

AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE AMILASE E PROTEASE POR BACTÉRIAS DA ANTÁRTICA

EVALUATION OF AMYLASE AND PROTEASE PRODUCTION BY BACTERIA FROM ANTARCTICA

EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE AMILASA Y PROTEASA POR BACTERIAS DE LA ANTÁRTICA

Eliziane Batista¹
Júlia Yumi Moreira Watanabe²
Valéria Maia de Oliveira³
Michel Rodrigo Zambrano Passarini⁴

Resumo: A Antártica representa um importante habitat na busca por micro-organismos adaptados a ambientes extremos. O presente estudo avaliou a produção das enzimas amilases e proteases por bactérias isoladas do ambiente frio. De 100 bactérias triadas, 8 e 4 formaram halo nos meios de seleção para protease e amilase, respectivamente. Dois isolados formaram halo para as duas enzimas. Os resultados encorajam estudos futuros de produção, otimização e purificação enzimática para aplicações biotecnológicas

Palavras-chave: Extremófilos. Antártica. Enzimas. Biotecnologia.

Abstract: Antarctica represents an important habitat in the search for microorganisms adapted to extreme environments. The study aimed to evaluate the production of amylases and proteases by bacteria from the cold environment. From 100 bacteria screened, 8 and 4 produced halo on the protease and amylase selection media, respectively. Two isolates formed halo for the two enzymes. The results encourage future studies of production, optimization and enzymatic purification for biotechnological applications.

Keywords: Extremophiles. Antarctica. Enzymes. Biotechnology.

Resumen: La Antártica representa un importante hábitat en la búsqueda de microorganismos adaptados a ambientes extremos. El presente estudio evaluó la producción de las enzimas amilasa y proteasa por bacterias aisladas del ambiente frío. De las 100 bacterias estudiadas, 8 e 4 formaron halo en los medios de selección para proteasa y amilasa, respectivamente. Dos aislados formaron halo para las dos enzimas. Los resultados alientan estudios futuros de producción, optimización y purificación enzimática para aplicaciones biotecnológicas.

Palabras-clave: Extremófilos. Antártica. Enzimas. Biotecnología.

Envio 09/02/2018

Revisão 09/03/2018

Aceite 09/04/2018

¹ Aluna de Graduação do curso de Biotecnologia. Universidade Federal da Integração Latino-Americana (UNILA). E-mail: eliziane.batista@aluno.unila.edu.br.

² Aluna de Graduação do curso de Biotecnologia. Universidade Federal da Integração Latino-Americana (UNILA). E-mail: julia.watanabe@aluno.unila.edu.br.

³ Doutora. Universidade Estadual de Campinas (CPQBA/UNICAMP). E-mail: vmaia@cpqba.unicamp.br.

⁴ Doutor (orientador). Universidade Federal da Integração Latino-Americana (UNILA). E-mail: michel.passarini@unila.edu.br.

Introdução

Nos últimos anos, estudos em bioprospecção microbiana e a descoberta de novos *taxa* em ambientes como oceanos, solos e regiões extremas vêm aumentando consideravelmente, devido ao grande interesse industrial que estas pesquisas representam (Yang et al., 2009; Canganella; Wiegel, 2011; Gomes et al., 2018). Aproximadamente 85% da biosfera do planeta se encontra permanentemente em temperaturas inferiores a 5 °C, incluindo as regiões Ártica e Antártica, montanhas de elevada altitude, as profundezas dos mares, cavernas e outras regiões como lagos, solos e desertos. Estas regiões geladas cobrem grande parte da superfície da Terra, sendo que 90% do volume dos oceanos estão em faixas de temperaturas menores do que 5 °C, 35% da superfície é coberta por neve, 24% está permanentemente congelada e 13% são representados por mares congelados (Margesin; Miteva, 2011; Morgan-Kiss et al., 2006).

Muitos esforços têm sido realizados na busca por novas enzimas ou novas moléculas produzidas por micro-organismos psicrófilicos (com crescimento ótimo em temperatura igual ou inferior a 15 °C e crescimento no máximo em temperatura até 20 °C) e psicrotolerantes (com crescimento entre 0 °C até 45 °C, exibindo um crescimento ótimo entre 30 °C e 35 °C) (Quillaguamán et al., 2004), os quais podem ser encontrados em amostras provenientes do continente Antártico (Eddw, 1960; Morgan-Kiss et al., 2006; Canganella; Wiegel, 2011). Os organismos presentes nestes ambientes estão adaptados a uma variedade de condições extremas, como baixas temperaturas, que podem variar entre 5 °C a - 60 °C, valores de pH alcalino variando de 7.9 a 8.3, maior pressão osmótica com a hipersalinidade das águas oceânicas entre 35 a 200 PSU (*Practical Salinity Unit*), limitações na disponibilidade de nutrientes no solo *permafrost* e condições de luminosidade nessas regiões de alta latitude (Margesin; Miteva, 2011; Pascale et al., 2012). Estas características contribuem para que o continente Antártico seja um habitat promissor no que se refere à recuperação de micro-organismos com capacidades metabólicas únicas.

