

DÂMARIS SIMÕES GOMES ABREU

**POTENCIAL ENZIMÁTICO E PERFIL DE CRESCIMENTO
DE ISOLADOS DE *Streptomyces* spp**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção de título de *Magister Scientiae*.

Orientadora: Denise Mara Soares Bazzolli

Coorientadores: Hilário Cuquetto Mantovani
Maria Catarina Megumi Kasuya

**VIÇOSA – MINAS GERAIS
2020**

DÂMARIS SIMÕES GOMES ABREU

**POTENCIAL BIOQUÍMICO E PERFIL DE CRESCIMENTO
DE ISOLADOS DE *Streptomyces* spp**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção de título do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 05 de novembro de 2020.

Assentimento:

Dâmaris Simões Gomes Abreu
Autora

Denise Mara Soares Bazzolli
Orientadora

DÂMARIS SIMÕES GOMES ABREU

**POTENCIAL BIOQUÍMICO E PERFIL DE CRESCIMENTO
DE ISOLADOS DE *Streptomyces* spp**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção de título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 05 de novembro de 2020.

Dr. Hilário Cuquetto Mantovani
(UFV)

Dr. Wendel Batista da Silveira
(UFV)

Dra. Tania Maria Fernandes Salomão
(UFV)

Dra. Denise Mara Soares Bazzolli
(Orientadora)
(UFV)

Dedico este trabalho ao meu Deus, à minha família, que sempre me apoiou nos momentos mais difíceis, e ao meu marido Gabriel, que sempre dá um jeito de me arrancar sorrisos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, Ele sabe o porquê;

Ao meu marido Gabriel, por ser meu refúgio e meu lar;

Aos meus pais, Jaelson e Damares, por desde o início acreditarem em mim e meus irmãos, Evellyn e Kevyn pelo aconchego e momentos de alegria;

À Universidade Federal de Viçosa, pela estrutura oferecida no Campus mais lindo do Brasil;

Ao Programa de Microbiologia Agrícola e seus brilhantes professores pela oportunidade de fazer parte de um dos melhores cursos de pós-graduação em microbiologia do país;

À FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais); à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), pelos recursos financeiros essenciais para a execução deste trabalho;

À Empresa Sítio Barreiras Fruticultura LTDA pela parceria e apoio que têm sido aplicados durante esse tempo de trabalho;

À minha professora e orientadora Denise Mara Soares Bazzolli, por confiar em mim para executar esse trabalho, e por toda orientação, sugestões, correções, e paciência durante esse período;

Aos meus coorientadores professora Maria Catarina Megumi Kasuya e professor Hilário Cuquetto Mantovani, por participarem desse projeto, e o incentivo a seguir diversos caminhos;

Aos membros da banca pela disponibilidade e pela contribuição no trabalho;

Aos meus amigos, que sempre me apoiaram nessa empreitada, e foram meu alívio nos momentos de tensão; em especial Mísia, por dividir por tanto tempo um lar, e sempre estar disponível nas horas do sufoco;

À Igreja Presbiteriana de Viçosa, pelo constante renovo da minha fé;

À querida amiga Rita, por me permitir fazer a continuação do seu trabalho, e pela ajuda a cada dúvida que tinha;

Aos meus colegas do LGMB, em especial Lílian e Felipe por todo auxílio com os experimentos, e companhia que fizeram durante esses dois últimos anos;

A todos os técnicos e funcionários do almoxarifado, cozinha, portaria e secretaria por serem sempre muito dedicados ao trabalho;

A técnica Patrícia Pereira Fontes, sempre muito prestativa e eficiente no auxílio de todo trabalho executado ali no laboratório;

Aos demais que, de alguma forma, colaboraram com meu trabalho,

Meus mais sinceros agradecimentos!

“A persistência é o menor caminho do êxito”.

Charles Chaplin

BIOGRAFIA

Dâmaris Simões Gomes Abreu, nasceu em 24 de fevereiro de 1993, na cidade de Caxambu, estado de Minas Gerais, Brasil. Em março de 2013, ingressou no curso de Licenciatura em Ciências Biológicas na Universidade Federal de Viçosa, graduando-se em julho de 2018. Em agosto de 2018, iniciou o Curso de Mestrado no Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola da Universidade Federal de Viçosa, obtendo o título em outubro de 2020.

RESUMO

ABREU, Dâmaris Simões Gomes, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, outubro de 2020. **Potencial bioquímico e perfil de crescimento de isolados de *Streptomyces* spp.** Orientadora: Denise Mara Soares Bazzoli. Coorientadores: Hilário Cuquetto Mantovani e Maria Catarina Megumi Kasuya.

Bactérias do gênero *Streptomyces* pertencentes ao filo Actinobacteria são Gram-positivas com alto conteúdo GC no seu DNA. São predominantes no solo e há uma estimativa de que cerca de 80% das substâncias bioativas naturais do mundo, como antibióticos, substâncias antitumorais, imunossuppressores, pesticidas, pigmentos e diversas enzimas de interesse industrial sejam produzidas por *Streptomyces* spp. O rastreamento de novas fontes de enzimas com capacidade de catalisar diferentes reações é um aspecto atraente para indústria biotecnológica. Uma forma de encontrar novas fontes, é a partir da triagem de um grande número de microrganismos, aumentando a probabilidade de se encontrar fontes promissoras para uma ampla gama de enzimas. O objetivo desse trabalho foi caracterizar isolados de *Streptomyces* spp. em relação à produção de diversas enzimas de interesse biotecnológico e investigar o perfil de crescimento de alguns dos isolados considerados mais promissores. Na primeira etapa, foi realizada análise qualitativa para atividade das enzimas: amilase, celulase, protease, lipase, L-asparaginase e L-glutaminase. Os isolados de *Streptomyces* spp. investigados foram capazes de expressar atividade de diferentes enzimas nas condições analisadas. Assim, 5% dos isolados apresentaram atividade de todas as 6 enzimas investigadas, 30% foram capazes de expressar atividade para 5 diferentes enzimas, 30% (4), 19% (3) e 16% apenas um único perfil de atividade. Três isolados foram investigados quanto ao perfil de crescimento. Para isso, os isolados identificados como CAB25, CAB50 e CAB66 foram inoculados nos caldos BD (Batata Dextrose) e ISP-2 (*International Streptomyces Project*), por 12 dias a 28 °C e 150 RPM, e o crescimento acompanhado por massa seca, consumo de glicose e variação do pH ao longo do período de análise. A partir dos resultados obtidos, pôde-se observar que houve relação entre variação de pH e aumento de massa seca, sendo a tendência de incremento de biomassa ao longo do tempo significativamente diferente entre os dois meios de cultura e para todos os isolados testados. A escolha do meio de cultura apropriado é importante para análise de isolados de *Streptomyces*, visto que o potencial de produção de compostos bioativos é influenciado pelas condições culturais. A análise do pH do sobrenadante

das culturas em meio ISP-2, de neutro a alcalino, revelou que os isolados de *Streptomyces* possuem características interessantes para aplicação em solos ácidos. Portanto, com este trabalho, foi possível selecionar isolados de *Streptomyces* spp. produtores de enzimas de interesse biotecnológico e com taxa de crescimento rápido, o que permite desenvolver plataformas ou chassis biotecnológicos de *Streptomyces* spp.

Palavras-chave: Actinobacteria, potencial enzimático, crescimento microbiano.

ABSTRACT

ABREU, Dâmaris Simões Gomes, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, October, 2020. **Biochemical potential and growth profile of *Streptomyces* spp isolates.** Adviser: Denise Mara Soares Bazzoli. Co-advisers: Hilário Cuquetto Mantovani e Maria Catarina Megumi Kasuya.

Bacteria of the genus *Streptomyces* belonging to the phylum Actinobacteria are Gram-positive with high GC content in their DNA. They are prevalent in the soil and it is estimated that about 80% of the world's natural bioactive substances, such as antibiotics, antitumor substances, immunosuppressants, pesticides, pigments and various enzymes of industrial interest are produced by *Streptomyces* spp. The screening of new sources of enzymes capable of catalyzing different reactions is an attractive aspect for the biotechnology industry. One way to find new sources is by screening a large number of microorganisms, increasing the probability of finding promising sources for a wide range of enzymes. The objective of this work was to characterize isolates of *Streptomyces* spp. regarding the production of several enzymes of biotechnological interest and to investigate the growth profile of some of the isolates considered most promising. In the first stage, a qualitative analysis was performed for enzyme activity: amylase, cellulase, protease, lipase, L-asparaginase and L-glutaminase. The isolates of *Streptomyces* spp. investigated were able to express activity of different enzymes under the conditions analyzed. Thus, 5% of the isolates showed activity of all 6 investigated enzymes, 30% were able to express activity for 5 different enzymes, 30% (4), 19% (3) and 16% only a single activity profile. Three isolates were investigated for growth profile. For this, the isolates identified as CAB25, CAB50 and CAB66 were inoculated in BD (Potato Dextrose) and ISP-2 (International *Streptomyces* Project) broths, for 12 days at 28 ° C and 150 RPM, and the growth verified by dry mass, glucose consumption and pH variation over the analysis period. From the results obtained, it was observed that the pH variation and increase in dry mass were related, with the tendency of increasing biomass over time significantly different between the two culture media and for all tested isolates. The choice of the appropriate culture medium is important for the analysis of *Streptomyces* isolates, since the production potential of bioactive compounds is influenced by cultural conditions. The analysis of the pH of the cultures supernatant in ISP-2 medium, from neutral to alkaline, indicated that the *Streptomyces* isolates have interesting characteristics for application in acidic soils. Therefore, with this work, it was possible to select

isolates of *Streptomyces* spp. producers of enzymes of biotechnological interest and with a rapid growth rate, which allows the development of biotechnological platforms or chassis of *Streptomyces* spp.

Keywords: Actinobacteria, enzymatic potential, microbial growth.

LISTA DE ABREVIATURAS

BDA – Batata Dextrose ágar

BTB: Azul de Bromotimol

CAB – Actinobacteria proveniente de composto de bananeira

DNA – Ácido desoxirribonucleico

FIG – Figura

HIV - vírus da imunodeficiência humana

HPLC – *High performance liquid chromatography*

ISP – *International Streptomyces Project*

L-Asp: L-asparagina

L-Glut: L-glutamina

LLA - Leucemia linfoblástica aguda

LMA - leucemia mieloide aguda

MCD – Meio modificado Czapek–Dox

mL – Mililitro, unidade de medida de volume (1×10^{-3} L)

PCA – *Plate Count Agar*

µL – Microlitro, unidade de medida de volume (1×10^{-6} L)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1	<i>Streptomyces</i> spp.: chassis biotecnológicos e perfil de crescimento	17
2.2	<i>Streptomyces</i> e o potencial biotecnológico de suas enzimas	18
3	MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1	Microrganismos, condições de cultura e manutenção	24
3.2	Análise da produção de enzimas com potencial biotecnológico por <i>Streptomyces</i> spp	24
3.2.1	Amilase	25
3.2.2	Celulase	25
3.2.3	Protease	25
3.2.4	Lipase	26
3.2.5	L-asparaginase	26
3.2.6	L-glutaminase	26
3.2.7	Parâmetros atribuídos como score da produção enzimática por <i>Streptomyces</i> spp	27
3.3	Análise morfológica e cultural de <i>Streptomyces</i> spp. de acordo com o meio de cultivo	27
3.4	Determinação da curva de crescimento	28
3.4.1	Determinação da massa seca micelial	28
3.4.2	Análise do consumo de glicose e presença de ácidos orgânicos	28
3.4.3	Análises estatísticas	29
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
4.1	Análise da produção de enzimas com potencial biotecnológico	30
4.2	Análise morfológica e cultural de <i>Streptomyces</i> spp. de acordo com o meio de cultivo	41
4.3	Determinação da curva de crescimento por massa seca	44
4.4	Análise por HPLC.....	53
4.5	Análises estatísticas	53
5	CONCLUSÃO	55

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
ANEXOS	69

1 INTRODUÇÃO

Streptomyces é um dos principais gêneros de bactérias pertencentes ao filo Actinobacteria contabilizando centenas de espécies já descritas. São bactérias aeróbias e amplamente distribuídas em ecossistemas aquáticos e terrestres, porém predominantes em solo e vegetação em decomposição (BARKA *et al.*, 2015). A propriedade mais notável desse gênero é a sua capacidade em produzir diversos compostos bioativos, tanto primários quanto secundários, muitos dos quais têm valiosas aplicações industriais e farmacêuticas, como compostos antibacterianos, antifúngicos, antivirais, anti-hipertensivos, imunossupressores e compostos antitumorais (JONES; ELLIOT, 2018). *Streptomyces* spp. também são frequentemente descritas como parte de microbiomas associados a plantas e insetos, conferindo vantagens como promoção de crescimento, absorção de nutrientes, tolerância ao estresse e resistência a patógenos resistentes (CHEVRETTE *et al.*, 2019; TRIVEDI *et al.*, 2020).

