâmetro médio do halo de degradação e o diâmetro

médio da colônia expressa como índice enzimático (IE), conforme a Equação 1. Segundo Lealem e Gashe (1994) para considerar um micro-organismo bom produtor de enzimas extracelular o índice enzimático deve ser maior ou igual a 2.

$$IE = \frac{\phi_h}{\phi_c} \quad \text{Equação (1)}$$

Sendo:

ϕ_c : Diâmetro da colônia (cm);

ϕ_h : Diâmetro do halo (cm).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Isolamento dos microrganismos do intestino e estômago do peixe Curimbatá

Após a etapa de isolamento e cultivo dos microrganismos, foram obtidas colônias de cinco cepas diferentes. Estas foram denominadas com os seguintes códigos: BI1 (bactéria 1 isolada do intestino), BI2 (bactéria 2 isolada do intestino), BI3 (bactéria 3 isolada do intestino), LE1 (levedura 1 isolada do estômago) e BE2 (bactéria 2 isolada do estômago). Na Figura 5 encontram-se as colônias isoladas dos órgãos do peixe Curimbatá e seus respectivos códigos.

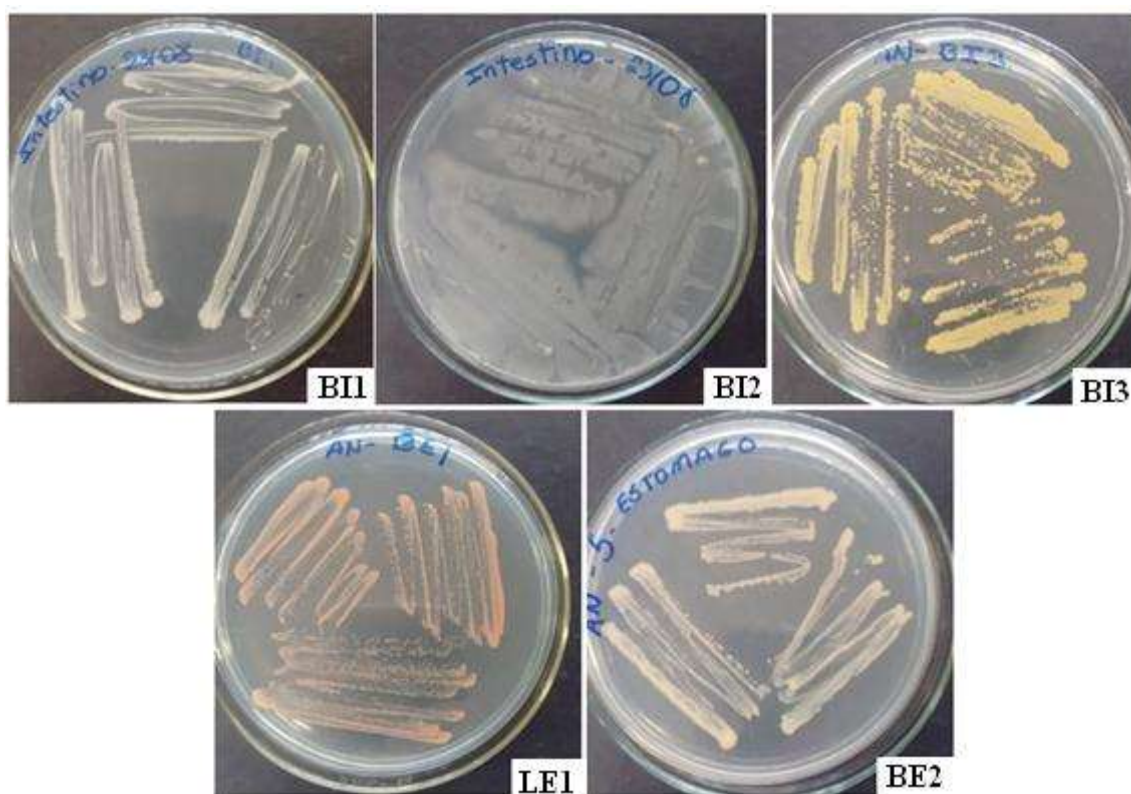


Figura 5: Cepas de microrganismos isolados do intestino e estômago do peixe Curimbatá

5.2 Teste de identificação morfológica

Foram preparados esfregaços com as colônias encontradas e realizada a coloração, logo após as amostras foram observadas em microscópio óptico com aumento de 1000X com a utilização de óleo de imersão. Na Figura 6 é possível observar as imagens obtidas por microscopia e na Tabela 1 os resultados encontrados.