Ambientes frios são frequentemente colonizados por micro-organismos, entre eles bactérias gram-positivas e gram-negativas, arqueias, leveduras, cianobactérias, fungos filamentosos e protistas. Os micro-organismos representam as mais abundantes formas de vida adaptadas ao frio na Terra em nível de diversidade de espécie e biomassa (Margesin; Miteva,

2011). A temperatura pode influenciar fortemente no desenvolvimento de uma dada espécie de organismo assim, novos gêneros e espécies de micro-organismos psicofílicos e psicotolerantes vem sendo descobertos a partir de diferentes habitats gelados (Margesin; Miteva, 2011). Micro-organismos adaptados a ambientes permanentemente frios podem possuir características moleculares que os permitem sobreviver a essas condições extremas e, por esse motivo, podem representar potencial para prospecção de novos compostos derivados do metabolismo celular, genes e enzimas de funções diversas ainda não estudados sob estas condições ambientais adversas. Enzimas microbianas apresentam capacidade catalítica em condições extremas abrangendo uma imensa diversidade bioquímica (Beygmoradi; Homaei, 2017).

Dentre todos esses fatores ambientais adversos, a temperatura é o que mais influencia o desenvolvimento microbiano, devido à função de diversas biomoléculas e a manutenção das estruturas biológicas celulares (Gomes et al., 2007). Mesmo com toda esta formidável capacidade metabólica, o elemento chave que faz com que os micro-organismos se adaptem às condições extremas dos ambientes polares está relacionado diretamente à capacidade de superar os efeitos negativos das baixas temperaturas através de processos evolutivos de uma série de adaptações funcionais e estruturais, tais como produção de proteínas anticoagulantes, modulação da cinética de enzimas específicas bem como o desenvolvimento de membranas mais fluídas, através da produção e acumulação de ácidos graxos de cadeia insaturada (Morgan-Kiss et al., 2006; Bej et al., 2010; Margesin; Miteva, 2011). Organismos adaptados ao frio utilizam uma combinação de alterações na composição dos ácidos graxos para regular a fluidez da membrana em baixas temperaturas. O grau de insaturação dos ácidos graxos dos lipídios de membrana desempenha um papel importante na rigidez das membranas nestas condições extremas (White et al., 2000; Morgan-Kiss et al., 2006; Canganella; Wiegel, 2011).

Atualmente, a capacidade de adaptação microbiana às mais diversas condições ambientais tem despertado o interesse de muitos pesquisadores de várias áreas científicas, na busca por enzimas, tais como amilases e proteases e outras moléculas estáveis em faixas de temperaturas muito elevadas ou muito baixas (Ladygina et al., 2006; Frias et al., 2010).

Representando 60% das enzimas aplicadas em processos industriais, as proteases (enzimas proteolíticas), devido às suas propriedades únicas de causar modificações seletivas e

específicas em uma grande variedade de estruturas proteicas (enzimas capazes de clivar ligações peptídicas), constituem uma das classes de enzimas mais importantes utilizadas comercialmente. Possuem aplicações em distintas áreas industriais, tais como: *i)* indústria têxtil, sendo empregada no processamento do couro e desgomagem da seda; *ii)* indústria farmacêutica, com atividades em distúrbios gastrointestinais, como agentes antiinflamatórios e nos casos de distúrbios tromboembólicos; *iii)* indústria cervejeira; *iv)* indústria alimentícia, sendo utilizada em diversos tipos de alimentos, como produtos lácteos e nos processos de cozimentos; *v)* indústria de sanitizantes, como aditivos na composição de detergentes; *vi)* no processamento de resíduos, incluindo o tratamento de água e esgoto. A alta aplicabilidade das proteases e o alto potencial dos micro-organismos de nichos frios são áreas que, indiscutivelmente, necessitam ser mais exploradas (Silva et al, 2009; Fornbacke; Clarsund, 2013; Joshi; Satyanarayana, 2013).