Uma grande variedade de enzimas biologicamente ativas também é produzida por *Streptomyces* terrestres. Entre elas, pode-se citar a produção de quitinases, ureases, amilases, proteases e celulases, amplamente usadas na indústria têxtil, alimentícia e farmacêutica (HARIR *et al.*, 2018). Actinobacteria também já foi descrita como uma excelente fonte de L-asparaginase e L-glutaminase (NARAYANA *et al.*, 2008), enzimas promissoras no tratamento de tumores e imunomoduladores que auxiliam na deficiência imunológica, utilizado em diferentes tratamentos terapêuticos (MEENA *et al.*, 2015).

Existe um aumento mundial no consumo de enzimas industriais, mas apesar de enzimas de origem microbiana serem consideradas uma fonte promissora, a produção ainda não é suficiente de forma que cubra a demanda atual (CELAYA-HERRERA *et al.*, 2020). O mercado global de enzimas industriais foi avaliado em US \$ 5,6 bilhões em 2019, com expectativa de crescimento anual (CAGR) de 6,4% de 2020 a 2027 (MARKET RESEARCH REPORT, 2020). Porém, o Brasil é um país essencialmente importador de enzimas (cerca de 86% das enzimas vem de fora do país), além de apresentar uso ainda reduzido de enzimas de origem natural em processos industriais quando comparado com outros países (POLITZER *et al.*, 2006). Assim, a inserção e consolidação do Brasil como produtor de tecnologia enzimática faz-se necessário.

O rastreamento de novas fontes enzimáticas capazes de catalisar diferentes reações é aspecto pertinente à indústria biotecnológica. Uma forma de encontrar novas fontes, é a partir da triagem de grande número de microrganismos, pois devido à sua ampla diversidade e versatilidade metabólica, a probabilidade de se encontrar fontes promissoras para uma ampla gama de enzimas torna-se maior. *Streptomyces* spp. apresentam notável capacidade de síntese

de numerosas enzimas hidrolíticas extracelulares para degradar material orgânico em seu habitat natural, podendo estas serem extraídas para uso comercial (CHAKRABORTY *et al.*, 2008). Essa características tornam *Streptomyces* excepcionais agentes de biorremediação do solo, podendo promover o crescimento de plantas, atuar em solos contaminados, por exemplo, com sal (GOPALAKRISHNAN *et al.*, 2013), ou ainda auxiliar na manutenção do pH, principalmente em solos ácidos (ROMANO-ARMADA *et al.*, 2020).

O crescimento microbiano pode ser definido como o aumento do número de células microbianas em uma população, sendo uma função de diversos fatores físico-químicos que podem variar de acordo com as exigências nutricionais das espécies microbianas. Em laboratório, este crescimento pode ser avaliado pela medida direta do aumento da massa celular dentro de um intervalo de tempo, e sob condições determinadas, podendo ser medido frequentemente avaliada pela turbidez da cultura crescida em meio líquido. Porém, um grande inconveniente no estudo do crescimento de organismos filamentosos é a incapacidade de usar a turbidometria como medida da concentração de biomassa (FLOWERS; WILLIAMS, 1977). Dessa forma, uma alternativa torna-se necessária para monitorar o crescimento desses organismos. Uma das formas usadas frequentemente para avaliar o crescimento de microrganismos filamentosos é a determinação de massa seca, técnica proposta primariamente por Jacques Monod (MONOD, 1949).

O trabalho com essas actinobactérias teve início em 2015, em que vários isolados do gênero *Streptomyces* foram obtidos a partir de um composto orgânico maduro (fase IV de compostagem) produzido e comumente utilizado pela Empresa Sítio Barreiras Fruticultura Ltda (MELO, 2019). Neste trabalho, os isolados CAB 25, CAB 50 e CAB66 demonstram diversidade morfológica e apresentaram características interessantes de promoção de crescimento vegetal e controle de fitopatógenos como *Fusarium* spp. e *Colletotrichum lindemuthianum*. Assim, o presente trabalho teve como objetivo principal realizar uma triagem de isolados de *Streptomyces* spp. com relação a produção de diferentes enzimas de uso industrial a partir de uma coleção de 43 isolados; além de investigar o crescimento *in vitro* dos 3 isolados supracitados considerados como promissores para a promoção de crescimento vegetal e controle de fitopatógenos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Streptomyces* spp.: chassis biotecnológicos e perfil de crescimento

Streptomyces é um gênero pertencente ao filo Actinobacteria, representado por bactérias Gram-positivas, aeróbias, com genomas de elevado conteúdo GC (geralmente acima de 70%) e crescimento filamentosos (PROCÓPIO *et al.*, 2012). São bactérias ubíquas, mas abundantes no solo, sendo responsáveis por grande parte da digestão de carboidratos estruturais, como quitina e celulose. Várias espécies desse gênero são reconhecidas como decompositoras de materiais tóxicos e utilizadas em processos de biorremediação e compostagem, sendo sua característica mais marcante a produção de uma grande variedade de compostos bioativos primários e secundários (SHARMA *et al.*, 2014).

As actinobactérias também são caracterizadas pela produção de vários pigmentos em meios naturais ou sintéticos, os quais são considerados uma importante resposta às condições de cultivo (MANTECA *et al.*, 2018). Esses pigmentos também servem como resposta à radiação, além de ser um dos padrões usados para identificação das espécies (SHIRLING & GOTTLIEB, 1966). Esses pigmentos geralmente vêm em vários tons de azul, violeta, vermelho, rosa, amarelo, verde, marrom e preto, que podem ser excretados no meio ou ficarem ligados ao micélio. Os pigmentos produzidos por *Streptomyces* podem ser endógenos, quando associados a estruturas celulares e não são secretados para o meio externo ou exopigmentos, que são liberados para o meio circundante (LI *et al.*, 2015).

O ciclo de vida de *Streptomyces* abrange três estágios de desenvolvimento bem estabelecidos: hifas vegetativas, hifas aéreas e esporos (JONES; ELLIOT, 2018). A germinação de esporos para produção de micélio se dá quando os indivíduos se encontram em condições favoráveis, após a germinação, as células apresentam crescimento com hifas vegetativas, o que permite que a bactéria colonize o solo (HOPWOOD, 2007). *Streptomyces* são consideradas bactérias de crescimento lento (ROMANO-ARMADA *et al.*, 2020). Sob condições de abundância de nutrientes e energia, as hifas são altamente ramificadas e secretam uma série de enzimas extracelulares, a fim de obter os nutrientes necessários para o crescimento. Porém, em condições de escassez de nutrientes que restringem o crescimento celular, ocorre a eventual diferenciação em esporos e, portanto, o reinício do ciclo. Essa mudança morfológica é acompanhada por alterações metabólicas que resultam na indução do metabolismo secundário (HARIR *et al.*, 2013).

Em culturas líquidas, *Streptomyces* spp. crescem na forma granular ou *pellets* (WILLIAMS *et al.*, 1974). Esses *pellets* são compostos de hifas densamente entrelaçadas e geralmente têm forma esférica e estão sujeitas a limitações de transferência de massa que produzem gradientes de soluto através das esferas. As células no centro do pellet tornam-se limitadas em nutrientes e, à medida que o pellet aumenta de tamanho, o crescimento é eventualmente confinado a uma forma de espessura limitada na superfície da esfera (PIRT, 1967). *Streptomyces* são descritos como preferindo pH ambiental neutro a alcalino, embora ocorram comumente em pH e condições nutricionais extremamente variáveis. Porém, quando crescidos mediante a uma alta carga orgânica, há possibilidade de crescimento em uma ampla faixa de pH (KONTRO *et al.*, 2005).

O crescimento de *Streptomyces* em meio líquido é muito importante para a produção de metabólitos secundários e para vários protocolos de manipulação genética, incluindo eletroporação, transformação de protoplastos, conjugação e isolamento de DNA genômico/plasmídeo (SHEPHERD *et al.*, 2010). Por ser uma bactéria de crescimento filamentosos, o estudo da fisiologia de *Streptomyces* é inibido pela formação de *pellets* miceliais em culturas líquidas, não sendo possível assim determinar por procedimentos convencionais como por densidade ótica (turbidometria) a curva de crescimento. Dessa forma, torna-se necessária a obtenção do padrão de crescimento por métodos alternativos, como análise da massa seca (HOBBS *et al.*, 1989).

2.2 *Streptomyces* e o potencial biotecnológico de suas enzimas

As enzimas são proteínas especializadas na catálise de reações biológicas que aceleram a velocidade de uma reação, sendo utilizadas em processos industriais há milhares de anos. Enzimas possuem estrutura molecular complexa, constituída principalmente por uma parte proteica que pode estar integrada a outras moléculas, como carboidratos e lipídeos (BOYER, 1986).

Esses biocatalisadores podem ser extraídos de diversas fontes animais, vegetais e de microrganismos. No entanto, as de origem microbiana são mais utilizadas por várias razões, como a possibilidade da utilização de substratos mais baratos como os resíduos de origem animal e vegetal, produção de grande massa microbiana em curto período de tempo e independente de fatores sazonais, além da possibilidade de otimização do rendimento na produção a partir de técnicas laboratoriais (OGAWA; SHIMIZU, 2002).

As enzimas estão presentes rotineiramente em vários processos, como nas indústrias de alimentos, têxtil, farmacêutica e produtos domésticos. Os processos catalisados por enzimas são geralmente mais rápidos, eficientes e ambientalmente sustentáveis, não alteram o equilíbrio químico das reações, além de possuir alta especificidade com seu substrato (CAMARGO *et al.*, 2009).

Para ser utilizado na produção de enzimas, um microrganismo deve ter elevada capacidade de síntese e secreção da enzima; suportar condições ambientais adversas relacionadas com a pressão osmótica e temperatura, além de ser tolerante à presença de substâncias tóxicas, que podem ser geradas no processo de tratamento da matéria-prima ou pelo próprio metabolismo celular (BASTOS, 2015). Dessa forma, devido à sua heterogeneidade bioquímica, diversidade ecológica e ampla capacidade de produção de metabólitos secundários, o gênero *Streptomyces* se torna ideal para a produção de enzimática em larga escala (MINOTTO *et al.*, 2014).

Atualmente, a produção industrial de enzimas é limitada, principalmente, devido aos custos dos substratos utilizados (POLITZER *et al.*, 2006). Dessa forma, o surgimento de novos campos de aplicação de enzimas e o desenvolvimento de novas tecnologias para obtenção das mesmas se torna um mercado promissor a ser explorado. Trabalhos recentes como de MANIGUNDAN *et al.* (2020), demonstraram que espécies de *Streptomyces* capazes induzir promoção de crescimento de plantas e controle de patógenos, muitas vezes são produtores de diversas enzimas, como amilases, proteases e celulases.

O amido é um dos principais carboidratos de reserva sintetizado pelas plantas. É um polímero de glicose de alta massa molecular, acumulado na forma de reserva, sendo uma fonte de carbono e energia essencial para muitos organismos (VEEN *et al.*, 2000). É um carboidrato em evidência na produção de biocombustíveis e um constituinte importante da dieta humana, sendo o principal produto de armazenamento de muitas culturas agrônômicas economicamente importantes, como trigo, arroz, batata, milho e tapioca. Das várias enzimas produzidas, as amilases são amplamente estudadas devido à sua importância na aplicação potencial em indústrias alimentícias, têxtil, farmacêutica e de papel celulose (GUPTA *et al.* 2003).

Com relação à sua aplicação, o uso de amilases é bastante diverso, sendo que atualmente correspondem aproximadamente 25% do mercado global de enzimas (VAIJAYANTHI *et al.*, 2016). Na produção têxtil, amilases são usadas em processos de coloração (NETO, 2001). Na panificação, essa enzima é usada para promover a decomposição do amido, o que aumenta a maciez e a textura da massa e do miolo, mantendo o pão fresco por mais tempo (VITOLLO, 2001). Amilase também é usada na indústria de sucos de frutas, cervejarias e na produção de

bebidas destiladas e ainda na indústria de papel, empregada a fim de melhorar a impressão e a resistência do papel (CAMARGO *et al.*, 2009). Amilase provenientes de *Streptomyces* são atualmente usadas em processos que reduzem o preço para o processamento do amido bruto (LAKSHMI *et al.*, 2020).

A celulose é um polímero de cadeia longa não ramificado constituído de unidades D-glicose ligadas por ligações glicosídicas 1,4- β , classificado como carboidrato. Esta macromolécula é o polissacarídeo mais abundante da natureza, e possui uma estrutura cristalina complexa, insolúvel em água e bastante resistente a enzimas despolimerizantes e reagentes químicos (MARCHESSAULT; SUNDARARAJAN, 1983). A celulose é um dos principais constituintes das paredes celulares das plantas, em condições naturais, quase sempre se combina com a hemicelulose e a lignina, o que dificulta ainda mais sua degradação por microrganismos e animais em geral (LEE; FAN, 1981). A bioconversão da celulose, é realizada pela enzima celulase.