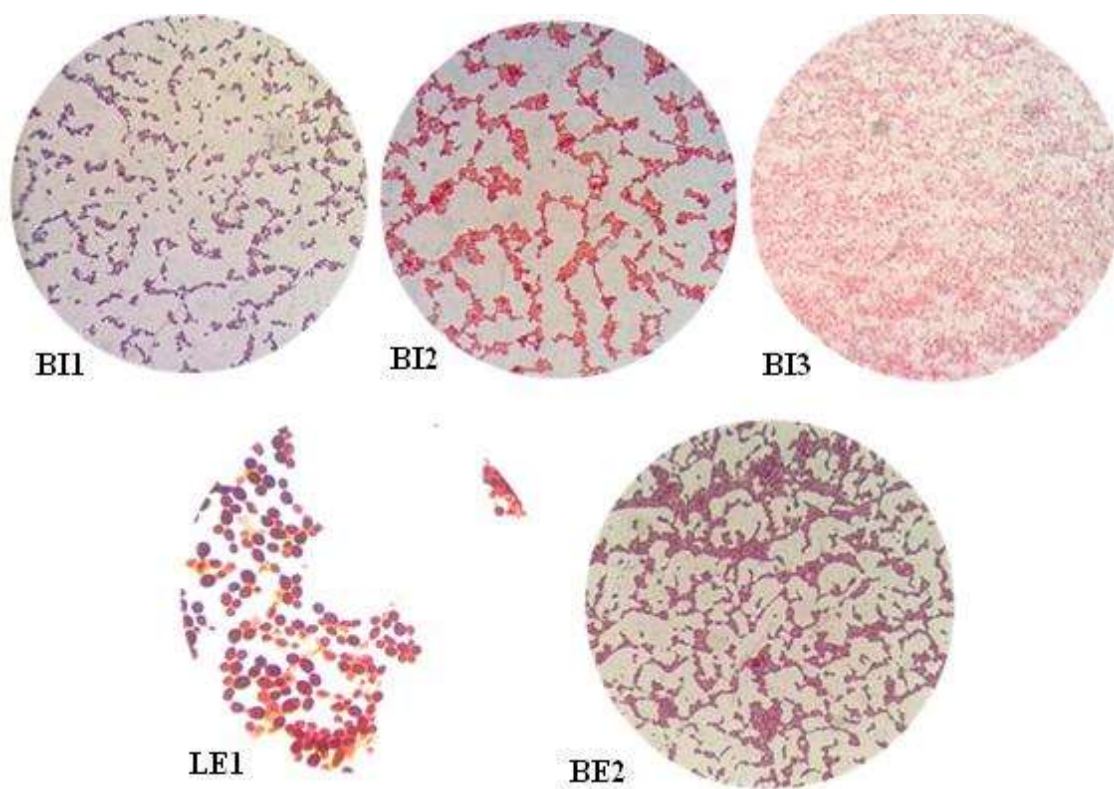


Figura 6: Visualização microscópica da coloração de Gram dos microrganismos isolados.

Tabela 1: Resultado do teste de coloração de Gram para os microrganismos isolados

Microrganismo	Coloração	Classificação
BI1	Roxo	Bactéria Gram Positivo
BI2	Vermelho	Bactéria Gram Negativo
BI3	Vermelho	Bactéria Gram Negativo
LE1	-	Levedura
BE2	Roxo	Bactéria Gram Positiva

Por meio da coloração de Gram, foi possível dividir as colônias encontradas em dois grandes grupos, as Gram-positivas e as Gram-negativas. Observou-se uma heterogeneidade entre as bactérias, visto que duas pertencem às Gram-positivas (BI1 e BE2) e duas às Gram-negativas (BI2 e BI3) (Tabela 1). Ao realizar esse teste também foi possível observar que a colônia LE1, devido à estrutura morfológica e o tamanho das suas células foi possível deduzir ser uma levedura (Figura 6).

5.3 Teste de identificação bioquímica

As cepas foram crescidas em três diferentes meios seletivos a fim de identificar algumas propriedades bioquímicas. Na Figura 7, observa-se o crescimento em meio Ágar Eosina/Lactose, na Figura 8 o crescimento em meio Simmons Citrate e na Figura 9 o crescimento em meio Ágar Manitol.

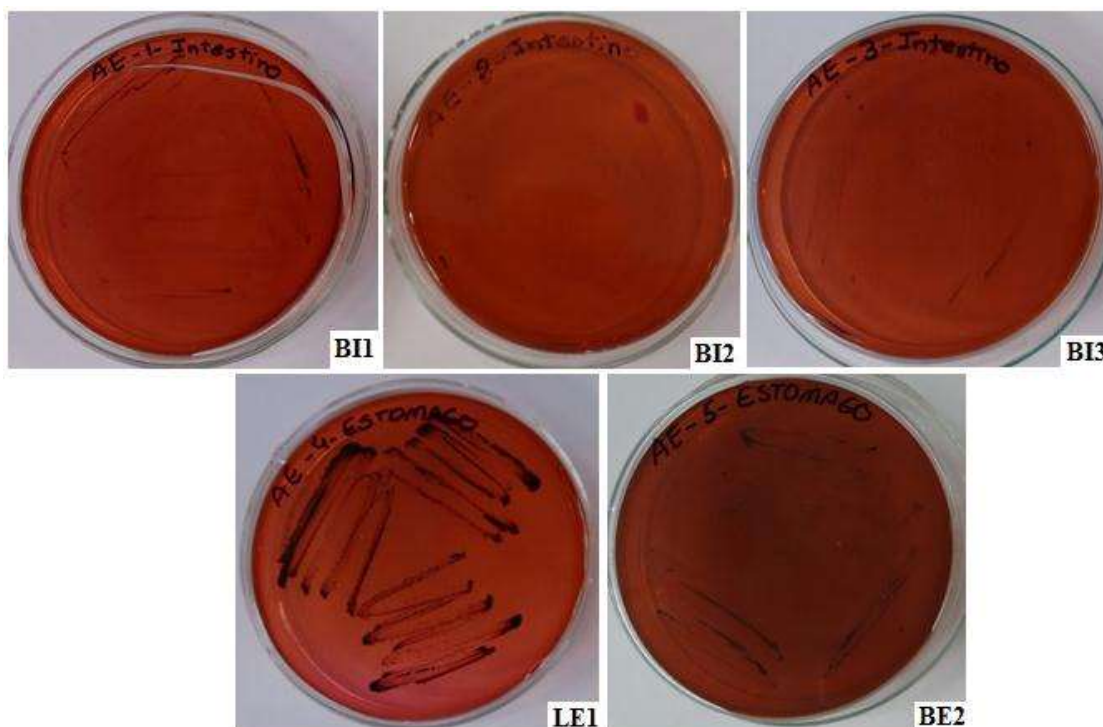


Figura 7: Linhagens dos microrganismos isolados do intestino e estômago do peixe Curimatá após 5 dias de incubação em meio Ágar Eosina/Lactose