Assim como as proteases, as amilases são enzimas com funções catalíticas, porém com capacidade de hidrolisar o amido, formando dextrinas e progressivamente polímeros menores, compostos por unidades de glicose (Ogbonna et al., 2014). Entre as amilases, destacam-se as α -amilases, responsáveis pelo rompimento das ligações no interior do substrato (endoamilases), as β -amilases, que hidrolisam unidades das extremidades não redutoras do substrato (exoamilase), e as glucoamilases (amiloglucosidases) que liberam unidades de glicose do terminal não redutor das moléculas do substrato (SpierR, 2004). É uma categoria enzimática com papel fundamental no mercado industrial de enzimas, podendo ser utilizadas em processos como: *i)* alimentos panificados; *ii)* diversos tipos de fermentações; *iii)* detergentes; *iv)* liquefação de amido; *v)* indústrias têxteis e de papel; *vi)* aplicação bioenergética, sendo utilizada na hidrólise do amido para a produção de etanol (Loperena et al., 2012).

A utilização de enzimas ativas em baixas temperaturas apresenta várias vantagens, incluindo a redução do custo do aquecimento dos fermentadores industriais, redução dos riscos de contaminação microbiana e melhor solubilidade da enzima em baixas temperaturas (Anduaem, 2014). Existem poucas amilases com atividade abaixo de 15 °C e em pH alcalino, enfatizando a importância da bioprospecção em ambientes pouco explorados (Vester; Glaring; Stougaard, 2015). A produção de amilases a partir de micro-organismos adaptados a baixas temperaturas oferece ainda vantagens em relação aos mecanismos de tolerância ao

congelamento, como maior fluidez da membrana e produção de proteínas responsáveis pela adaptação a baixas temperaturas (Kuddus et al., 2011).

Neste sentido, o presente trabalho focou na triagem de bactérias isoladas de amostras do continente Antártico na busca pelas enzimas amilases e proteases, objetivando a aplicação potencial destas moléculas em processos biotecnológicos industriais em condições de baixa temperatura.

Metodologia

Linhagens microbianas

As bactérias isoladas de amostras do continente Antártico utilizadas no presente trabalho (n=100) foram cedidas pela Profa. Dra. Valéria Maia de Oliveira, coordenadora da Divisão de Recursos Microbianos (DRM), do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas da Universidade Estadual de Campinas CPQBA/UNICAMP, no âmbito do projeto AP FAPESP intitulado “*Multi-ômicas aplicadas ao conhecimento e exploração de microbiomas Antárticos*” (Processo no. 2016/05640-6). As bactérias estudadas foram isoladas de amostras diversas coletadas do ambiente Antártico incluindo sedimento marinho, solo congelado e invertebrados marinhos, utilizando a logística adotada pelo Programa Antártico Brasileiro durante a expedição: OPERANTAR XXXII (verão 2013/2014), no âmbito do projeto do CNPq “*Micologia Antártica (MycoAntar): taxonomia, diversidade e distribuição geográfica de fungos presentes em ecossistemas da Antártica e sua utilização como fonte de moléculas protótipos para o desenvolvimento de fármacos e pesticidas*”, coordenado pelo Prof. Dr. Luiz Rosa (UFMG).

Para a realização da triagem enzimática, as bactérias preservadas em 20% de glicerol pelo método de ultra-congelamento (- 80 °C), foram reativadas através de semeadura em placas de Petri contendo o meio de cultivo NA (ágar nutriente), constituído de 0,3% de extrato de carne, 0,5% de peptona, 1,5% de ágar, em pH ajustado para 6,8 com hidróxido de sódio. As placas foram incubadas na geladeira a 4 °C por 10 dias. Após o crescimento, os isolados foram submetidos aos testes de triagem para a produção das enzimas amilase e protease.

Triagem enzimática

Os experimentos de triagem da enzima amilase foram realizados de acordo com o método proposto por Andualet (2014). Os isolados foram inoculados em placas de Petri contendo o meio de cultivo SPYA (1% de amido solúvel, 0,5% de peptona, 1,5% de extrato de levedura e 1,5% de ágar), seguido de incubação na temperatura de 4 °C durante 14 dias. Após este período, com auxílio de uma pipeta de vidro, cerca de 10 mL de uma solução contendo 1% de iodo em 2% de iodeto de potássio foram adicionados na superfície dos meios de cultivo contendo o crescimento microbiano, até o preenchimento de toda a superfície da placa de Petri. As colônias que apresentaram a formação de um halo (zona clara) ao seu redor, foram selecionadas como isolados produtores putativos de amilase. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Os experimentos de triagem da enzima amilase foram realizados de acordo com o método proposto por Wang et al. (2007), modificado. Os isolados foram inoculados em placas de Petri contendo o meio de cultivo LPDA (10% de leite desnatado, 1% de glicose, 1,5% de ágar em caldo de batata fervido), sendo as placas incubadas a 4 °C durante 14 dias. As colônias que apresentaram a formação de um halo ao seu redor, foram selecionadas como isolados produtores putativos de protease. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Para ambos os testes de triagem das enzimas amilase e protease, a avaliação dos halos foi realizada visualmente, com auxílio de uma régua transparente, empregando o seguinte sistema de pontuação de acordo com a produção enzimática: (+++) boa produção enzimática (halo entre 11 a 15 mm de diâmetro); (++) produção enzimática regular (halo entre 6 a 10 mm de diâmetro) e (+) produção enzimática fraca (halo entre 1 a 5 mm de diâmetro).