Junto com outras enzimas, a celulase tem sido usada como catalisadora em detergentes desde 1950 (JAYANI *et al.*, 2005). Na indústria de sucos de frutas, a celulase liquefaz o tecido vegetal e permite extrair pigmentos do fruto (CAMARGO *et al.*, 2009). As celulases são as enzimas mais utilizadas na indústria têxtil, sendo aplicadas na lavagem do jeans e de outros tecidos para obtenção de aspecto envelhecido, além de que junto com outras enzimas, substitui o uso da soda cáustica e gera produtos de alta qualidade para posterior tingimento e processo de tecelagem com menor consumo de energia e menos resíduos (VAIJAYANTHI *et al.*, 2016). Além disso, a celulase tem sido usada na indústria de produção de biocombustíveis, onde ocorre a bioconversão da celulose em moléculas de glicose para o processo de fermentação (LAMBERTZ *et al.*, 2014).

As investigações sobre o mecanismo de degradação da celulose e suas possíveis aplicações vêm sendo realizadas há muitos anos (LEE; FAN, 1981). Celulases provenientes de espécies de *Streptomyces* são atualmente utilizadas como agentes auxiliares no pré-tratamento de materiais lignocelulósicos (JANG; CHEN, 2003), além de apresentarem potencial no tratamento de diversos resíduos agrícolas (CELAYA-HERRERA *et al.*, 2020).

Outra enzima de interesse industrial é a protease, que catalisa a quebra de proteínas em polipeptídios menores ou aminoácidos. Proteases realizam diversas funções vitais, como a regulação do processamento de proteínas e dos níveis proteicos intracelulares, remoção de proteínas anormais ou danificadas da célula e atuam na sinalização celular (KING *et al.*, 2014). Essas enzimas são encontradas em uma ampla diversidade de organismos vivos, e evoluíram independentemente várias vezes, sendo que diferentes classes de protease podem realizar a

mesma reação por mecanismos catalíticos completamente diferentes (RADZICKA; WOLFENDEN, 1996). Proteases são amplamente usadas na área científica, química e em diferentes processos industriais, tais como a síntese de alimentos, indústria farmacêutica, têxtil e de detergentes (ORLANDELLI *et al.*, 2012).

Proteases, são as principais enzimas industriais, correspondendo a mais de 65% do valor global do mercado (VAIJAYANTHI *et al.*, 2016). Foi descrito por CHEN *et al.* (2020) que uma linhagem de *Streptomyces* spp. com alta atividade proteolítica foi encontrada em compostagem de esterco de porco, podendo ser então uma alternativa viável no tratamento desse tipo de resíduo. A capacidade de produzir uma variedade de enzimas proteolíticas também é um fenômeno bem conhecido em actinobactérias mesofílicas, assim, a seleção de novas espécies com potencial de produção, torna-se um aspecto desejável para produção comercial (MOZERSKY *et al.*, 2002).

As enzimas lipolíticas catalisam a hidrólise de triglicerídeos com ácidos graxos de cadeia longa (maior ou igual a 10 átomos de carbono) (VERGER, 1997). No sistema digestivo humano, essas enzimas têm como função, basicamente, transformar lipídeos (gorduras) em ácidos e glicerol, desempenhando papéis essenciais na digestão, no transporte e no processamento dos lipídios da dieta, processo que também ocorre em diversos organismos vivos (SVENDSEN, 2000).

As lipases são produzidas por animais, plantas e micro-organismos, sendo que a maioria das lipases utilizadas em finalidades biotecnológicas são aquelas provenientes de fungos e bactérias (LIN *et al.*, 2006). A produção de lipases por várias cepas de *Streptomyces* foi relatada em 1978 por CHAKRABARTI *et al.*, desde então, mais atenção tem sido dada às lipases de origem actinobacteriana, uma vez que esses microrganismos são conhecidos por sua capacidade de produzir vários metabólitos secundários e, portanto, fornecem uma fonte potencial de enzimas com alta especificidade de substrato. (VAIJAYANTHI *et al.*, 2016).

Na indústria, as lipases possuem diversas aplicações, como na produção de detergentes, tratamento de água residual (decomposição e remoção de substâncias oleosas), na aplicação como aditivos nos alimentos levando à modificação no sabor (SVENDSEN, 2000), e ainda na produção de compostos farmacêuticos, agroquímicos e compostos aromáticos (JAEGER; EGGERT, 2002). A aplicação de lipases para a produção de biodiesel, a partir de óleos vegetais brutos, possibilita produzir um produto de alta pureza, proveniente de gorduras descartadas, pois atuam sobre ácidos graxos tanto livres quanto ligados ao glicerol (PEREIRA *et al.*, 2012).

L-asparaginase é uma amidohidrolase que catalisa L-asparagina em L-aspartato e amônia. A aplicação mais notável dessa enzima é com relação à sua propriedade antitumoral.

A descoberta e o desenvolvimento da L-asparaginase como uma droga anticâncer ocorreu a partir de 1953 (KIDD, 1953), sendo aprovada para uso médico nos Estados Unidos em 1978 (KIM *et al.*, 2016). A L-asparaginase é comumente usada como uma combinação de drogas quimioterápicas para o tratamento de leucemia linfoblástica aguda (LLA) em adultos e crianças e Linfoma não Hodgkin em crianças (MASHBURN; WRISTON, 1964), estando atualmente na lista de medicamentos essenciais da Organização Mundial de Saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2019) e, portanto, com o incentivo para a constante procura por novas fontes microbianas.

A L-asparaginase está amplamente presente em plantas, animais e microrganismos, mas não em humanos, sendo os microrganismos considerados a melhor fonte dessas enzimas, devido ao seu fácil cultivo e manipulação (KUMAR; SOBHA, 2012). Células normais podem sintetizar L-asparagina com a ajuda da asparagina sintetase, ao passo que certas células malignas sensíveis não podem sintetizá-la por si mesmas e requerem uma fonte externa de L-asparagina para crescer. Durante o tratamento de LLA com L-asparaginase, toda a asparagina circulante no corpo do paciente é hidrolisada em ácido aspártico e amônia, evitando a absorção de asparagina pelas células tumorais, privando assim as células tumorais de sua fonte extracelular de L-asparagina (FERNANDES *et al.*, 2016).

As asparaginases também são utilizadas como um auxiliar de processamento de alimentos para reduzir a formação de acrilamida, carcinógeno comum em produtos alimentícios com amido, como salgadinhos, biscoitos e batata frita (KORNBRUST *et al.*, 2010). As asparaginases podem reduzir efetivamente o nível de acrilamida em até 90% em uma variedade de alimentos ricos em amido, sem alterar o sabor e a aparência do produto final (HENDRIKSEN *et al.*, 2009).

Clinicamente, três formulações de L-asparaginase estão disponíveis atualmente, duas de fontes bacterianas provenientes de *Escherichia coli* e uma de *Erwinia chrysanthemi*. Porém, o tratamento proveniente dessas fontes às vezes resulta em reações de hipersensibilidade e reações adversas, como choque anafilático (MAHAJAN *et al.*, 2012). Sendo assim, novas fontes para produção dessa enzima têm sido constantemente investigadas (DORIYA; KUMAR, 2016), sendo actinobactérias descritas diversas vezes como promissoras para a produção de L-asparaginase (CIESAROVÁ *et al.*, 2006; DORIYA; KUMAR, 2016; SAHU *et al.*, 2007; VAJAYANTHI *et al.*, 2016;).

A glutamina amino-hidrolase (glutaminase ou L-glutaminase) é uma enzima que converte a glutamina em glutamato com a liberação de amônia. Atua como uma endopeptidase, hidrolisando as ligações peptídicas presentes no interior de uma molécula de proteína

(HASHIZUME *et al.*, 2010), além de desempenhar um papel importante no metabolismo de nitrogênio de procariotos e eucariotos (VIJAYAN *et al.*, 2017).

Da mesma forma que L-asparaginase, L-glutaminase foi descoberta com propriedades antitumorais, e atualmente é usada como terapia enzimática para o câncer, especialmente para LLA (ROBERT *et al.*, 2001). É característica de alguns tipos de células cancerosas uma alta taxa de consumo de glutamina. Com base nisso, terapias experimentais foram desenvolvidas para privar a L-glutamina das células tumorais (LAZARUS; PANASCI, 1986). A inibição da captação de glutamina pelas células tumorais é uma das formas possíveis de interromper o crescimento e otimizada com o uso da L-glutaminase. Isso, de fato, resulta em uma privação seletiva das células tumorais porque, ao contrário das células normais, não existem mecanismos biossintéticos de glutamina funcionando adequadamente (VIJAYAN *et al.*, 2017).

Além de agente antitumoral, L-Glutaminase já foi descrita como um agente antirretroviral eficiente (VIJAYAN *et al.*, 2017). Um dos estudos desenvolvidos por ROBERTS e MCGREGOR (1991), foi sobre a doença autoimune causada pelo HIV. Neste estudo, puderam perceber que a L-glutaminase reduz os níveis de glutamina no soro e tecidos por períodos prolongados, podendo causar uma redução na atividade da transcriptase reversa do HIV no soro.

Na indústria alimentícia, a glutaminase é usada como um agente intensificador de sabor e aroma, principalmente de alimentos fermentados (PALLEM *et al.*, 2010). Por ser tolerante a altas concentrações de sal, a glutaminase também é usada na fermentação do molho de soja, na qual hidrolisa a L-glutamina a L-glutamato, que é um aminoácido de alto sabor em alimentos (VIJAYAN *et al.*, 2017). Em seu trabalho, BEHROUZPOUR e AMINI (2019) identificaram uma série de isolados de *Streptomyces* no Golfo Pérsico como fontes de alto potencial de vários produtos biológicos, como a L-glutaminase.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Microrganismos, condições de cultura e manutenção

Os experimentos foram conduzidos utilizando 43 isolados de actinobactérias pertencentes ao gênero *Streptomyces* provenientes de composto orgânico fase IV utilizado em cultura de bananeira pela Empresa Sítio Barreiras Fruticultura Ltda e pertencentes à Coleção de Bactérias rizosféricas do Laboratório de Genética Molecular de Bactérias (LGMB) – DMB – Bioagro - UFV. Todos os isolados, além da caracterização morfológica, foram identificados em nível de gênero pelo sequenciamento parcial do gene correspondente ao RNAr 16S (MELO, 2019). Nesse trabalho, 43 isolados foram estudados e listados a seguir: CAB (Actinobactérias provenientes de composto): 12, 16, 17, 18, 19, 21, 23, 24, 25, 35, 36, 41, 42, 45, 50, 60, 62, 63, 64, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 75, 76, 77, 79, 80, 81, 91, 92, 94, 97, 98, 99, 100, 101, 103 e 104.

Os isolados foram cultivados a partir do crescimento em meio sólido ISP-2 (*International Streptomyces Project*) com a composição de extrato de levedura 4 g/L, extrato de malte 10 g/L, dextrose 4 g/L, ágar 20 g/L e pH 7,3 (SHIRLING & GOTTLIEB, 1966) a 28°C. Posteriormente, preservados em meio crioprotetor (*skim milk power* - SIGMA) acrescido de solução nutritiva esterilizada por filtração (glicose 7,5 g, sacarose 10 g, soro albumina bovina 1 g em 50 mL de água destilada estéril) a -20 °C e -80 °C e a mistura na proporção de 1:2 (respectivamente) no momento de uso.

3.2 Análise da produção de enzimas com potencial biotecnológico por *Streptomyces* spp.

Para avaliar a produção de enzimas de interesse biotecnológico (amilase, celulase, lipase, protease, L-asparaginase e L-glutaminase) cada isolado investigado foi reativado em meio sólido ISP-2, e incubado por 3 dias à temperatura de 28 °C. Após este período, discos de 6 mm de cada isolado foram obtidos com auxílio de canudo estéril e utilizados em cada bioensaio. A atividade das enzimas amilase, celulase, lipase e protease foi avaliada medindo o diâmetro do halo de hidrólise dos substratos com auxílio de um paquímetro. Cada ensaio foi feito em triplicata e os resultados são apresentados como média das três repetições. Posteriormente foi determinado o *score* de produção enzimática para cada enzima de acordo com o tamanho do halo formado (indicado no item 3.2.7).

Já os testes de L-asparaginase e L-glutaminase foram realizados a nível qualitativo, sendo os isolados classificados como não produtores, ou de hidrólise baixa, regular ou alta de acordo com a intensidade da mudança de coloração em cada bioensaio (indicado no item 3.2.7). Cada ensaio foi feito em triplicata e os resultados são apresentados como média das três repetições e para cada isolado de *Streptomyces*.

3.2.1 Amilase

A fim de caracterizar se a bactéria é produtora da enzima amilase, foi preparado meio basal ágar nutriente (extrato de carne 1 g/L, extrato de levedura 2 g/L, peptona 5 g/L, cloreto de sódio 5 g/L, ágar 15 g/L) e adicionado amido solúvel (SIGMA) 0,2%, o pH foi ajustado para 7,0 (SOUZA et al., 2008). Ao meio foram transferidos 3 discos tipo padrão (como descrito acima) de cada isolado de *Streptomyces* pré-ativado. As placas foram incubadas a 28 °C por no mínimo 48 horas, e a hidrólise do amido foi identificada e analisada a partir da revelação com o uso de uma solução de lugol (iodeto de potássio 10 g, iodo 5 g em 100 mL de água destilada). A ausência da cor púrpura-azulada é característica do complexo amido-iodo que indica hidrólise do amido (COON et al., 1957). Posteriormente, o halo de hidrólise foi medido e avaliado.