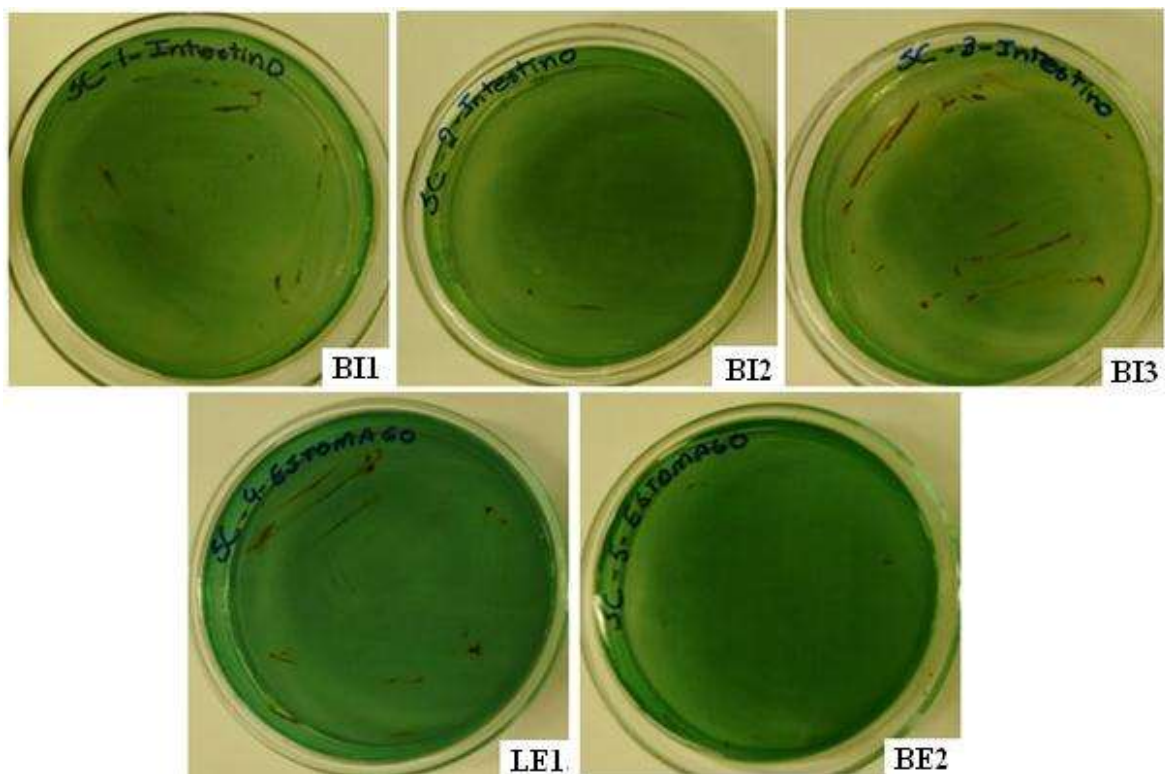


Figura 8: Linhagens dos microrganismos isolados do intestino e estômago do peixe Curimatá após 5 dias de incubação em meio Simmons Citrate

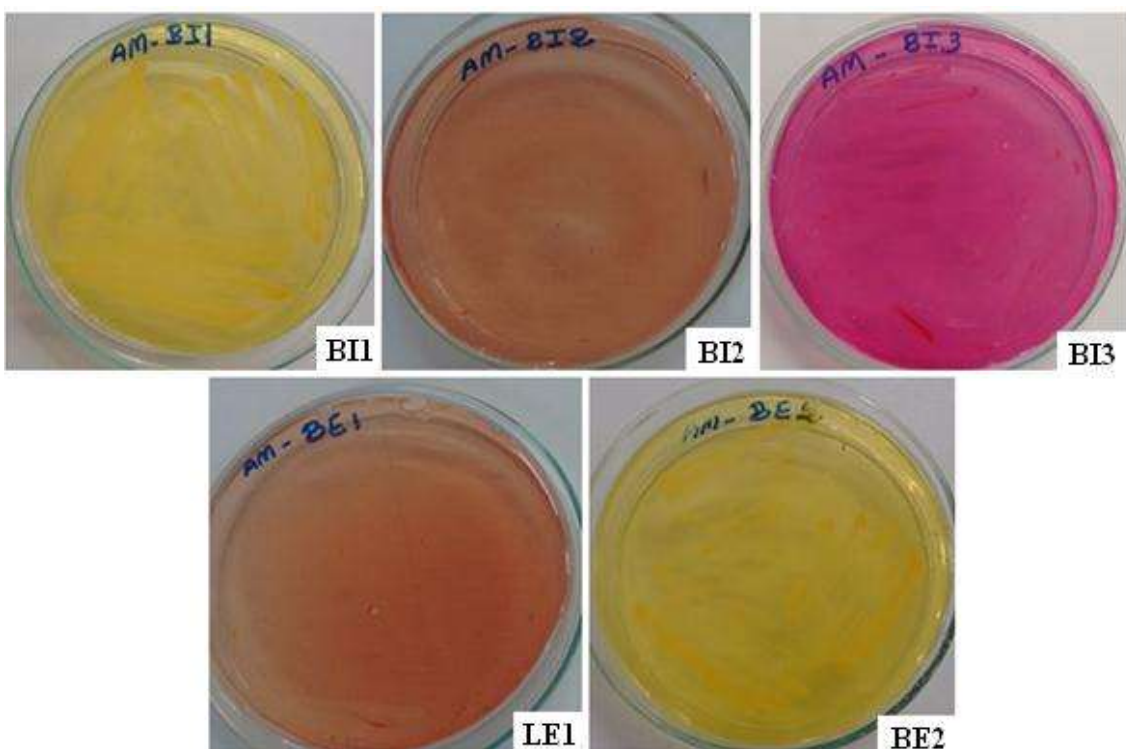


Figura 9: Linhagens dos microrganismos isolados do intestino e estômago do peixe Curimatá após 5 dias de incubação em meio Ágar Manitol

A Tabela 2 apresenta a capacidade de crescimento dos microrganismos isolados nos meios sólidos seletivos estudados.

Tabela 2: Relação do crescimento das cepas isoladas nos meios seletivos, sendo (+) presença de colônias e (-) ausência de colônias.

	BI1	BI2	BI3	LE1	BE2
Ágar Eosina/Lactose	-	-	-	+	-
Simmons Citrate	-	-	-	-	-
Agar Manitol	+	-	+	-	+

Em relação à bactéria BI1, pode-se observar o seu crescimento em meio ágar manitol com mudança da coloração do meio para amarelo, esse resultado indica que a mesma pertence ao grupo de estafilococcus com resultado positivo para o teste de coagulases (Figura 9). Os estafilococcus podem ser divididos em dois grandes grupos, os que produzem as enzimas coagulases e os que não produzem, as enzimas coagulases são extracelulares e coagulam o sangue (ANDRADE et al., 2011). As mesmas observações podem ser feitas com a bactéria BE2, que apresentou crescimento equivalente neste meio, além disso, essas duas bactérias são Gram positivas e suas colônias possuem crescimento e coloração semelhantes em meio ágar nutriente, sendo bem provável que se tratam de bactérias da mesma espécie (Tabela 1). A bactéria BI3 também apresentou crescimento no meio Ágar Manitol, porém apresentou coloração rosa, mostrando pertencer ao grupo de estafilococcus com resultado negativo para a enzima coagulase.