Avaliação do crescimento microbiano

Como descrito no teste de triagem enzimática, a avaliação do crescimento dos isolados bacterianos foi realizada visualmente, com auxílio de uma régua transparente, empregando o seguinte sistema de pontuação de acordo com o crescimento: (+++) bom (entre 13 a 20 mm de diâmetro); (++) regular (entre 6 a 12 mm de diâmetro) e (+) fraco (entre 1 a 5 mm de diâmetro).

Caracterização morfológica

A caracterização morfológica foi realizada com os isolados produtores das enzimas de interesse (formação de halo) nos experimentos de triagem das enzimas amilase e protease. Os isolados positivos foram cultivados em meio NA (ágar nutriente), sendo as placas incubadas a uma temperatura de 4 °C durante 14 dias. As análises macroscópicas foram realizadas com auxílio de um estereoscópio NIKON SMZ 745 Modelo C-LEDS (China), sendo avaliadas as características de crescimento, cor, forma e brilho das colônias. As análises microscópicas dos isolados foram realizadas pela técnica de coloração de Gram. Um esfregaço de cada isolado foi preparado em uma lâmina de vidro e corado com uma solução de cristal violeta por 60 segundos, seguido de uma lavagem com água corrente. Após lavagem, o esfregaço foi corado com uma solução de Lugol por mais 60 segundos, seguido de uma descoloração com uma solução de álcool 95%/acetona por 20 segundos. Após lavagem, o esfregaço foi corado com uma solução de Fuccina durante 20 segundos. O material preparado foi observado com auxílio de um microscópio óptico NIKON Eclipse E200MVR (China). As bactérias coradas em roxo e vermelho, foram caracterizadas como gram-positivas e gram-negativas, respectivamente (Madigan et al., 2016).

19

Resultados e Discussão

No total, 100 bactérias foram enviadas para o laboratório multidisciplinar da UNILA para realização dos experimentos de triagem enzimática. Entretanto, apenas sessenta e dois isolados apresentaram crescimento em pelo menos um dos dois meios de cultivo utilizados nos experimentos (meio de triagem da enzima protease acrescido de 10% de leite e meio de triagem da enzima amilase acrescido de 1% de amido). Os métodos de preservação de células microbianas utilizados em técnicas de microbiologia podem não garantir uma adequada e satisfatória preservação para todos os tipos de linhagens microbianas e, às vezes, alguns isolados podem não resistir aos métodos e não serem capazes de sobreviver após a reativação. Assim, as células podem sofrer injúrias metabólicas ao longo do processo ou pelo simples fato do congelamento e descongelamento das células quando em uma rotina laboratorial contínua. Entretanto, as bactérias utilizadas no presente trabalho foram isoladas de um ambiente oligotrófico (com pouca disponibilidade de nutrientes) e, a utilização do meio NA, pode ter

possibilitado a falta de crescimento de 38 isolados, pois este meio de cultivo apresenta uma rica fonte de carbono e nitrogênio em sua composição.

De qualquer forma, os testes de triagem enzimática foram realizados com sucesso, tendo em vista que, das sessenta e duas bactérias realmente triadas em ambos os meios de cultivo distintos, 10 isolados foram capazes de apresentar a formação de halo nos meios de cultivos de seleção (Tabela 1). As Figuras 1 A, B e C, mostram exemplos dos testes de triagem para as enzimas estudadas. Podemos verificar na Figura 1C a formação do halo, a qual foi rapidamente observado logo após a adição do corante revelador constituído de iodo.

Tabela 1 - Atividades enzimáticas e caracterização morfológica dos isolados microbianos com potencial biotecnológico recuperados de amostras do ambiente frio.

Código do isolado	Coloração de Gram	Atividade Proteolítica (leite 10%)	Atividade Amilolítica (amido 1%)	Crescimento celular microbiano	Cor da colônia bacteriana	Elevação	Característica da colônia bacteriana
247	Negativa*	+++		++	Creme	Convexo	brilhante
438	Positiva**	++		+	Creme	Convexo	brilhante
472	Positiva	+++		+	Incolor	Convexo	brilhante
497	Positiva	++		++	Amarelo claro	Convexo	opaca
499	Positiva	+++		++	Branco	Convexo	brilhante
494	Positiva	+++	+	++	Amarelo	Convexo	brilhante
529	Positiva		++	+	Creme	Convexo	opaca
P11-Eh	Negativa		+	+	Incolor	Convexo	brilhante
P14 - Gx	Positiva	+		+++	Creme	Convexo	brilhante
P16 - B4	Positiva	++	++	++	Amarelo forte	Convexo	brilhante

Fonte: Produção do próprio autor.