3.2.2 Celulase

Para averiguar a produção de celulases pelos isolados investigados, foi preparado um meio contendo Carboximetilcelulose (5,0 g/L), NaNO₃ (3,0 g/L), K₂HPO₄ (1,0 g/L), MgSO₄ (0,5 g/L), KCl (0,5 g/L), FeSO₄·H₂O (0,01 mg/L), e ágar (20,0 g/L) (WOOD et al; 1982). Ao meio foram transferidos 3 discos tipo padrão (como descrito acima) de cada isolado de *Streptomyces* pré-ativado. As placas foram incubadas a 28 °C por 96 h. Após esse período, foi adicionado 10 ml de solução corante de vermelho congo (2,5 g/L). Após 15 min, a solução foi descartada e as culturas lavadas com 10 ml de solução de NaCl 1mol.L⁻¹. Com auxílio de um paquímetro, foi medido o diâmetro de cada halo das colônias. Nos isolados produtores de celulase, foi possível observar um halo de cor clara com as bordas laranja, indicativo das áreas de hidrólise (LEWIS, 1988)

3.2.3 Protease

A atividade proteolítica foi detectada por hidrólise de caseína em placas de Ágar PCA (*Plate Count Agar*) (dextrose 1 g/L, triptona 5 g/L, ágar 15 g/L) contendo leite em pó desnatado reconstituído 10% (m/v) (MARCY; PRUEET, 2001). A solução de leite em pó desnatado foi preparada separadamente, autoclavada por 10 minutos a 110 °C e adicionado ao meio PCA.

Os discos com o cultivo do inóculo foram colocados sobre o meio e incubados à 28 °C por pelo menos 48h. O resultado do teste foi baseado na visualização de halos de hidrólise de caseína do leite ao redor de colônias, sendo medido o diâmetro dos halos produzidos (MARCY; PRUEET, 2001).

3.2.4 Lipase

O meio de detecção de lipase foi composto por peptona 10 g/L, cloreto de sódio 5 g/L, cloreto de cálcio 0,1 g/L, ágar 20 g/L, pH ajustado para 7,4. Este meio foi suplementado com Tween-80 (1%) (SIERRA, 1957). Ao meio foram adicionados 3 discos dos inóculos dos isolados pré ativados. As placas foram incubadas a 28 ° C por 96 horas. Quando um halo sedimentar com aspecto pulverulento aparecia ao redor das colônias lipolíticas, o bioensaio era marcado como positivo (SADEGHIAN et al. 2016).

3.2.5 L-asparaginase

Para detecção de L-asparaginase, foi preparado o meio Czapek Dox modificado (MCD) (GULATI et al., 1997), contendo: Na_2HPO_4 6 g/L; KH_2PO_4 2 g/L; NaCl 0,5 g/L; L-asparagina (L-asp) 20 g/L; glicerol 2 g/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2 g/L; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,005 g/L, ágar 15 g/L; pH 5,5. Este meio foi suplementado com solução 0,007% de BTB (Azul de bromotimol), para preparação das placas (MAHAJAN *et al.*, 2013). As placas foram inoculadas com culturas teste e incubadas a 28 °C por 15 dias. Para o controle, foram preparadas placas contendo o meio padrão sem adição de L-asp. A observação morfológica de isolados positivos foi feita a partir da observação da coloração do meio, onde nos isolados positivos é observada mudança na coloração de amarelo (cor original do meio) para azul (GULATI *et al.*, 1997).

3.2.6 L-glutaminase

A produção de L-glutaminase foi detectada pela suplementação do meio MCD modificado com L-Gln como única fonte de nitrogênio. O meio foi preparado com a seguinte composição: glicose (2 g/L), L-glutamina (10 g/L), KH_2PO_4 (1,52 g/L), KCl (0,52 g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,52 g/L), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (traço), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (traço), $\text{CuNO}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (traço) e ágar (18 g/L) de acordo com GULATI et al. (1997). O meio MCD foi suplementado com BTB 0,007%. O pH final do meio foi ajustado para 5,5. Todo o procedimento foi realizado de acordo com MAHAJAN *et al.* (2013). As placas controles continham meio de cultura sem adição de L-Gln.

As placas com o meio de detecção de L-glutaminase foram inoculadas com discos contendo os isolados de *Streptomyces* e em triplicata. As placas foram incubadas a 28 °C por um período total de 15 dias, a fim de permitir a difusão dos metabolitos produzidos pela ação da enzima investigada. A observação morfológica de isolados positivos foi feita por meio de coloração, em que nas cepas positivas foi observada mudança na coloração de amarelo para azul em diferentes intensidades (GULATI *et al.*, 1997).

3.2.7 Parâmetros atribuídos como *score* da produção enzimática por *Streptomyces spp.*

A fim de atribuir um parâmetro quantitativo para fins de comparação a produção de cada enzima específica (ou complexo) por cada isolado nas condições investigadas, foram atribuídas pontuações para os testes de amilase, celulase, protease e lipase (baseado no sistema de classificação de THAMPI, *et al.*, 2017) como segue abaixo:

(-) quando não há produção enzimática (não há presença de halo, medição do disco de inóculo igual a 6 mm);

(+) baixa produção enzimática (halo > 6 e ≤ 10 mm de diâmetro);

(++) Intermediária produção enzimática (halo > 10 e ≤ 20 mm de diâmetro);

(+++) Alta produção enzimática (halo > 20 e ≤ 30 mm de diâmetro); e

(++++) Excelente produção enzimática (halo > 30 mm de diâmetro).

A estimativa da presença de L-asparaginase e L-glutaminase, assim como a produção nas condições investigadas foram realizadas a partir da análise da mudança de coloração do meio após 15 dias de inoculação, sendo empregado o seguinte sistema de classificação:

(-) quando não há produção enzimática (ausência de coloração);

(+) produção enzimática baixa (baixa alteração de coloração);

(++) produção enzimática intermediária (média alteração de coloração);

(+++) produção enzimática alta (alteração de coloração intensa).

3.3 Análise morfológica e cultural de *Streptomyces spp.* de acordo com o meio de cultivo

Para análise do crescimento e determinação da curva de crescimento foram preparadas placas contendo 20 mL de meio BDA comercial (KASVI) (dextrose 20 g/L, extrato de batata 4 g/L, ágar 15 g/L) e o meio ISP-2 (Extrato de levedura 4 g/L, extrato de malte 10 g/L, dextrose 4 g/L, ágar 15 g/L) (SHIRLING & GOTTLIEB, 1966), ambos com pH ajustado para 7,0. Nesta

etapa, somente isolados CAB 25, CAB 50 e CAB 66 (selecionados previamente conforme descrito no item 1) foram investigados. As bactérias foram cultivadas por 15 dias, sendo que a cada 24 horas a mudança fenotípica de coloração foi documentada.

3.4 Determinação da curva de crescimento

3.4.1. Determinação da massa seca micelial

A fim de estabelecer a curva de crescimento dos 3 isolados selecionados previamente, foram realizados bioensaios utilizando-se dois meios de cultivo diferentes (usualmente usados no cultivo de *Streptomyces*): BD comercial (KASVI) (dextrose 20 g/L, amido de batata 4 g/L) e o ISP-2 (Extrato de levedura 4 g/L, extrato de malte 10 g/L, dextrose 4 g/L), de forma que fosse possível analisar o padrão de crescimento frente a diferentes fontes e carbono e energia, sendo mantidas as mesmas condições de cultivo e com pH inicial de 7,0 para ambos os meios de cultura utilizados.

Para cada meio de cultivo foram estabelecidos 14 pontos de coleta por tempo (horas): 0, 4, 8, 12, 16, 24, 36, 48, 72, 96, 144, 192, 240 e 288), sendo todos feitos em triplicata experimental.

O isolado foi cultivado em placas contendo meio BDA e ISP-2 (sólido) por 3 dias a 28°C. No dia do experimento, foram cortados discos homogêneos de 6 mm e adicionado um disco a cada frasco contendo o mesmo meio de cultivo em que foi crescido previamente. Os frascos tipo Erlenmeyer de 125 mL foram incubados a 28 °C sob agitação de 150 rpm.

A cada ponto de coleta, foram tirados aleatoriamente 3 frascos do shaker e o pH do sobrenadante foi aferido. O conteúdo de cada *Erlenmeyer* foi transferido para tubos tipo *falcon* rosqueados de 50 ml, e centrifugados a 6100 rpm por 20 min. Uma alíquota de 4 ml do sobrenadante foi armazenada para análises posteriores. O *pellet* foi ressuspensão em 5 ml de solução salina 0,85%, todo esse volume foi colocado em cadinhos de papel alumínio (previamente secos e tarados), e colocados em estufa a 105 °C. O cadinho contendo a massa seca foi pesado periodicamente até que atingisse peso constante.

Esse processo foi repetido a cada ponto de coleta pré estabelecido, sendo que no tempo zero, o processo foi realizado imediatamente após colocar o disco no meio. Os valores foram anotados e plotados em gráficos para análise dos resultados.

3.4.2 Análise do consumo de glicose e presença de ácidos orgânicos

De acordo com o gráfico obtido no experimento de massa seca, foram selecionados 7 pontos para verificar o consumo de glicose e a presença de ácidos orgânicos para cada isolado

(por hora: 0, 16, 36, 48, 72, 144 e 288). Os sobrenadantes adquiridos após a centrifugação no experimento de massa seca foram filtrados com filtro de 22 μm , transferidos para tubos tipo *vials*, onde foram analisados por HPLC (*High performance liquid chromatography*).

Os ácidos orgânicos e glicose foram determinados em um aparelho HPLC com detector Dionex Ultimate 3000 Dual (Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, EUA) equipado com um detector de índice de refração (RI) Shodex RI-101 mantido a 40 °C. Os ácidos orgânicos foram separados em uma coluna de exclusão iônica Phenomenex Rezex ROA (300 \times 7,8 mm) (Phenomenex Inc. Torrance, CA, EUA) mantida a 45 °C. As análises foram realizadas isocriticamente nas seguintes condições: fase móvel H_2SO_4 5 mmol L^{-1} , taxa de fluxo 0,7 ml min^{-1} , temperatura da coluna 40 °C, volume de injeção 20 μl .

As soluções estoque dos padrões foram preparadas utilizando glicose e os seguintes ácidos orgânicos: ácido acético, succínico, propiônico, valérico, isovalérico, isobutírico e butírico. Todas as soluções dos ácidos orgânicos foram preparadas na concentração final de 10 mmol/L , exceto ácido isovalérico (5 mmol/L) e ácido acético (20 mmol/L).

3.4.3 Análises estatísticas

Os dados obtidos no experimento de massa seca foram utilizados para o teste de correlação de Pearson, realizado entre a massa seca e o pH e, entre a massa seca e consumo de glicose (obtido em HPLC), considerando a repetição dentro do tratamento (combinação entre o isolado da bactéria e o meio de cultura) na qual houve pareamento das variáveis. Além disso, modelos aditivos generalizados com estimativa de suavidade integrada foram utilizados para estimar o crescimento de biomassa ao longo do tempo e comparar os meios de cultura para cada isolado. Os testes de correlação e os ajustes dos modelos aditivos generalizados foram realizados no software R utilizando, respectivamente, a função *cor.test* do pacote *stat* (R CORE TEAM, 2020) e a função *gam* do pacote *mgcv* (WOOD *et al.*, 2016; WOOD, 2017). Gráficos descritivos ou com as estimativas dos modelos generalizados aditivos foram construídos, respectivamente, no SigmaPlot *version* 12.5 (SYSTAT Software, Inc.) ou com o pacote *ggplot2* (WICKHAM, 2016) do R.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise da produção de enzimas com potencial biotecnológico

Uma grande variedade de enzimas biologicamente ativas é produzida por diversas espécies de *Streptomyces* terrestres, dando a elas diversas vantagens competitivas e permitindo interação com diversos outros organismos (SATHYA; USHADEVI, 2014). Nos testes de produção de amilase, celulase, protease e lipase, com exceção de 2 isolados, todos os demais isolados de *Streptomyces* spp. testados foram capazes de produzir uma ou mais enzimas hidrolíticas com diferentes scores. A partir dos dados apresentados, podemos observar na Figura 1 (A e B) o perfil de produção de enzimas de interesse biotecnológico pelos isolados CAB 12 a CAB 67 (Fig1A) CAB 68 a CAB 104 (Fig1B).

Como evidenciado nos resultados apresentados no Anexo 1, 9 isolados de *Streptomyces* foram capazes de produzir todas as enzimas em diferentes proporções: CAB 16, CAB 19, CAB 21, CAB 35, CAB 36, CAB 75, CAB 77, CAB 94 e CAB 98. Já os isolados CAB 17 e CAB 101 não foram capazes de produzir nenhuma das enzimas testadas nas condições investigadas.

A maioria das actinobactérias do solo são de natureza saprofítica e participam ativamente de processos de decomposição, influenciando também a fertilidade do solo. O fato de se apresentarem como bons produtores dessas enzimas, os torna candidatos ideais para serem aplicados no solo, uma vez que essas enzimas transformam os nutrientes complexos em formas minerais simples, realizando ciclagem de nutrientes, característica fundamental para o bom desenvolvimento de agriculturas diversas (JOG *et al.*, 2016). Essas enzimas também contribuem para seu potencial de biocontrole contra uma ampla gama de fitopatógenos, uma vez que a parede celular da maioria dos patógenos fúngicos e bacterianos consiste em polímeros como quitina, celulose, proteínas e lipídios (VAIJAYANTHI *et al.*, 2016).