Segundo mostrado na Figura 7, a levedura LE1 apresentou um bom crescimento no meio ágar Eosina/Lactose, mostrando seu potencial em utilizar lactose como fonte de carbono. Sendo que leveduras fermentadoras da lactose possuem a capacidade de promover a fermentação alcoólica. Segundo Embaló (2014), as mesmas poderão pertencer aos gêneros de *Kluyveromyces*, *Debaryomyces*, *Yarrowia*, *Candida* e *Saccharomyces*.

Observa-se que a bactéria BI2 não teve um crescimento visível em nenhum dos meios seletivos estudados (Tabela 2). Da mesma forma, todas as colônias isoladas não apresentaram crescimento no meio Simmons Citrate. O ágar citrato de Simmons é utilizado na identificação de bactérias, principalmente as enterobactérias Gram-negativas, que o citrato utilizam como fonte de carbono. Os indivíduos da família Enterobacteriaceae são bastante conhecidos, alguns pertencem a microbiota normal dos

intestinos de seres humanos e animais como a *Escherichia coli*, outros como habitantes do solo ou da água e outros podem estar implicados em vários processos patogênicos, incluindo, por exemplo, os gêneros *Salmonella*, *Proteus*, *Shigella* e *Yersinia* (ACUMEDIA, 2011).

O crescimento em meios seletivos assim como o teste de Gram possibilita conhecer algumas particularidades dos microrganismos como seu gênero, fontes de nutrientes e divisão em grandes grupos. Porém só por meio de técnicas de biologia molecular é possível identificar as espécies das colônias isoladas.

5.4 Ensaios da atividade enzimática dos microrganismos isolados

5.4.1 Atividade tanásica

Após a incubação das cepas isoladas no meio sintético enriquecido com ácido tânico foi possível observar a formação de halos de coloração castanha nas colônias BI1, BI3 e LE1, como pode ser visto na Figura 10.

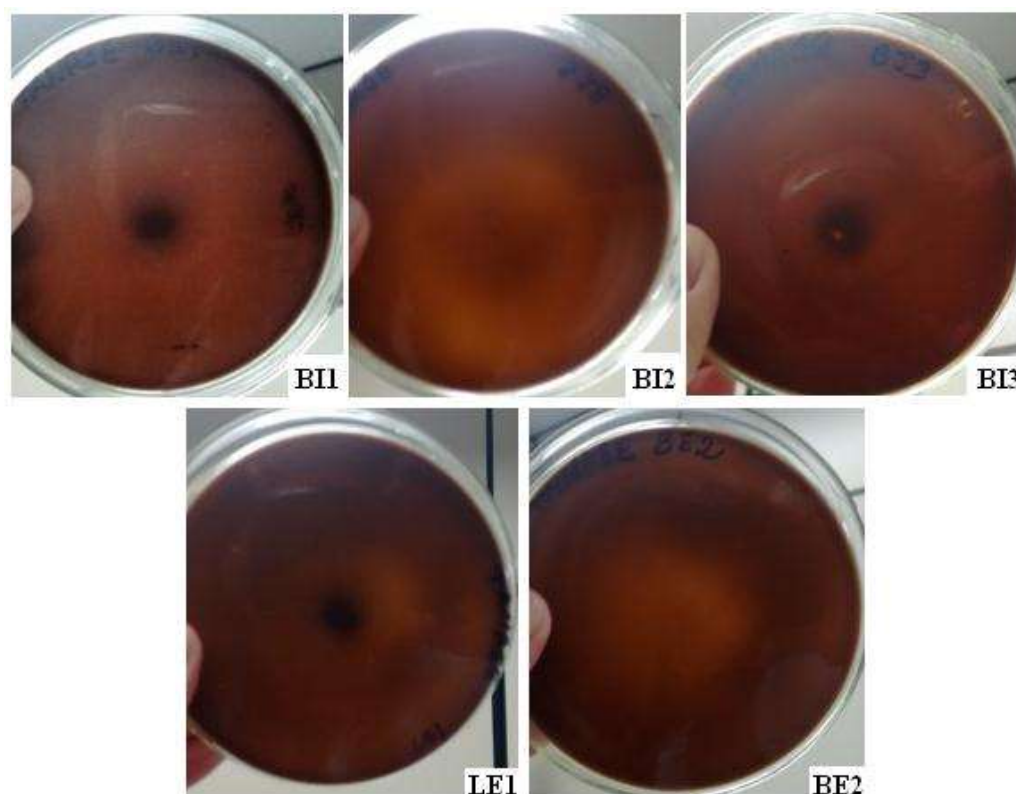


Figura 10: Linhagem de microrganismos isolados do intestino e estômago do peixe Curimatá após 5 dias de incubação em meio sintético contendo 1% ácido tânico (m/m).

A formação de halos de hidrólise pelos microrganismos isolados indica a degradação do ácido tânico e consequentemente a produção extracelular da enzima tanase . O diâmetro dos halos formados pode ser verificado na Tabela 3.

Tabela 3: Tamanho dos halos de hidrólise formados para os microrganismos isolados do intestino e estômago do peixe Curimbatá

Microrganismo	Diâmetro da colônia (cm)	Diâmetro do halo (cm)	Índice Enzimático
BI1	0,6	0,9	1,5
BI2	-	-	-
BI3	0,8	1,0	1,25
BE2	-	-	-
LE1	0,5	0,8	1,6

Para determinação do Índice Enzimático foi utilizada a razão entre o diâmetro do halo e o diâmetro da colônia.

Apesar da produção da tanase pelos microrganismos isolados BI1, BI3 e LE1, segundo Lealem e Gashe (1994) para considerar um microrganismo bom produtor de enzimas extracelulares o seu índice enzimático (IE) deve ser maior ou igual a 2. Nenhuma das cepas apresentou este índice, porém como pode ser observado a cepa que apresentou maior IE foi a levedura isolada do estômago do peixe (LE1) seguida da BI1 (bactéria 1 isolada do intestino do peixe), apresentando um potencial para produção desta enzima.