Notas:

(+++) boa produção enzimática e/ou crescimento;

(++) regular produção enzimática e/ou crescimento;

(+) fraca produção enzimática e/ou crescimento

* cor vermelha

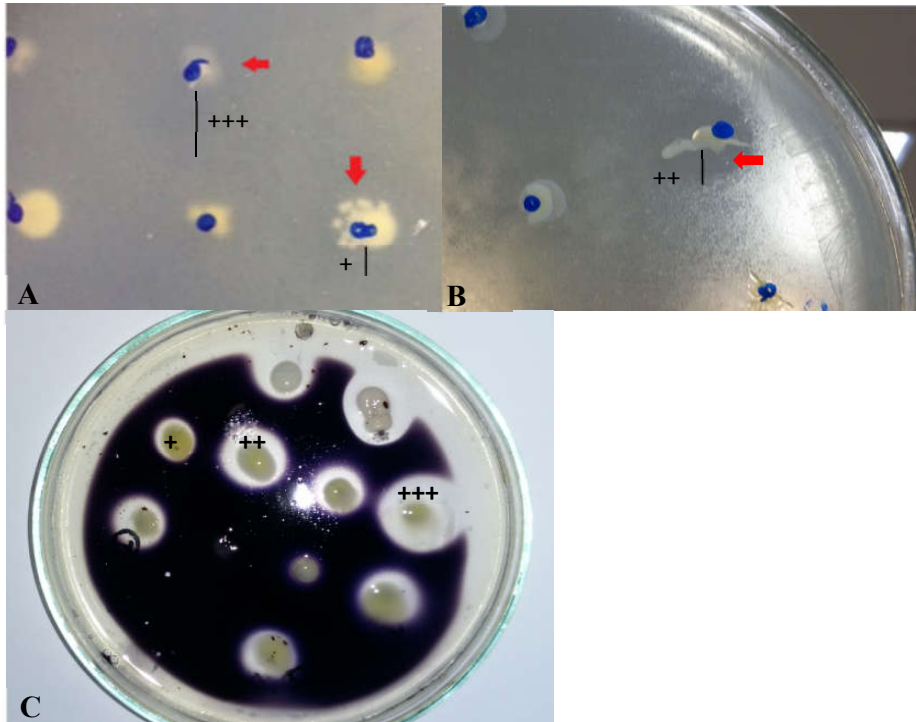
**cor roxa

O amido, um importante polissacarídeo encontrado nos vegetais, é formado pela combinação da amilose com a amilopectina. A molécula de amilose não apresenta ramificações, assumindo uma conformação helicoidal, entretanto, a molécula de amilopectina apresenta estruturas ramificadas, mas não forma uma conformação helicoidal. O iodo utilizado no meio de cultivo para a busca por amilase reage com a amilose do amido, sendo aprisionado no interior da hélice da amilose e formando um complexo azul-escuro. Isto não ocorre quando em contato com a amilopectina, devido a uma menor interação pela ausência da conformação helicoidal, formando uma coloração menos intensa, de tom avermelhado (Denardin; Silva, 2008).

Nos testes enzimáticos, a formação do halo ocorre devido à presença da enzima amilase, a qual quebra as ligações α -(1-4) e α -(1-6) da molécula de amido, fazendo com que o iodo não fique aprisionado no interior da hélice da amilose. Em nossos experimentos, quatro isolados microbianos (494, 529, P11-Eh e P16-B4) apresentaram halo no meio de seleção constituído de 1% de amido, sendo considerados putativos produtores da enzima amilase.

Figura 1 - Triagem enzimática com os isolados bacterianos do ambiente frio.

A e B: Triagem da enzima protease. As setas vermelhas indicam a formação dos halos e as barras pretas o tamanho de cada halo: (+) produção enzimática fraca; (++) produção enzimática regular e (+++) boa produção enzimática. **C:** Triagem da enzima amilase: (+) produção enzimática fraca; (++) produção enzimática regular e (+++) boa produção enzimática, após adição do corante revelador.



Fonte: Produção do próprio autor.

Para o teste de protease, oito isolados (247, 438, 472, 497, 499, 494, P14-Gx e P16-B4) foram capazes de formar halo no meio, sendo portanto considerados putativos produtores da enzima protease. Por outro lado, dois isolados (494 e P16-B4) foram os melhores produtores de ambas as enzimas, pois foi possível observar a formação de halo nos dois meios de cultivos distintos (Tabela 1).