O ambiente da rizosfera é bastante complexo, resultante da liberação de células, mucilagens, exsudados e substâncias liberadas pela lise das células, tais como aminoácidos, enzimas, proteínas, açúcares, carboidratos complexos, álcoois, vitaminas e hormônios (KLUEPFEL, 1993). Esses compostos são prontamente utilizados pelos microrganismos que se estabelecem na rizosfera, podendo realizar diversas relações ecológicas, auxiliando na manutenção e desenvolvimento das plantas (CORDEIRO *et al.*, 2012). Portanto, a capacidade de produzir diversas enzimas é uma característica extremamente favorável quando um microrganismo é cogitado para ser usado como agente promotor de crescimento e biorremediador. Além disso, as enzimas encontradas no solo são utilizadas como indicadores

da qualidade do solo por serem sensíveis às condições de manejo e estarem diretamente relacionadas com as transformações dos nutrientes (YANG *et al.*, 2008).

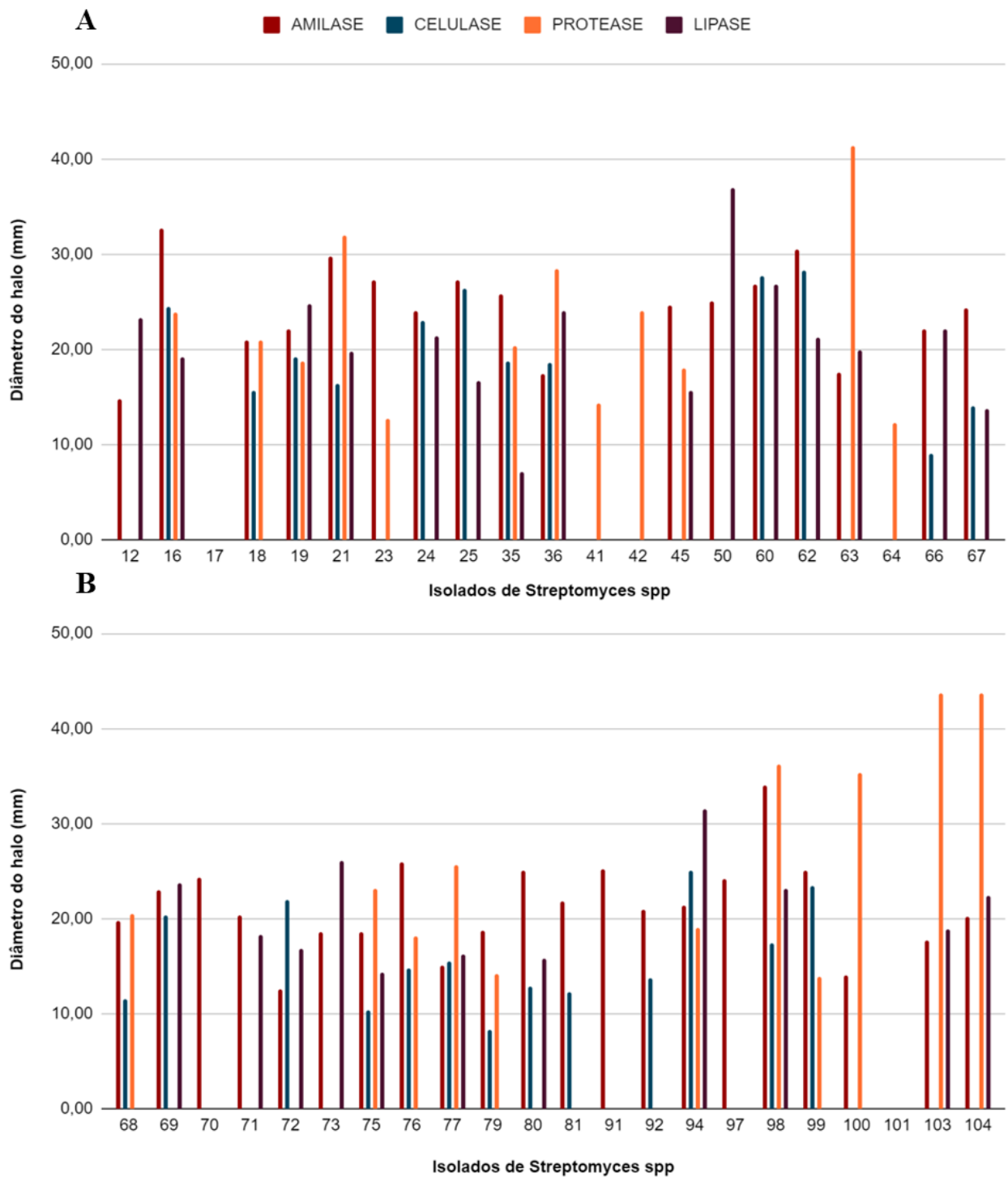


Figura 1. Perfil dos isolados de *Streptomyces* em relação à produção de enzimas hidrolíticas extracelulares. Cada valor do halo é uma média de 3 replicatas para cada isolado. A. Isolados 12 a 67 relativos à produção de amilase, celulase, protease e lipase. B. Isolados 68 a 104.

No teste de produção de amilase, dos 43 isolados analisados, 37 foram capazes de hidrolisar o amido presente no meio em diferentes intensidades. Apenas 6 foram classificados como não produtores de enzima amilolítica. Os isolados CAB 16, CAB 62 e CAB 98 foram os que apresentaram maior halo de hidrólise, sendo considerados como excelentes produtores de amilase (de acordo com os padrões estabelecidos no item 3.2.7).

Nenhum isolado obteve halo entre 0 e 10 mm (considerado como produção baixa), 10 isolados foram classificados como de produção intermediária e 24 isolados de alta produção. Na figura 2 é possível observar exemplos de resultados para diferentes intensidades de produção de amilase.

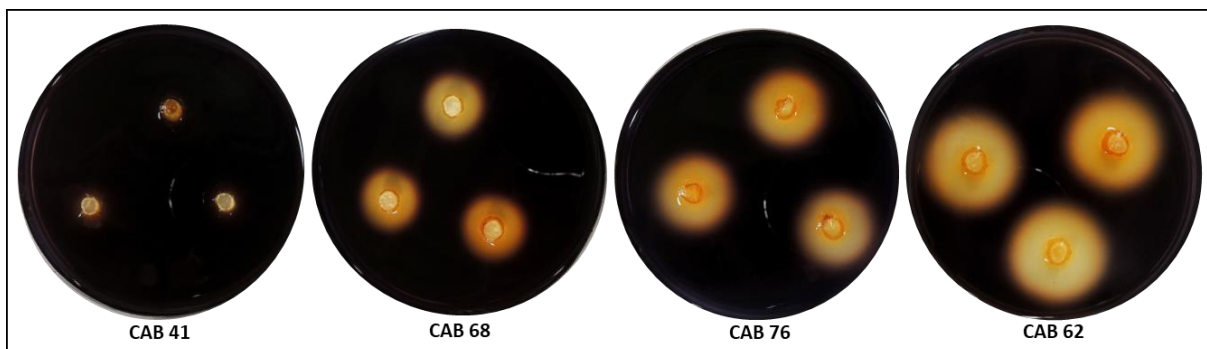


Figura 2. Representação do perfil de produção de amilase por isolados de *Streptomyces* spp. CAB41 não houve produção de amilase (-), CAB68 produção intermediária (++) , CAB76 alta produção (+++); CAB62 produção excelente (++++).

Assim como outras espécies bacterianas e fúngicas, algumas espécies de *Streptomyces* secretam amilases para o exterior das células, o que as ajuda a realizar digestão extracelular. A produção de amilases e celulasas é fundamental na degradação de resíduos vegetais, que alteram o fluxo de energia e nutrientes das raízes das plantas além de fazer parte da ciclagem de carbono. (BAREA *et al.*, 2005). Essa enzima também é de grande importância em aplicações biotecnológicas, como indústria de alimentos, fermentação e têxtil para indústrias de papel, devido à sua capacidade de degradar amido (VAIJAYANTHI *et al.*, 2016).

A amilase compreende um grupo de enzimas industriais com participação significativa no mercado global de enzimas (MARKET RESEARCH REPORT, 2020). As enzimas de fontes microbianas são geralmente utilizadas para atender às demandas industriais e têm contribuído significativamente para a produção de alimentos e bebidas nas últimas três décadas (POLITZER *et al.*, 2006). As amilases microbianas substituíram quase completamente os produtos químicos de hidrólise de amido na indústria de processamento de amido (ORLANDELLI *et al.*, 2012).

No teste de produção de celulase, 25 isolados foram capazes de hidrolisar a celulose presente no meio em diferentes intensidades, evidenciado pelo halo de coloração laranja

formado ao redor das culturas (Figura 3). Dezoito dos isolados investigados foram classificados como não produtores da enzima celulase nas condições investigadas. De acordo com os padrões estabelecidos, nenhum isolado foi classificado como excelente produtor de celulase, obtendo halo maior que 30 mm, 9 isolados tiveram sua produção classificada como alta, 14 como intermediária e 2 como fraca.

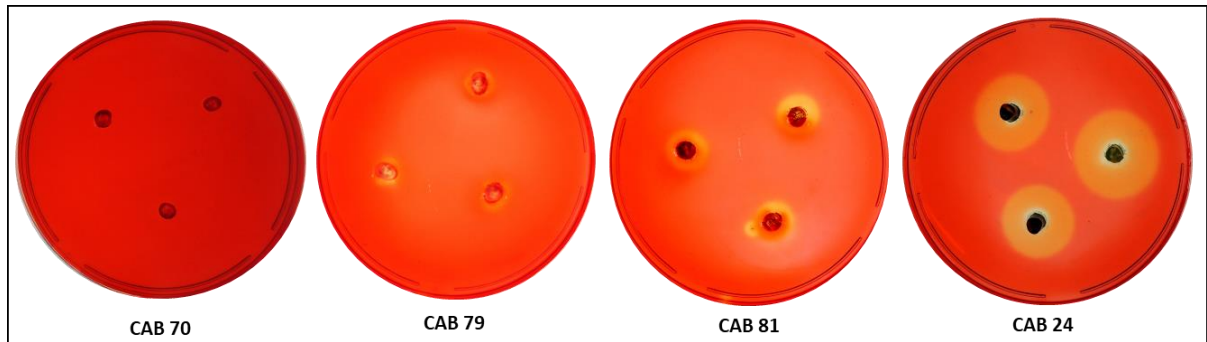


Figura 3 – Perfil de produção de celulase por isolados de *Streptomyces* spp. CAB70 produção negativa (-), CAB79 produção fraca (+), CAB81 produção intermediária (++); CAB24 produção alta (+++).

Além de participar ativamente na digestão de resíduos agrícolas e na ciclagem de carbono, a celulose é utilizada extensivamente como matéria-prima para as indústrias têxtil e de papel. A glicose derivada da celulose, via fermentação industrial, pode ser usada para produzir uma variedade de combustíveis, principalmente o bioetanol. Nesse processo, biomassa lignocelulósica como resíduos agrícolas, entre outros, fornecem matéria-prima de baixo custo para açúcares redutores visando a produção de bioetanol, por meio da ação de enzimas lignocelulolíticas, com vantagens econômicas e ambientais (VINHA *et al.*, 2010).

O substancial aumento do interesse na produção de celulases, devido principalmente às instabilidades na obtenção de combustíveis fósseis, promoveu a identificação e melhoramento genético de dezenas de microrganismos produtores destas enzimas (CHANDRA *et al.*, 2009). Carboidrases (como amilase e celulase) responderam por mais de 47,0% do faturamento global do mercado enzimático em 2019 (MARKET RESEARCH REPORT, 2020). Os avanços das pesquisas sobre celulases ocorreram em diversas áreas do conhecimento. Contribuições científicas vêm sendo dadas continuamente, no que tange ao isolamento de microrganismos produtores de celulases, ao aumento da expressão de celulases por mutações gênicas, à purificação e caracterização de componentes celulósicos, clonagem e expressão de genes, determinação de estruturas tridimensionais das celulases e à demonstração do potencial industrial dessas enzimas (ORLANDELLI *et al.*, 2012).

No teste para produção de protease, dos 43 isolados analisados, 23 foram capazes de hidrolisar a caseína do leite presente no meio em diferentes intensidades, evidenciado pelo halo mais claro formado ao redor das culturas positivas (Figura 4). Vinte isolados foram classificados como não produtores da enzima protease. Dos resultados positivos, 6 obtiveram halos maior que 30mm, sendo classificados como excelentes produtores; 8 isolados tiveram sua produção classificada como alta, 9 como intermediária e nenhum foi considerado como de fraca produção. O isolado CAB 63 foi o que obteve maior média de halo (acima de 40 mm), indicando maior produção da enzima nessas condições.