5.4.2 Atividade celulolítica

Após a incubação das cepas isoladas no meio sintético enriquecido com 1% de carboximetilcelulase foi possível observar a formação de halos de descoloração da solução vermelho congo 0,1% nas colônias BI1, BI2, BI3, LE1 e BE2, conforme observado na Figura 11.

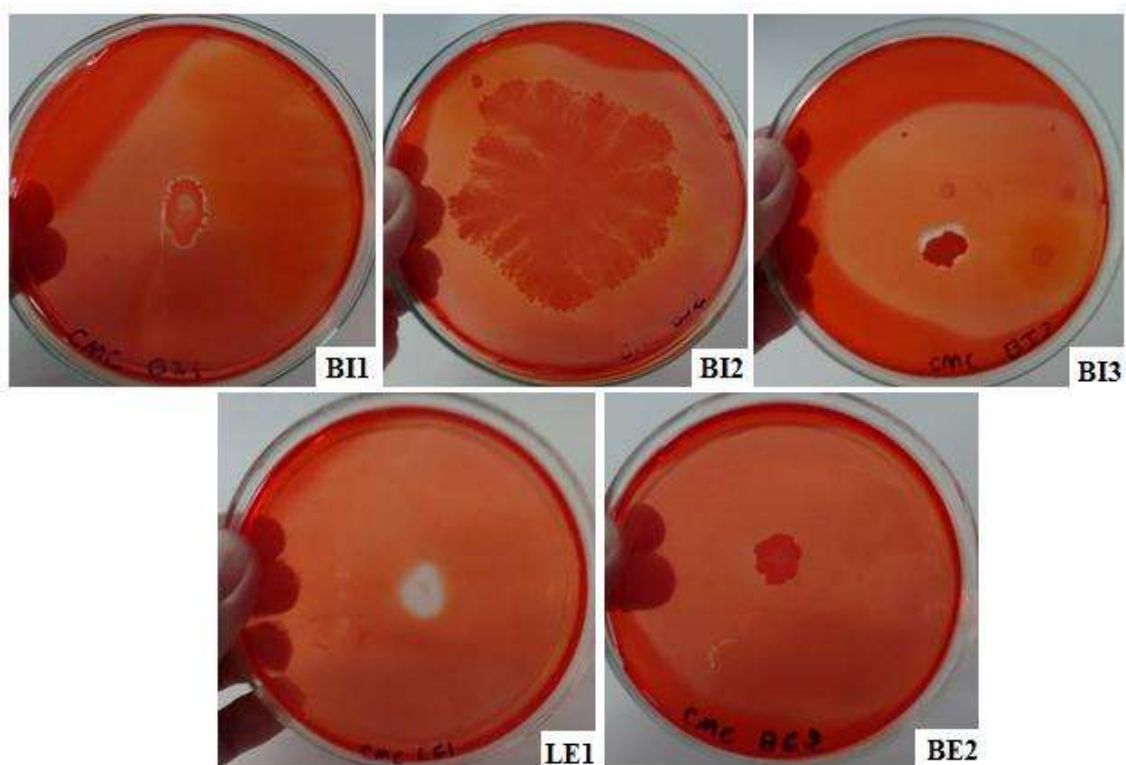


Figura 11: Linhagens dos microrganismos isolados do intestino e estômago do peixe Curimatá após 5 dias de incubação em meio sintético contendo 1% CMC (m/m).

A formação de halos claros no meio com coloração vermelha indica a degradação da celulose, como única fonte de carbono. Os microrganismos apresentaram halos com diâmetros significativos (Tabela 4), indicando uma produção extracelular elevada da enzima celulase. O diâmetro dos halos formados podem ser verificados na Tabela 4.

Tabela 4: Diâmetros dos halos de hidrólise da enzima celulase produzida pelos microrganismos isoladas do intestino e estômago do peixe Curimatá

Colônia	Diâmetro da colônia (cm)	Diâmetro do halo (cm)	Índice Enzimático
BI1	1,8	6,7	3,72
BI2	6,0	9,0	1,5
BI3	1,2	7,5	6,25
LE1	1,0	8,5	8,5
BE2	1,2	7,5	6,25

De acordo os índices enzimáticos apresentados na Tabela 4, observou-se que todas as cepas isoladas apresentaram um bom rendimento para produção da enzima celulase, com destaque para os microrganismos BI3, LE1 e BE2, que foram capazes de produzir um IE (Índice Enzimático) maior que 2,0 (Lealem e Gashe, 1994). Microrganismos degradadores de celulose são considerados de grande interesse industrial, especialmente para as indústrias de papel e celulose e etanol de segunda geração.

5.4.3 Atividade da enzima fenoloxidase

Para identificar as cepas produtoras da enzima fenoloxidase, foi utilizado um meio sólido enriquecido com ácido gálico. A formação de halos de coloração âmbar indica a produção da enzima (Figura 12).