Os melhores produtores da enzima protease foram os isolados 247, 472, 499 e 494, devido à formação de um maior halo no meio de seleção (+++). Com relação à produção de amilase, os dois melhores isolados foram 529 e P16-B4, com uma produção enzimática regular (++) (Tabela 1).

Dentre as linhagens produtoras das enzimas testadas, oito foram caracterizadas como bactérias gram-positivas e duas gram-negativas. As colorações das colônias bacterianas variaram entre as cores: creme (n=4), amarelo (n=1), amarelo claro (n=1), amarelo escuro (n=1), branca (n=1) e incolor (n=2). Ambientes frios são frequentemente colonizados por micro-organismos, entre eles bactérias gram-positivas e gram-negativas, arqueias, leveduras, cianobactérias, fungos filamentosos e protistas. Os micro-organismos representam as mais abundantes formas de vida adaptadas ao frio na Terra em nível de diversidade de espécies e biomassa (Feller, 2003; Margesin; Miteva, 2011). A temperatura pode influenciar fortemente no desenvolvimento de uma dada espécie de organismo e, de acordo com Margesin e Miteva (2011), novos gêneros e espécies de micro-organismos psicofílicos e psicrotolerantes vem sendo descobertos a partir de diferentes habitats gelados.

Trabalhos na literatura vêm sendo realizados na busca de enzimas microbianas, dentre elas as amilases e as proteases obtidas de bactérias de ambientes extremos. De acordo com Loperena e colaboradores (2012), bactérias isoladas de amostras da Antártica foram avaliadas quanto à produção de diversas enzimas, sendo que a atividade amilolítica foi a mais frequentemente identificada nas linhagens bacterianas. No trabalho realizado por Lu e colaboradores (2010), uma nova linhagem bacteriana identificada como *Pseudoalteromonas arctica*, isolada de amostras de água do mar coletadas na Ilha Gaogong, China, foi capaz de produzir amilase adaptada ao frio. Neste estudo, os autores demonstraram a atividade enzimática relativa entre 60 e 75% em temperaturas de 5 a 15 °C.

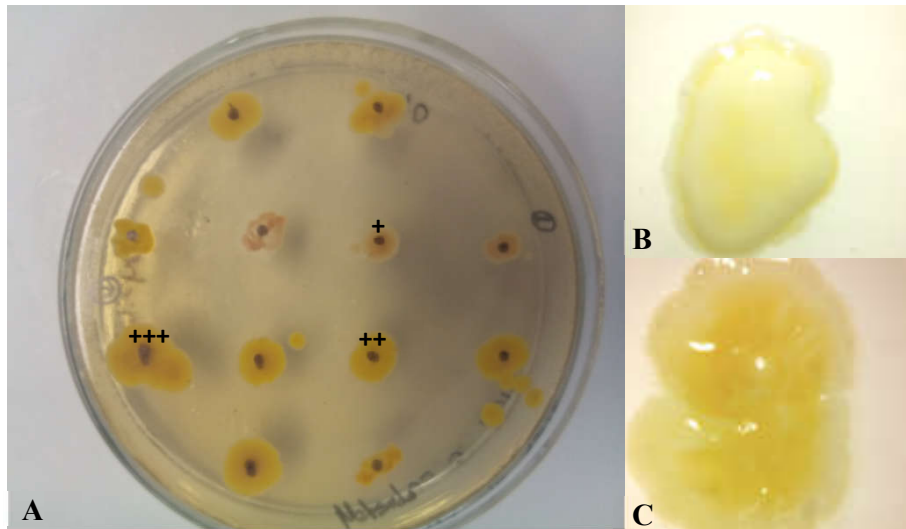
Do mesmo modo que as amilases vêm chamando atenção na área biotecnológica, as proteases também vêm sendo pesquisadas para os mesmos propósitos. No estudo realizado por Ni et al. (2013), vinte e sete isolados bacterianos pertencentes aos gêneros *Pseudomonas*, *Polaromonas*, *Brevundimonas*, *Cryobacterium*, *Kocuria*, *Arthrobacter*, *Chryseobacterium* e *Flavobacterium*, mostraram produção da enzima protease em placas de Petri contendo leite desnatado. As bactérias triadas no estudo foram isoladas a partir de amostras de sedimentos da camada inferior das geleiras encontradas nas Montanhas Tianshan, na China. Em outro estudo realizado por Xiulan et al. (2003), a linhagem psicofílica de *Pseudomonas* sp. SM9915, isolada de amostras de limo em profundidade de aproximadamente 1.855 metros, foi capaz de sintetizar

uma maior quantidade da enzima protease quando o isolado foi submetido ao crescimento na temperatura de 15 °C.