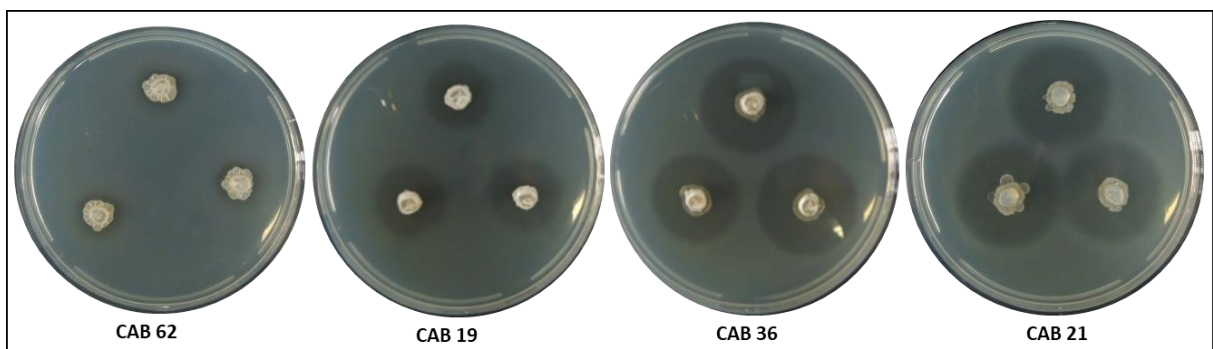


Figura 4 – Produção de protease. Perfil de produção de proteases por isolados de *Streptomyces* spp. CAB62 produção negativa (-), CAB19 produção intermediária (++) , CAB36 alta produção (+++) e CAB21 produção excelente (++++).

Quando depositadas no solo, proteases são capazes de degradar as paredes de células miceliais de parasitas fúngicos, participam ativamente da ciclagem de nitrogênio e auxiliam na degradação de diferentes resíduos, aumentando a biodisponibilidade para plantas e para a microbiota presente na rizosfera (CORDEIRO *et al.*, 2012). Além disso, as proteases fazem parte de um grupo de enzimas industriais amplamente utilizadas nos setores alimentícios, farmacêuticos e têxtil. Com a demanda crescente de enzimas nesses variados setores, haverá uma necessidade cada vez maior de biocatalisadores estáveis, ecologicamente sustentáveis e capazes de resistir a condições extremas de operação, sendo as enzimas de fontes bacterianas uma excelente alternativa (VAIJAYANTHI *et al.*, 2016).

No teste de produção de lipase, 26 isolados foram capazes de hidrolisar lipídio presente no meio em diferentes intensidades, evidenciado pelo halo de aspecto pulverulento formado ao redor das culturas, melhor visível quando visto contra a luz. Na Figura 5 temos resultados de amostras com halo negativo, e diferentes níveis de produção de lipase. Com relação a intensidade, 17 amostras foram classificadas como não produtores da enzima lipase, apenas 1 foi classificada como de fraca produção, 12 como intermediária, 11 alta e 2 como de excelente

produção, sendo que o isolado CAB50 foi o que obteve maior halo e considerado como o maior produtor da enzima entre as amostras analisadas.

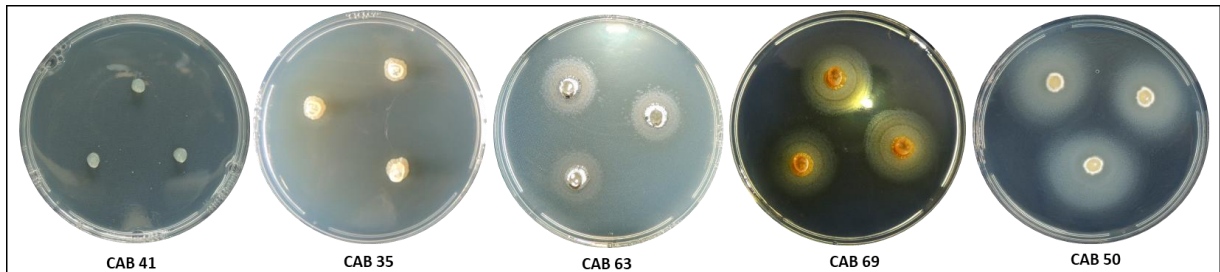


Figura 5 –Perfil da produção de lipases por isolados de *Streptomyces* spp. É possível observar o halo mais claro e de aspecto pulverulento ao redor das colônias positivas; CAB41 resultado negativo (-), CAB35 produção fraca (+), CAB63 produção intermediária (++) , CAB69 alta produção (+++) e CAB50 produção excelente (++++).

As lipases são produzidas a partir de várias actinobactérias, bactérias e fungos e possuem ampla gama de propriedades enzimáticas e especificidades de substrato, muito úteis para funções industriais, como processamento de gordura e óleos, aditivos, detergentes, cosméticos, fabricação de papel e produtos farmacêuticos (SATHYA; USHADEVI, 2014), sendo usada também em testes clínicos para determinar o nível de colesterol no soro sanguíneo (CAMARGO et al., 2009). Outra aplicação importante dessa enzima, é na área de biotecnologia, especialmente na produção de bioenergia, onde o setor encontra-se em expansão, resultado do aumento da demanda mundial de energia renovável (COLLA *et al.*, 2010).

Lipases provenientes de Actinobactérias já foram descritas como um dos fatores utilizados na promoção de crescimento vegetal (THAMPI; BHAI, 2017), e também como uma enzima importante na recuperação de solos contaminados com óleo vegetal residual e na biodegradação do óleo (MARGESIN *et al.*, 1999; NAKATANI *et al.*, 2012). Há também uma correlação direta entre a síntese de lipases e biosurfactantes por microrganismos devido à necessidade de metabolizarem compostos insolúveis em água, geralmente envolvidos na metabolização de substratos oleosos (COLLA *et al.*, 2010).

Nos testes de L-asparaginase e L-glutaminase, 20 isolados produziram as duas enzimas em diferentes proporções. 9 produziram apenas uma, e 14 não foram capazes de produzir nenhuma das enzimas, resultados mostrados na Figura 6 e Anexo 1.

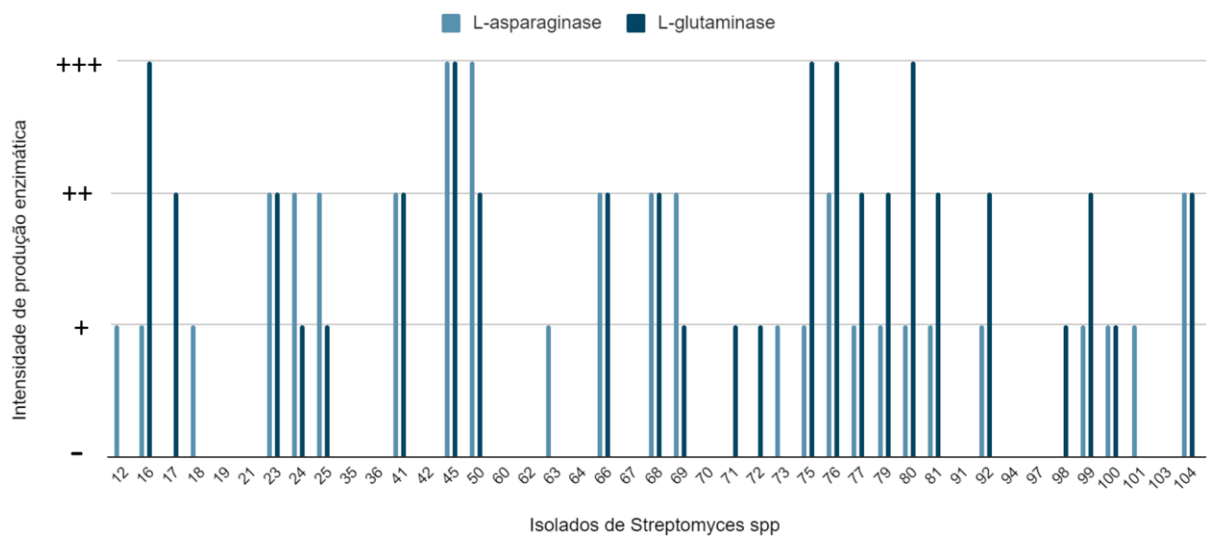


Figura 6. Produção de L-asparaginase e L-glutaminase por isolados de *Streptomyces*. A atividade enzimática foi classificada de acordo com a intensidade da mudança de coloração, sendo “+++” produção mais alta e “-“ ausência de produção.

L-asparaginase e L-glutaminase são enzimas importantes no processamento de alimentos (VIYAJAN et al, 2017), e também no tratamento de diferentes tipos de neoplasias, como Leucemia linfoblástica aguda (LLA), uma vez que grande parte das células tumorais requisitam aminoácidos como L-glutamina e L-asparagina. Durante o tratamento de LLA com essas enzimas, há uma privação pelas células tumorais de sua fonte extracelular desses aminoácidos, o que acarreta na inibição do crescimento tumoral (FERNANDES *et al.*, 2016). Atualmente, o mercado tem limitações na obtenção dessas enzimas portanto, novas fontes dessas enzimas são necessárias.

No teste de produção de L-asparaginase, 25 isolados foram capazes de hidrolisar a L-asparagina presente no meio em diferentes intensidades, evidenciado pela mudança de coloração do meio de amarelo para azul para as culturas positivas (Figura 7). Dezoito isolados foram classificados como não produtores da enzima L-asparaginase. Dos resultados positivos, apenas 2 obtiveram coloração mais forte, sendo classificados como de alta produção; 9 isolados tiveram o meio um pouco mais claro e sua produção foi classificada como intermediária, e 14 foram considerados como de fraca produção, onde a mudança de coloração foi mínima e somente ao redor da colônia. Os isolados CAB45 e CAB50 foram os que obtiveram coloração mais forte, indicando maior produção da enzima nessas condições.

Os controles também se mostraram eficazes, uma vez que o meio preparado com L-asparagina, mas sem inóculo (Figura 7A) permaneceu sem alteração (mostrando que a mudança de coloração não ocorre sem a presença de um organismo positivo), e o segundo controle, em que foi inoculado um organismo produtor, mas em um meio sem adição de L-asparagina (Figura

7B) não alterou a coloração, confirmando o resultado que a presença desse aminoácido é a responsável por fazer com que o microrganismo produtor altere a coloração do meio.

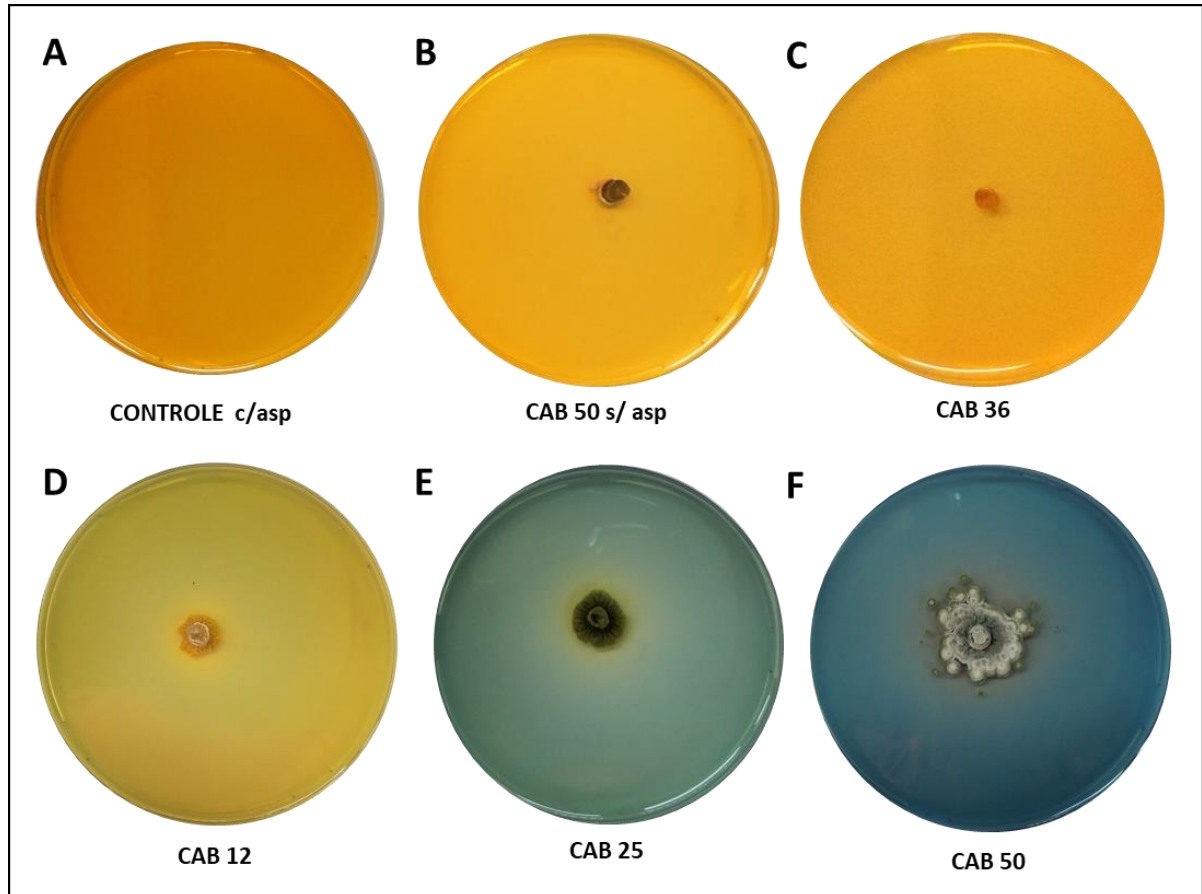


Figura 7. Perfil de produção de L-asparaginase por isolados de *Streptomyces* spp. A- controle: meio com L-asp, sem inóculo; B- controle: isolado CAB50 em meio sem L-asp, C- CAB36 halo -, D- CAB12 halo +, E- CAB25 halo ++, F- CAB50 halo +++.