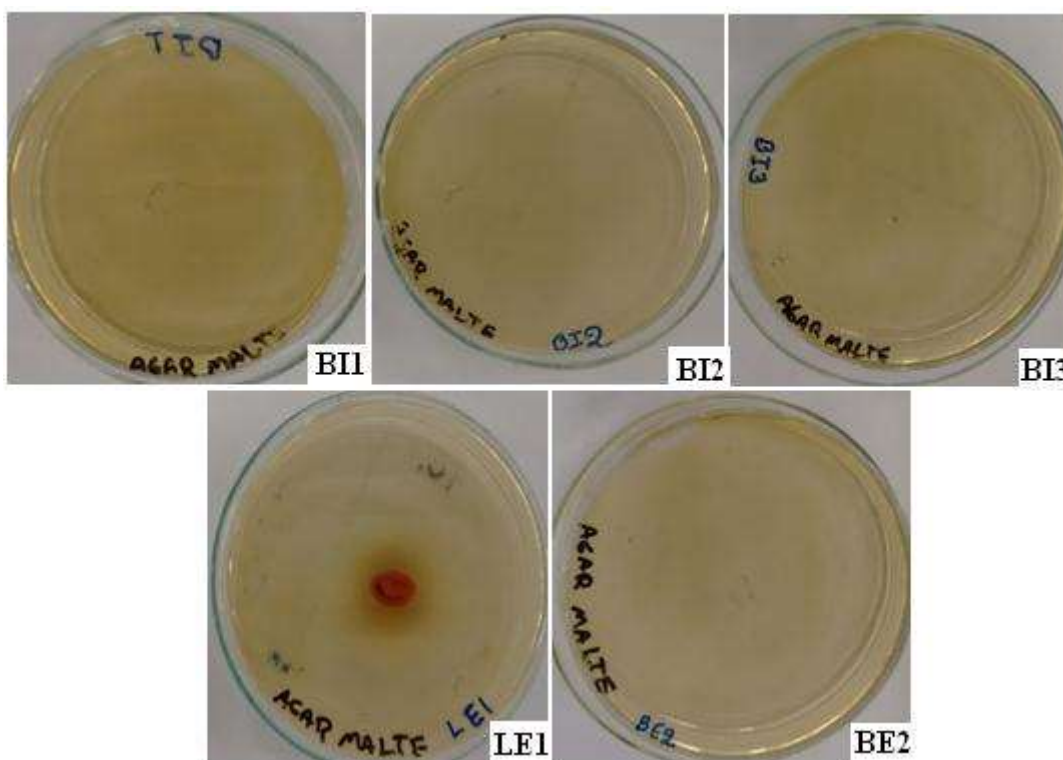


Figura 12: Linhagens dos microrganismos isolados do intestino e estômago do peixe Curimatá após 5 dias de incubação em meio sintético contendo 0,5% de ácido gálico.

Conforme mostrado na Figura 12 observou-se que, a única cepa que apresentou a formação do halo foi a LE1. O diâmetro do halo de hidrólise pode ser conferido na Tabela 4.

Tabela 4: Diâmetro do halo formado Pela levedura LE1 isolada do estômago do peixe Curimatá

Colônia	Diâmetro da colônia (cm)	Diâmetro do halo (cm)	Índice Enzimático
LE1	1,0	2,8	2,8

Segundo mostrado pela Tabela 4, o índice enzimático apresentado pela levedura LE1 foi $> 2,0$, mostrando dessa forma o seu alto potencial para produção dessa enzima. A obtenção de microrganismos produtores de fenoloxidase é de interesse industrial, devido a sua capacidade de hidrolisar compostos fenólicos presentes em efluentes lignolíticos provenientes, principalmente, da indústria têxtil e de papel e celulose (JUNIOR, 2010).

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os microrganismos estudados apresentaram características interessantes do ponto de vista biotecnológico. A levedura LE1 foi capaz de fermentar lactose em meio sólido, além de apresentar um potencial para a produção das enzimas tanase, celulase e fenoloxidase, nos ensaios enzimáticos qualitativos realizados. Da mesma forma, as bactérias BI1 (Gram positivo) e BI3 (Gram negativo) tiveram um resultado positivo na produção da enzima tanase. Por outro lado, todas as bactérias isoladas (BI1, BI2, BI3 e BE2) mostraram ser promissoras na produção da enzima celulase. Sendo assim, conclui-se que, o isolamento de microrganismos a partir de resíduos provenientes da indústria pesqueira mostrou-se ser uma alternativa sustentável para a produção de enzimas de interesse biotecnológico, uma vez que após a utilização destes, os mesmos seriam descartados de forma correta, causando um menor dano ambiental. As enzimas estudadas neste trabalho possuem aplicações em diversos processos biotecnológicos como, por exemplo, degradação de materiais lignocelulósicos para a produção de biocombustíveis, tratamentos de efluentes, indústria alimentícia e síntese de compostos químicos de interesse industrial.

7. PERSPECTIVAS PARA TRABALHOS FUTUROS

Avaliação quantitativa e caracterização da atividade enzimática dos extratos brutos obtidos a partir do cultivo dos microrganismos isolados do peixe Curimatá.

8. AGRADECIMENTOS

Agradecemos o professor Luiz Gustavo Martins da Silva por fornecer o intestino e estômago do peixe Curimatá e ao Laboratório de Microbiologia-UFSJ/CAP que cedeu os materiais utilizados neste trabalho.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AbcMed. Bactérias Gram-positivas e Gram-negativas: o que são? Como é a técnica de Gram? Quais as vantagens de diferenciar as bactérias Gram-negativas e Gram-positivas?. Disponível em:

<<http://www.abc.med.br/p/587007/bacterias+gram+positivas+e+gram+negativas+o+que+sao+como+e+a+tecnica+de+gram+quais+as+vantagens+de+diferenciar+as+bacterias+gram+negativas+e+gram+positivas.htm>>. Acesso em: 21 de outubro de 2016.

ACUMEDIA. ÁGAR CITRATO SIMMONS – SIMMONS CITRATE AGAR (7156). PI 7156, Rev 5, 2011.

AGUILAR, C. N.; RODRÍGUEZ R.; SÁNCHEZ, G. G., AUGUR, C.; TORRES, E. F.; BARRAGAN, L. A. A., CORONEL, A. R.; ESQUIVEL, J. C.C. Microbial tannases: advances and perspectives. Appl Microbiol Biotechnol, v.76, n.1, p. 47-59, 2007.

ANDRADE, A. P. C.; BORGES, M. F.; FIGUEIREDO, E. A. T.; MACHADO, T. F.; PORTO, B.C. Perfil de Staphylococcus Coagulase Positiva e Negativa Contaminantes de Queijo de Coalho. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento – EMBRAPA, 1ªed., 2011.

ANDREAUS, J.; CAVACO-PAULO, A. Enzimas no processamento de fibras têxteis. In: BON, E. P. S.; FERRARA, M. A. A.; CORVO, M. L. (Eds.). Enzimas em Biotecnologia: produção, aplicações e mercado. Rio de Janeiro: Interciência, 2008. p. 179-204.

ANVISA. Descrição dos Meios de Cultura Empregados nos Exames Microbiológicos, 2004. Disponível em:

<http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/microbiologia/mod_4_2004.pdf>.

ARANTES, V.; MILAGRES, A.M.F. Relevância de compostos de baixa massa molar produzidos por fungos e envolvidos na biodegradação da madeira. *Quím. Nova*, v. 32, n.6, p.1586-1595, 2009.

BATTESTIN V.; MATSUDA, L.K.; MACEDO G.A. Fontes e aplicações de taninos e tanases em alimentos. *Alimentos e Nutrição*, v.15, n.1, p. 63-72, 2004.