Em processos industriais, o crescimento de um dado micro-organismo não está diretamente relacionado com a sua produção enzimática, mas sim à demanda de nutrientes e oxigênio necessária às reações bioquímicas microbianas. No presente estudo, o isolado P14 - Gx apresentou um melhor crescimento celular/biomassa microbiana (+++) após 14 dias de incubação (Tabela 1). A Figura 2, ilustra distintos crescimentos microbianos entre as linhagens utilizadas no estudo. Entretanto, o isolado gram-positivo 472 pode ser considerado o melhor produtor enzimático e um aspecto que o torna ideal para ser utilizado em um processo fermentativo é que o isolado apresentou baixo crescimento celular (+), mas conseguiu produzir uma grande quantidade da enzima protease (+++) (Tabela 1). Assim, podemos dizer que a produção enzimática desse isolado (472) será relativamente maior com um menor crescimento celular, não sendo necessário um gasto muito elevado com fontes de nutrientes e oxigênio (fatores essenciais ao crescimento celular) ou um elevado consumo de energia elétrica (essencial para o funcionamento de um fermentador industrial). Deste modo, essas características proporcionam uma maior economia e uma maior produtividade sendo fatores importantes para uma indústria biotecnológica.

Figura 2 - Diferenças morfológicas entre as colônias bacterianas isoladas do ambiente frio.

A: Após 14 dias de crescimento à 4° C. (os sinais +++ indicam as colônias com maior crescimento; ++ crescimento regular; + crescimento fraco. **B:** Característica da colônia: opaca. **C:** Característica da colônia: brilhante.



Fonte: Produção do próprio autor.

Neste sentido, podemos dizer que os resultados obtidos no presente estudo enfatizam a importância da busca por micro-organismos em ambientes considerados inóspitos, os quais apresentam uma maquinaria enzimática diversificada, podendo produzir moléculas diferenciadas em relação àquelas produzidas por células de ambiente ameno (com faixas de temperatura mais elevadas), as quais podem ser utilizadas em diversos processos biotecnológicos industriais.

Conclusões

Os resultados encontrados no presente estudo permitiram a identificação de bactérias de ambiente extremo potencialmente produtoras das enzimas amilase e protease. O continente Antártico pode ser considerado um habitat realmente promissor na busca por moléculas entre elas as enzimas produzidas por micro-organismos adaptados a estes ambientes extremos. Assim, podemos destacar a importância da realização de estudos voltados à bioprospecção de micro-organismos psicrófilos e/ou psicrotolerantes encontrados nestes ambientes, encorajando

estudos futuros empregando métodos de otimização da produção destas moléculas de interesse por meio de técnicas de planejamento experimental bem como purificação e caracterização destas enzimas bacterianas com grande potencial de aplicação nos diversos setores industriais.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-graduação da Universidade Federal da Integração Latina-Americana (UNILA) pela concessão da bolsa no Programa Institucional de Iniciação Científica (PIBIC 2017/2018).

Referências

- ANDUALEM, B. Isolation and screening of amylase producing thermophilic spore forming Bacilli from starch rich soil and characterization of their amylase activities using submerged fermentation. **International Food Research Journal**. v. 21, n.2, p. 831-837, 2014.
- BEJ, A. K.; AISLABIE, J.; ATLAS, R.M. Polar Microbiology. The Ecology, Biodiversity and Bioremediation Potential of Microorganisms in Extremely Cold Environments. **CRC Press**, Boca Raton, FL, 2010.
- BEYGMORADI, A.; HOMAIEI, A. Marine Microbes as a valuable resource for brand new industrial biocatalysts. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**. v.11, p. 131-152, 2017.
- CANGANELLA, F.; WIEGEL, J. Extremophiles: from abyssal to terrestrial ecosystems and possibly beyond. **Naturwissenschaften**. v. 98, p. 253-279, 2011.
- DENARDIN, C. C.; SILVA, L. P. Estrutura dos grânulos de amido e sua relação com propriedades físico-químicas. **Ciência Rural**. v. 39, n. 3, p. 945-954, 2008.
- EDDY, B.P. The use and meaning of the term ‘psychrophilic’. The **Journal of Applied Bacteriology**. v. 23, p. 189-190, 1960.
- FELLER, G.; GERDAY, C. Psychrophilic enzymes: hot topics in cold adaptation. **Nature Reviews Microbiology**. v.1, p. 200-208, 2003.
- FORNBACKE, M.; CLARSUND, M. Cold-Adapted Proteases as an Emerging Class of Therapeutics. **Infectious Diseases and Therapy**. v. 2, p. 15-26, 2013.
- FRIAS, J. A. et al. Cloning, purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction of the OleC protein from *Stenotrophomonas maltophilia* involved in head-to-head hydrocarbon biosynthesis. **Acta Crystallographica**. v. 66, p.1108-1110, 2010.