A L-asparaginase tem sido usada como um medicamento quimioterápico no tratamento de LLA, uma doença ocorrente principalmente em crianças. Essa enzima também é usada na remoção de acrilamida encontrada em alimentos fritos e assados, que possui natureza carcinogênica (CIESAROVÁ *et al.*, 2006). A principal fonte comercialmente usada, é a proveniente de bactérias como *Escherichia coli* e *Erwinia carotovora*, porém, estudos recentes mostraram que a enzima dessas fontes muitas vezes causam anafilaxia e outras reações sensíveis anormais em vários pacientes, isso devido à baixa especificidade para asparagina (MAHAJAN *et al.*, 2012). A toxicidade e a repressão causadas pela L-asparaginase das fontes bacterianas já usadas, mudaram o foco para outros microrganismos como fungos e outras fontes, de forma que possa melhorar a eficácia da L-asparaginase usada nos tratamentos (DORIYA; KUMAR, 2016). Similarmente, actinobactérias têm se mostrado uma excelente

fonte de produção de L-asp, principalmente aquelas isoladas de solos (VAIJAYANTHI *et al.*, 2016), resultado comprovado nesse estudo, em que 25 isolados de *Streptomyces* spp. foram capazes de produzir L-asparaginase em diferentes intensidades.

Também já existem estudos relacionando o impacto de vários fatores físicos e químicos como pH, temperatura, concentração de cloreto de sódio, fontes de carbono e aminoácidos no crescimento de *Streptomyces* e na atividade da L-asparaginase (SAHU *et al.*, 2007). Estes tipos de estudos podem ser aplicados futuramente com os isolados apresentados neste trabalho, podendo otimizar e ampliar a produção dessa enzima.

No teste para a produção de L-glutaminase, 24 dos 43 isolados hidrolisaram a L-glutamina presente no meio em diferentes intensidades, evidenciado pela mudança de coloração do meio de amarelo para azul para as culturas positivas (Figura 8). Dezenove isolados foram classificados como não produtores da enzima L-glutaminase. Dos resultados positivos, apenas 5 obtiveram coloração mais forte, sendo classificados como de alta produção; 12 isolados tiveram o meio um pouco mais claro e sua produção foi classificada como intermediária, e 7 foram considerados como de fraca produção, onde a mudança de coloração foi mínima e somente ao redor da colônia. Apesar de vários isolados não produzirem essa enzima (ou produzirem em baixa quantidade), existem estudos em que diferentes características como fontes de carbono e variação de pH foram estabelecidas de maneira que houvesse uma otimização da produção dessa enzima (SIVAKUMAR *et al.*, 2006), estudos que podem ser aplicados também de forma a otimizar a produção por esses isolados.

Os controles serviram para confirmar a eficácia dos testes. O meio preparado com L-glutamina, mas sem inóculo (Figura 8A) permaneceu sem alteração (mostrando que a mudança de coloração não ocorre sem a presença de um organismo positivo). No segundo controle, foi inoculado um organismo produtor, porém em um meio sem adição de L-glutamina (Figura 8B), pelos resultados não houve alteração da coloração, confirmando o resultado que a presença desse aminoácido é a responsável por fazer com que o microrganismo produtor altere a coloração do meio.

A L-glutaminase é uma importante enzima industrial que encontra aplicações potenciais em diferentes setores, desde a terapêutica até a indústria alimentar. Muitas células cancerosas dependem da glutamina como fonte de carbono para alimentar as vias biosintéticas. Os inibidores da atividade da glutamina como a enzima L-glutaminase se têm ganhado atenção nos últimos anos devido ao seu efeito antiproliferativo e capacidade de induzir apoptose em alguns tipos de câncer (SHEIKH *et al.*, 2017).

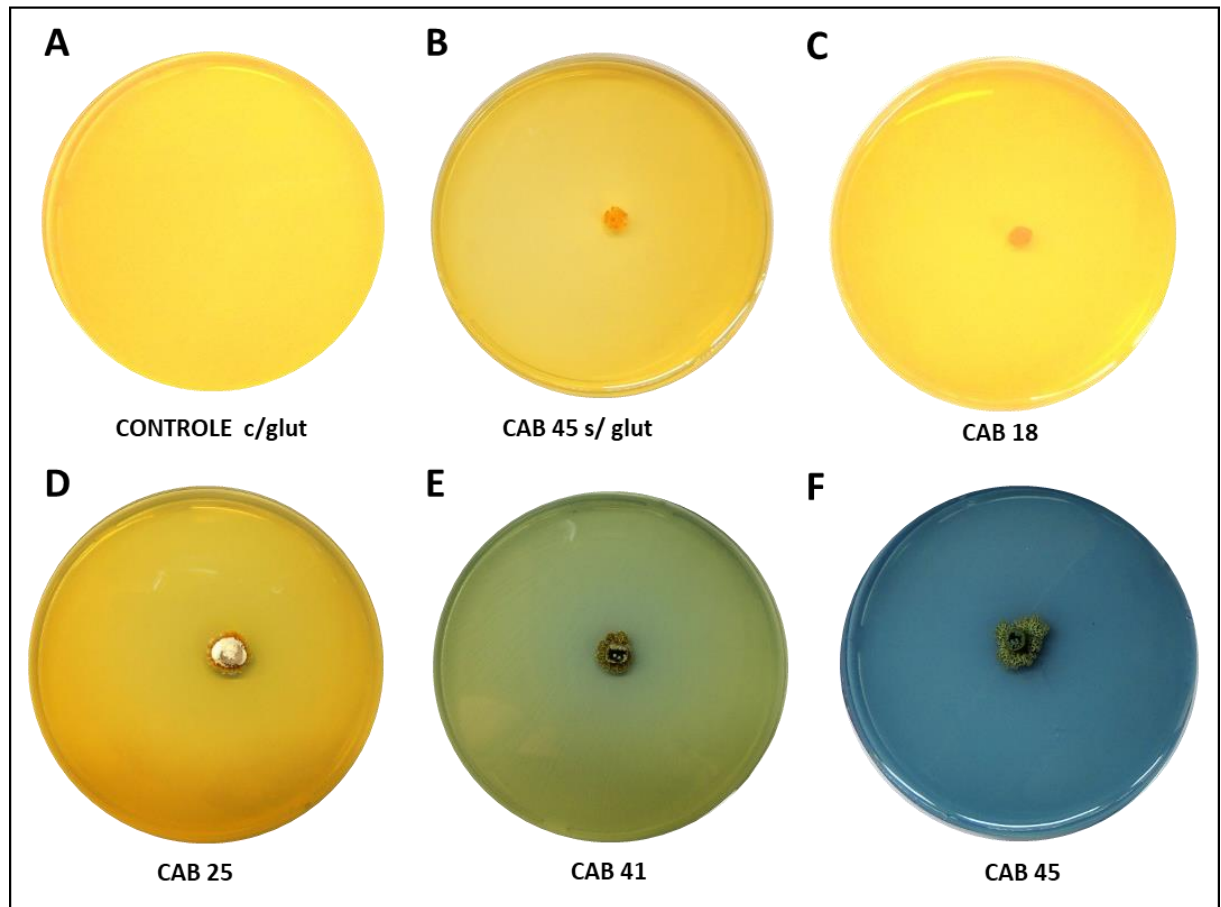


Figura 8. Perfil da produção de L-glutaminase por isolados de *Streptomyces* spp. A- controle meio com L-glut, sem inóculo; B- controle isolado CAB45 em meio sem L-glut, C- CAB18 halo -, D- CAB25 halo +, E- CAB41 halo ++, F- CAB45 halo +++.

Como resultado final em todos os testes enzimáticos, apenas 2 isolados foram capazes de produzir todas as 6 enzimas testadas (CAB 75 e CAB 77), 13 produziram 5 enzimas, sendo 13 também o número de isolados que produziram 4 enzimas, 8 produziram 3 enzimas, e 7 produziram apenas uma (Anexo 1). Não foi relatado nenhum isolado que não produziu nenhuma das enzimas testadas. Os resultados aqui descritos demonstram as inúmeras aplicações que estes isolados de *Streptomyces* podem exercer na indústria, agricultura e medicina, trazendo inovação em um campo ainda pouco explorado em território brasileiro.

Os isolados CAB25, CAB50 e CAB66 apresentaram características como promoção de crescimento vegetal e controle de fitopatógenos (como *Fusarium oxysporum* e *Colletotrichum lindemuthianum*), a partir dos resultados obtidos por Melo (2019). Além disso, apresentaram resultados satisfatórios na produção de diferentes enzimas. Assim, eles foram selecionados para o estabelecimento do perfil e curva de crescimento que serão descritos nos próximos itens.

4.2 Análise morfológica e cultural de *Streptomyces* spp. de acordo com o meio de cultivo

Diferentes condições de nutrição e cultivo podem variar a forma de crescimento, fenótipo e ainda afetar a capacidade das culturas de *Streptomyces* de formar antibióticos, enzimas e outros metabólitos (LI *et al.*, 2015). Portanto, a observação da mudança morfológica decorrente da constituição do meio junto com a capacidade metabólica do organismo é um importante fator de estabelecimento de parâmetros individuais para cada espécie analisada (ANADAN *et al.*, 2016).

Há muitos anos, vários estudos têm sido feitos sobre as condições que determinam a formação de pigmentos por microrganismos, sua possível aplicação prática, seu papel no metabolismo bacteriano e sua correlação com alguns aspectos morfológicos ou fisiológicos (MARROQUIN; ZAPATA, 1953). A taxonomia clássica atribui grande importância ao papel das características da cultura na identificação do microrganismo, sendo o tempo de crescimento e pigmentação importantes para classificação geral em Actinobacteria (MANTECA *et al.*, 2018).

O *International Streptomyces Project* proposto por SHIRLING & GOTTLIEB, 1966 e revisto por LI *et al.*, 2015, apresenta uma forma de classificação de isolados de acordo com a produção desses pigmentos. Os isolados podem ser divididos em dois grupos de acordo com sua capacidade de produzir pigmentos solúveis diferentes da melanina: a saber, produzidos (+) e não produzidos (-). As pigmentações registradas são vermelha, laranja, verde, amarela, azulada e violeta. Quando a cor da massa aérea está entre duas séries de cores, ambas as cores são registradas. Em alguns casos, as produções de pigmentos melanóides são fracas e, portanto, não são distinguíveis. Os isolados também são divididos em dois grupos, de acordo com sua capacidade de produzir pigmentos característicos no verso da colônia, a saber, distintos (+) e não distintos ou nenhum (-). Caso ocorra uma cor com baixo croma, como amarelo claro, oliva ou marrom amarelado, ela é incluída no último grupo (-).

Nos 3 isolados analisados (CAB25, CAB50 e CAB66) foi possível observar diferença no fenótipo relacionado ao meio de cultivo, onde a diferença de coloração entre o meio BDA e ISP-2 foi evidente, conforme pode ser observado na Figura 9. No isolado CAB25, desde o início do crescimento houve uma diferença marcante entre os dois meios, sendo que em BDA predominou um cor amarronzada na parte superior da placa após 240 horas de crescimento, e amarelo no fundo, já em ISP-2, o pigmento predominante foi o preto na frente, e laranja no fundo. Nas primeiras 120 horas de crescimento do isolado CAB50, houve uma diferença marcante entre os meios, sendo que o isolado permaneceu branco em BDA e com tons de

marrom em ISP-2, porém, com 240 horas de experimento, não houve diferença evidente entre os dois meios de cultivo, sendo eles marcados por tons de marrom na parte da frente da placa, e amarelo ao fundo. Nas primeiras 120 horas de crescimento do isolado CAB66, não houve uma diferença muito marcante entre os meios de cultivo, porém, após 240 horas, este isolado foi o que apresentou maior diferença na coloração, sendo que apresentou pigmentos no tom de vermelho em meio BDA, e em ISP-2 permaneceu na cor esbranquiçada. No fundo da placa não houve uma diferença muito marcante entre os dois meios, sendo ambos apresentados em tons amarelados.