BBC Research - Report BIO030F - Enzymes in Industrial Applications: Global Markets, 2011.

BD. BD EMB Agar (Eosin Methylene Blue Agar), Modified. Dickinson and Company, 2013.

BON, E. P. S; FERRARA, M. A; CORVO, M. L. Enzimas em biotecnologia produção, aplicações e mercado. Rio de Janeiro: Editora Interciência, p.506, 2008.

BORTOLAZZO, N. G. Isolamento e seleção de fungos celulolíticos para hidrólise enzimática do bagaço de cana de açúcar. Dissertação (Mestrado) - Curso de Microbiologia Agrícola, Universidade de São Paulo- Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2011.

BOUGATEF, A. Trypsins from fish processing waste: characteristics and biotechnological applications comprehensive review. *Journal of Cleaner Production*, v. 57, p. 257– 265, 2013.

BRITO, F. G. Agar Sal Manitol. Mbiolog Diagnostico LTDA, Versão 1, 2010.

BULLER, N. B. Bacteria from fish and other aquatic animals: a practical identification manual, CABI Publishing, 1^a ed. 2004.

BURKERT, J. F. M; MAUGERI, F; RODRIGUES, M. I. Optimization of Extracellular Lipase Production by *Geotrichum* sp. Using Factorial Design. *Bioresource Technology*, v.91, n.1, p.77–84, 2004.

CASTRO, R.M.C.; VARI, R.P. Prochilodontidae (Fannel characiforms boca) in: REIS, R.E., KULLANDER, S. O.; FERRARIS, C. J. (editores.) Lista de verificação dos peixes de água doce da América do Sul e Central. Porto Alegre: EDIPUCRS, Brasil, 2011.

CASTRO, M. A.; PEREIRA, J. N. Produção, propriedades e aplicação de celulasas na hidrólise de resíduos agroindustriais. *Quím. Nova*, v. 33, p. 181-188, 2010.

CONCEIÇÃO, D. M.; ANGELIS, D. A.; BIDOIA, E. D.; ANGELIS, D. F. Fungos filamentosos isolados do rio Atibaia, SP e refinaria de petróleo biodegradadores de compostos fenólicos. *Arq. Inst. Biol.*, v.72, n.1, p.99-106, 2005.

COELHO, M. A. Z.; SALGADO, A. M.; RIBEIRO, B. D.; *Tecnologia Enzimática*, 1ª ed., EPUB: Rio de Janeiro, 2008.

COSTA, H. M. S.; JUNIOR, A.C.V. F.; AMARAL, I. P. G.; HIRATA, I. Y.; PAIVA, P. M. G.; JUNIOR, L. B. C.; BEZERRA, R. S.. Metal-sensitive and thermostable trypsin from the crevalle jack (*Caranx hippos*) pyloric caeca: purification and characterization. *Chem. Cent. J.*, v.7, p.1–8, 2013.

DILLON, A. Celulasas. in: SAID, S.; PIETRO, R.C.L. (editores). *Enzimas como agentes biotecnológicos*. Ribeirão Preto: Legis Summa, p. 243-270, 2004.

EMBALÓ, D. P. C. Estudo da Microbiota Láctica em Leites Fermentados Artesanalmente Consumidos no Sul de Angola. Tese De Doutorado Em Ciências Veterinárias. Universidade de Lisboa, p.153, 2014.

ELIBOL, M.; OZER, D. Influence of Oxygen Transfer on Lipase Production by *Rhizopus Arrhizus*. *Process Biochemistry*, v.36, n.4, p.329–52, 2000.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Roma, 230 p., 2012.

FERREIRA, G. P. Estudo comparativo, purificação parcial e caracterização de endoglucanases produzidas por *Aspergillus niger* cultivado em palha de sorgo triturada acrescida de meio mineral convencional e de permeado de soro de queijo. (Monografia) Trabalho apresentado à Universidade Federal de Viçosa, 2012.

FOLTRAN, C. Caracterização da atividade biodegradadora e de biosorção de corantes têxteis por três isolados de fungos do ambiente. 53 f. (Monografia) Curso de Ciências Biológicas, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

JUNIOR, N. L. Estudo de lacases fúngicas para degradação de compostos interferentes endócrinos. 2010. 138 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia de Processos, Universidade da Região de Joinville, Joinville, 2010.

JUNIOR, A. C. V. F.; COSTA, H. M. S.; ICIMOTO, M. Y.; HIRATA, I.Y.; MACONDES, M.; JUNIOR, L. B. C.; OLIVEIRA, V.; BEZERRA, R.S. Giant Amazonian fish pirarucu (*Arapaima gigas*): its viscera as a source of thermostable trypsin. *Food Chemistry*, v. 133, n. 4, p. 1596-1602, 2012.

GLAZER, A. N.; NIKAIDO, H. *Microbial Biotechnology - Fundamentals of Applied Microbiology*. São Paulo, 2ª ed. , 554 p. 2007.

GONÇALVES, H. B. Produção de tanases por *Emericella nivea*: purificação e caracterização bioquímica. 116 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biotecnologia, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", 2010.

HARGREAVES, P. I. Bioprospecção de novas celulasas de fungos provenientes da floresta amazônica e otimização de sua produção sobre celulignina de bagaço de cana. 88 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Tecnologia de Processos Bioquímicos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

KAMINI, N. R.; FUJII, T.; KUROSU, T.; IEFUJI, H. Production, purification and characterization of an extracellular lipase from yeast, *Cryptococcus* sp. S-2. *Process Biochemistry*, v. 36, n.4, p. 317–324, 2000.

LEALEM, F.; GASHE, B. A. Amylase production by a Gram-positive bacterium isolated from fermenting *tef* (*eraglostis tef*). *Journal of Applied Bacteriology*, v. 77, n.1, p. 348-352, 1994.

LIMA, L. K. F. Reaproveitamento de Resíduos Sólidos na Cadeia Agroindustrial do Pescado. Palmas: Embrapa Pesca e Piscicultura, 28p., 2013.

LYND, L. R.; ZHANG, Y. Quantitative determination of cellulase concentration as distinct from cell concentration in studies of microbial cellulose utilization: analytical framework and methodological approach. *Biotechnol Bioeng*, v. 15, n.4, p. 467-475, 2012.