GOMES, E. et al. Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. **Química Nova**. v. 30, p.136-145, 2007.

GOMES, E. C. Q. et al. Cultivable fungi present in Antarctic soils: taxonomy, phylogeny, diversity, and bioprospecting of antiparasitic and herbicidal metabolites. **Extremophiles**. p.1-13, 2018.

JOSHI, S.; SATYANARAYANA, T. Biotechnology of cold-active proteases. **Biology**, v. 2, n. 2, p. 755-783, 2013.

KAPSENBERG, L. et al. Near-shore Antarctic pH variability has implications for the design of ocean acidification experiments. **Scientific Reports**. v. 5, 2015.

KUDDUS, M.; ARIF, J. M.; RAMTEKE, P. W. Structural adaptation and biocatalytic prospective of microbial cold-active α -amylase. **African Journal of Microbiology Research**. v. 6, n. 2, p. 206-213, 2012.

LADYGINA, N.; DEDYUKHINA, E. G.; VAINSHTEIN, M. B. A review on microbial synthesis of hydrocarbons. **Process Biochemistry**. v. 41, p. 1001-1014, 2006.

LOPERENA, L. et al. Extracellular enzymes produced by microorganisms isolated from maritime Antarctica. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 28, p. 2249-2256, 2012.

LU, M.S. et al. Isolation of a novel cold-adapted amylase-producing bacterium and study of its enzyme production conditions. **Annals of Microbiology**. v. 60, p. 557-563, 2010.

MADIGAN, M. T. et al. **Microbiologia de Brock**. 14. ed. Porto Alegre, RS: Artmed, 2016.

MARGESIN, R.; MITEVA, V. Diversity and ecology of psychrophilic microorganisms. **Research in Microbiology**. v. 162, n. 3, p. 346-61, 2011.

MORGAN-KISS, R. M. et al. Adaptation and acclimation of photosynthetic microorganisms to permanently cold environments. **Microbiology and molecular biology reviews**. v. 70, p. 222-252, 2006.

NI, Y. et al. Phylogenetic and physiological diversity of cold-adapted bacteria producing protease from sediments of the bottom layer of the glacier no. 1 in the Tianshan mountains. **Acta Microbiologica Sinica**. v. 53, n. 2, p. 164-172, 2013.

OGBONNA, C. N. et al. Isolation and screening of amylase producing fungi obtained from garri processing site. **International Journal of Biotechnology and Food Science**. v.2, n.5, p. 88-93, 2014.

PASCALE, D. et al. The microbial diversity of Polar environments is a fertile ground for bioprospecting. **Marine Genomics**. v. 8, p. 15-22, 2012.

SILVA, G. A. B. et al. Produção e caracterização de protease obtida por *Gliocladium verticilloides* através da fermentação em estado sólido de subprodutos agroindustriais. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**. v. 3, n. 1, p. 28-41, 2009.

SPIER, M. R., WOICIECHOWSKI, A. L.; SOCCOL, C. R. Produção de α -Amilase por *Aspergillus* em Fermentação no Estado Sólido de Amido de Mandioca e Bagaço de Cana-de-Açúcar. VI Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática. **Anais Enzitec**, p. 16-116, 2004.

VESTER, J. K.; GLARING, M. A.; STOUGAARD, P. An exceptionally cold-adapted alpha-amylase from a metagenomic library of a cold and alkaline environment. **Applied Microbiology and biotechnology**, v. 99, n. 2, p. 717-727, 2015.

WANG, H. Y. et al. Screening and mutagenesis of a novel *Bacillus pumilus* strain producing alkaline protease for dehairing. **Letters in Applied Microbiology**. v. 44, p.1-6, 2007.

WHITE, P. L.; WYNN-WILLIAMS, D.D.; RUSSELL, N.J. Diversity of thermal responses of lipid composition in the membranes of the dominant culturable members of an Antarctic fell eld soil bacterial community. **Antarctic. Science**. v.12, p. 386-393, 2000.

XIULAN, C. et al. Study on the different cold-adapted protease produced by the deep-sea psychrotrophic bacterium *Pseudomonas*. **Oceanologia et Limnologia Sinica**. v. 34, n. 2, p. 155-160, 2003.

YANG, S. J. et al. *Antarcticimonas flava* gen. nov., sp. nov., isolated from Antarctic coastal seawater. **Journal of Microbiology**. v. 47, p. 517-23, 2009.