LYND, L. R.; LASER, M. S.; BRANSBY, D.; DALE, B.E.; DAVISON, B.; HAMILTON, R., HIMMEL, M., KELLER, M., MCMILLAN, J.D., SHEEHAN, J.,

WYMAN, C.E. How biotech can transform biofuels. Nat. Biotechnol, v.26, p.169–172, 2008.

MACEDO, G. A.; MATSUDA, L. K.; BATTESTIN, V. Seleção de fungos produtores de tanase em resíduos vegetais ricos em taninos. Ciênc. Agrotec, v. 29, n. 4, p.833-838, 2005.

MARCIANO, L.S.; SOARES, M.A.; BARRETO, B.P. Seleção de microrganismos do solo produtores de enzimas de interesse industrial. Disponível em: <<http://www.webartigos.com/artigos/selecao-de-microrganismos-do-solo-produtores-de-enzimas-de-interesse-industrial/17990/#ixzz4Kq7WHTPg>>. Acesso em 18 de setembro de 2016.

MARCUSCHI, M.; ESPÓSITO, T. S.; MACHADO, M. F. M.; HIRATA, I. Y.; MACHADO, M. F. M.; SILVA, M. V.; CARVALHO, J. R. L. B.; OLIVEIRA, V.; BEZERRA, R.S. Purification, characterization and substrate specificity of a trypsin from the Amazonian fish tambaqui (*Colossoma macropomum*). Biochemical and Biophysical Research Communications (Print), v. 396, p. 667-673, 2010.

MONTEIRO, V. N.; SILVA, R. N. Aplicações industriais da biotecnologia enzimática. Revista Processos Químicos, v.3, n.5, 2009.

ORLANDELLI, R. C; SPECIAN, V; FELBER, A.C; PAMPHILE, J.A. Enzimas de interesse industrial: produção por fungos e aplicações. Revista saúde e biologia, v.7, n.3, p.97-109, 2012.

MORAES, M.F.P.G.; BARBOLA, I.F.; GUEDES, E. A.C. Alimentação e relações morfológicas com o aparelho digestivo do "curimbatá", *Prochilodus lineatus* de uma lagoa do sul do brasil. Revista Bras. Zool, v.14, n.1, p.169 -180, 1997.

MUKHERJEE, G. BANERJEE, R. Effects of temperature, ph and additives on the activity of tannase produced by a co culture of *Rhizopus oryzae* and *Aspergillus foetidus*. World Journal of Microbiology e Biotechnology, v. 22, p. 207-212, 2006.

NADAF, N.; GHOSH, J. .Production, purification and characterization of tannase from *Rhodococcus* NCIM 2891. Curr. Res. J. Biol. Sci., v.3, n.3, p. 246-253, 2011.

PIGATTO, G. Estudo da aplicação da Tirosinase vegetal no tratamento de efluentes e verificação da genotoxicidade do efluente tratado em células vegetais. 206 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

PINTO, G. A. S.; COURI, S.; LEITE, S. G. F.; BRITO, E. S. Tanase: conceitos, produção e aplicação. B. CEPPA, v. 23, n. 2, p.435-462, 2005.

POLITZER, K.; BON, E.P.S. Enzimas Industriais e Especiais. Centro de gestão e estudos estratégicos, Rio de Janeiro, 580p., 2006.

SACCO, L.P. Isolamento de bactérias produtoras de enzimas de interesse em processos biotecnológicos. Universidade Estadual Paulista – Dissertação (Mestrado) Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2013.

SAHA, B. C. Lignocellulose biodegradation and applications in biotechnology. American Chemical Society, v.889, p.2-34, 2004.

SCHEUFELE, F.B. Bioconversion of agro-industrial residues by microorganisms from the Amazon biome producers of lignocellulolytic enzymes. Dissertação (Mestrado) Engenharia Química, Universidade Federal do Paraná, 119 p., 2011.

SILVA, J. F.; ESPOSITO, S. T.; MARCUSCHI, M.; RIBEIRO, K.; CAVALLI, R.O.; OLIVEIRA, BEZERRA, R. S. Purification and partial characterization of a trypsin from the processing waste of the silver mojarra (*Diapterus rhombeus*). Food Chem, v.129, p.777–78, 2011.

SOUZA, A. L. T.; FONSECA, D. G.; LIBÓRIO, R. A.; TANAKA, M. O. Influence of riparian vegetation and forest structure on the water quality of rural low-order streams in SE Brazil. Forest Ecology and Management, v. 298, p. 12-18, 2013.

SP labor. Disponível em: <<http://www.splabor.com.br/blog/meio-de-cultura-2/meio-de-cultura-identificacao-e-cultivo-de-microorganismos>>. Acesso em 12 de setembro de 2016.

TAVARES, A. C. D.; FONSECA, J. S.; FONSECA, T. R. B.; SOUZA, R. A. T.; BARRONCAS, J. F., SILVA, T. A.; MARIA TEIXEIRA, F. S. Enzimas Extracelulares de Fungos Anamórficos Isolados de *Morinda citrifolia* L. *Biochemistry and Biotechnology Reports*, v.1, n. 2, 2012.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. *Microbiologia*. 10ª ed. Brasil: Artmed. 934 p., 2011.

VAZ, R. S.; PRADO, M. R. M.; CARVALHO, F. *Biotechnologia na Indústria farmacêutica*. *Revista Biotechnologia Ciência e Desenvolvimento*, n. 73, p. 36-39, 2008.

VIEIRA, D. A. P.; FERNANDES, N. C. A. Q. *Microbiologia Geral*. Inhumas: IFG; Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 2012.

WALTON, J.D.; BANERJEE, G.; SCOTT-CRAIG, J.S. Improving Enzymes for Biomass Conversion: A Basic Research Perspective. *BioEnergy Research*, v.3, n.1, p. 82–92, 2010.

WIKIMEDIA COMMONS. *Prochilodus lineatus*. Disponível em: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Prochilodus_lineatus.jpg>. Acesso em: 22 de outubro de 2016.

ZHANG, Y. H. P.; CUI, J. B.; LYND, L. R.; KUANG, L. R. A transition from cellulose swelling to cellulose dissolution by o-phosphoric acid: evidences from enzymatic hydrolysis and supramolecular structure. *Biomacromolecules*, v.7, p. 644–648, 2006.