De acordo com a classificação de SHIRLING & GOTTLIEB, 1966 discutida acima, o único isolado que pode ser classificado como (+) é o CAB66 em meio BDA, que produziu pigmento vermelho na parte superior da colônia. Mesmo havendo diferença visível entre os meios e os isolados, as variações de pigmentos foram em tons melanóides de preto e marrom, não estando dentro do padrão de cores considerados como pigmentos positivos. No fundo da placa, com exceção de CAB25 em meio ISP-2 que apresentou pigmento laranja, todos tiveram cor com baixo croma em tons amarelados, sendo então classificados como (-). Conforme descrito no item 4.3, além da diferença de composição entre os meios, em geral, o crescimento dos isolados em BDA tende a manter o pH ácido, enquanto que em ISP-2 a tendência é a permanência do pH neutro a básico, este pode ter sido um fator importante na diferenciação do fenótipo entre os dois meios de cultivo.

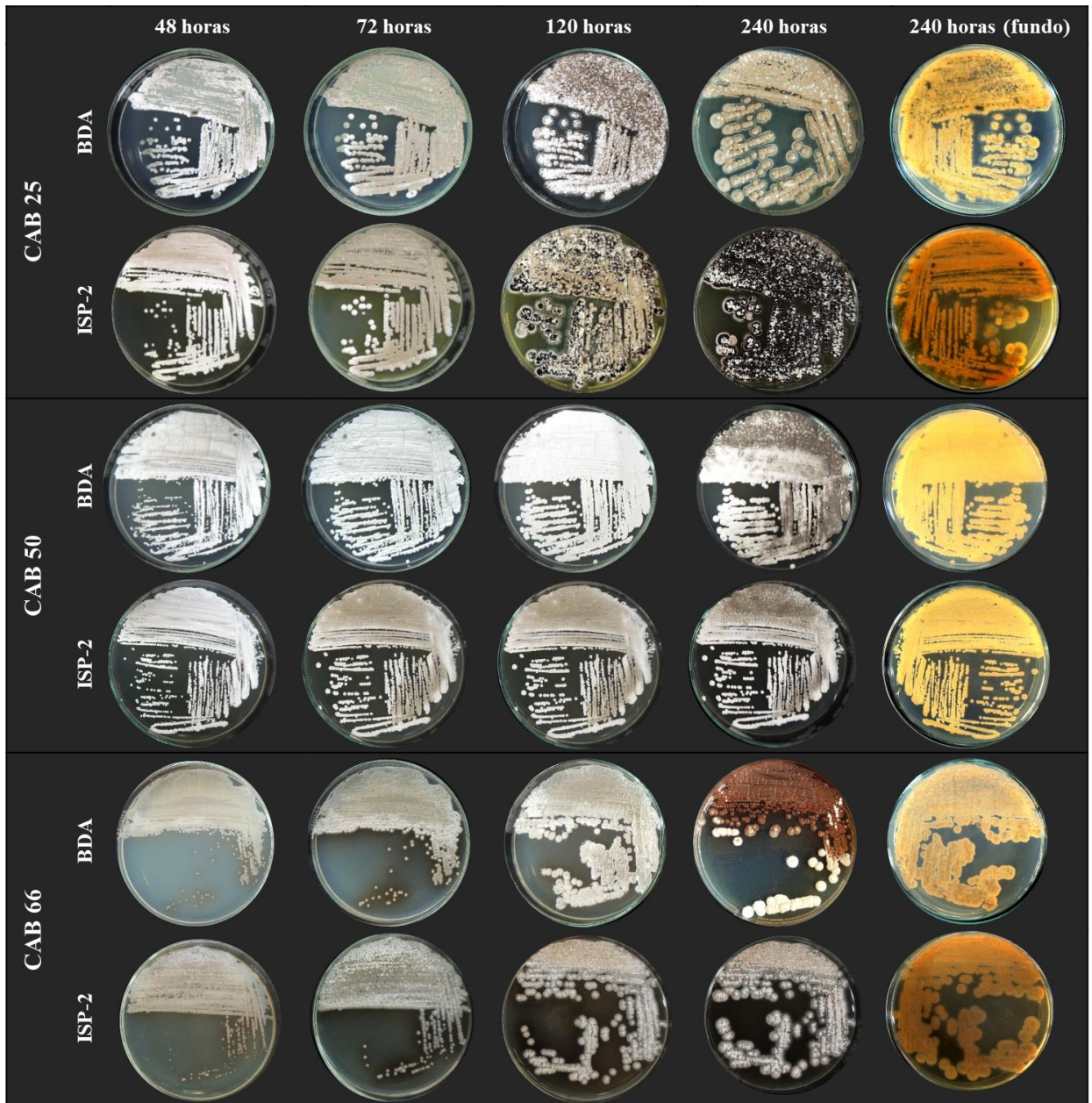


Figura 9. Crescimento dos isolados CAB 25, CAB 50 e CAB 66 nos meios de cultivo BDA e ISP-2 ao longo de 240 horas em que é possível observar a mudança de coloração das colônias em diferentes meios, na última coluna estão as fotos dos isolados com a vista da parte inferior das placas.

A formação do pigmento pode ser influenciada pelo pH do meio, aeração, temperatura, e variações nas fontes de carbono e nitrogênio (LI *et al.*, 2015). Sua formação também está ligada a mecanismos respiratórios, mecanismos de defesa e proteção ultravioleta (ORLANDELLI *et al.*, 2012). Com relação à sua aplicação, atualmente a indústria têxtil produz e usa aproximadamente 1,3 milhão de toneladas de corantes, pigmentos e precursores de corantes, avaliados em cerca de US \$ 23 bilhões, quase todos fabricados sinteticamente, muitos dos quais provenientes de fontes bacterianas (MARKET RESEARCH REPORT, 2020).

Pigmentos de fontes bacterianas também podem ser usados na produção de alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos (KREWSKI *et al.*, 2007). Em seu estudo, MARROQUIN e ZAPATA (1953) atribuíram diferentes condições de crescimento de forma que um pigmento azul proveniente de *Streptomyces coelicolor* pudesse ser extraído de maneira mais eficiente, além de ser caracterizado como antimicrobiano contra espécies de *Rhizobium*. AZIMI e colaboradores (2017) determinaram a propriedade antimicrobiana de um pigmento de *Streptomyces*, tendo efeito considerável na inibição de *S. aureus* e *Bacillus cereus*. Outra aplicação seria a farmacológica, como a demonstrada no estudo de PRASHANTHI e colaboradores (2015), em que um pigmento amarelo de *Streptomyces griseoaurantiacus* isolado do solo foi descrito como potencial citotóxico e antiproliferativos de células cancerosas.

A avaliação das características morfológicas é o primeiro passo para a identificação de um novo grupo taxonômico de microrganismos (PELCZAR *et al.*, 1981). Essas características podem estar associadas a diferenças fisiológicas desses microrganismos, os poderão ser investigadas posteriormente mediante estudos mais refinados.

4.3 Determinação da curva de crescimento por massa seca

A partir dos resultados obtidos no experimento de massa seca, foi possível estabelecer a curva de crescimento para os isolados CAB25, CAB50 e CAB66 em dois meios de cultivo diferentes: BD e ISP-2, sendo que todas as condições iniciais de cultivo foram mantidas as mesmas para cada experimento: temperatura 28 °C, pH 7,0 e agitação de 150 RPM. Foram feitas também curvas de variação de pH correlacionada aos pontos e estabelecido o consumo de glicose por meio de análises cromatográficas (HPLC). Os valores de massa seca e pH são uma média dos resultados obtidos em triplicata. Os resultados são apresentados nas Figuras 10, 11 e 12.

De uma maneira geral, não parece haver diferença significativa de cada isolado entre os meios de cultivo com relação a massa seca final, porém o crescimento dos isolados em meio BD se mostrou mais rápido do que em meio ISP-2, tendo os isolados alcançado o pico de massa seca resultante da fase exponencial em menos tempo do que quando cultivados em ISP-2. No entanto, o pH permaneceu com valores mais baixos quando crescidos em BD, e mantiveram valores mais alcalinos e/ou aproximados da neutralidade em ISP-2.

O meio BD é usado primariamente para o cultivo de fungos, podendo também ser usado para o cultivo de bactérias filamentosas. A base nutricionalmente rica (infusão de batata) e alta concentração de glicose (20 g/L) estimulam o crescimento exuberante de microrganismos

(ARYAL, 2019). Já ISP-2 é um meio rico que é rotineiramente usado para cultivar espécies de *Streptomyces* associadas a raízes de plantas. Contém extrato de malte, extrato de levedura e glicose (4 g/L) como fonte de carbono. Muitas *Streptomyces* spp. crescem bem em ISP-2, mas os fenótipos de desenvolvimento e/ou produção de antibióticos e outros produtos metabólicos podem diferir em comparação com o crescimento em outros meios (SHIRLING & GOTTLIEB, 1966).

O meio BD tem 5 vezes mais glicose que o meio ISP-2, por se encontrar em maior disponibilidade, a alta quantidade de açúcar pode estar acarretando um crescimento mais rápido no início do experimento, tornando nessas condições a fase exponencial de todos os isolados mais curta. O isolado CAB50 foi o que obteve maiores valores finais de massa seca, tanto para o meio BD (0,474 g) quanto para ISP-2 (0,368 g).

Com relação a variação de pH, foi observado que em meio BD, houve uma redução do pH do meio para todos os isolados investigados, atingindo valores abaixo de 5,0 e permanecendo assim até o final do experimento (exceto por CAB50 que obteve uma variação no final atingindo valor final de 6,29). Já em meio ISP-2, foi observada uma queda inicial de pH nas primeiras horas do experimento, porém, para todos os isolados houve uma reversão, tendo o pH se mantido em valores próximos a 8,0 até o final do experimento. Espécies de *Streptomyces* são descritas como preferindo pH ambiental neutro a alcalino, sendo a faixa de pH de crescimento ideal de 6,5–8,0 (LOCCI 1989), embora ocorram comumente em pH e condições nutricionais extremamente variáveis (KONTRO *et al.*, 2005). Entre os habitats comuns de *Streptomyces*, o solo tem um pH médio baixo de 3,5–6,8 (KUTZNER, 1986) sendo o pH do composto de bananeira em que essas bactérias foram coletadas estando dentro da faixa 7,8 e 8,8 (MELO, 2019). O crescimento desses isolados em meio ISP-2 se mostrou capaz de manter o pH em valores mais neutros, característica que possivelmente possa ser estendida em aplicações no solo, sendo então mais propício para ser usado em agriculturas diversas, podendo atuar também na recuperação de terrenos ácidos.

Conforme descrito anteriormente, essas bactérias são grandes produtoras de antibióticos, enzimas e outros metabólitos, produtos que poderiam causar alteração no pH no momento em que fossem excretados. Um exemplo é a enzima amilase, demonstrada como sendo produzida por esses 3 isolados (Anexo 1). Como o meio BD é rico em amido, a produção dessa enzima poderia ser um fator que justificaria a queda do pH, uma vez que já foi descrita desempenhando essa função anteriormente (CORDEIRO *et al.*, 2002).

Em seu trabalho, Kontro *et al* (2005), demonstraram que os nutrientes são susceptíveis a afetar a prevalência de *Streptomyces* spp. em diferentes valores de pH, determinando os

efeitos combinados do pH e dos nutrientes no crescimento e na esporulação desses organismos, concluindo que as faixas de pH para o crescimento ideal de *Streptomyces* spp. não são constantes nem propriedades específicas da espécie, mas fortemente dependentes das composições de nutrientes do meio. Geralmente, quanto mais definido o meio, menos variação ocorre durante seu crescimento. Considerando o fato de ISP-2 ser um meio muito mais complexo do que BD, essa pode ser uma justificativa de estar havendo menos alteração no pH no decorrer no experimento, uma vez que um meio mais rico pode simular melhor as condições ambientais encontradas por espécies de *Streptomyces* do solo, principalmente em ambiente rizosférico, onde a concentração de nutrientes é bem diversa.

Com relação a concentração de glicose, em meio BD (que iniciou o experimento com a concentração de 20 g/L na sua composição), foi observado que, com exceção do isolado CAB66 (que consumiu quase toda a glicose disponível, restando apenas 0,27 g/L), houve consumo da glicose no decorrer do crescimento pelos isolados, mas não em sua totalidade, restando nos pontos finais concentrações ainda altas desse açúcar (4,26 g/L para CAB25 e 10,43 g/L para CAB50). Isso ocorre porque mesmo estando em alta disponibilidade, há um ponto de saturação máximo da glicose, onde ela não é mais consumida e outros fatores tornam-se limitantes, inibindo então o crescimento do microrganismo. Já no meio ISP-2 (que iniciou o experimento com a concentração de 4 g/L), pôde-se observar que a glicose foi consumida por completo, restando nenhuma ou baixíssima quantidade nos pontos finais do experimento (0,07 g/L em CAB25, 0,08 g/L em CAB66).

A Figura 10 mostra a variação de pH e concentração de glicose durante o crescimento do isolado CAB25 em meio líquido BD (A) e ISP-2 (B). Em meio BD, as 8 primeiras horas do experimento parecem corresponder a fase lag de crescimento, onde os valores se mantêm em torno de 0,075 g. O aumento da quantidade de biomassa cessou em torno de 36 horas, quando sua média foi de 0,192 g, sendo esse período correspondente à fase exponencial. Durante essa fase, houve diminuição significativa do pH, estabilizando em valores abaixo de 5,0 durante todo o restante do experimento. A partir das 36 horas, a massa seca se manteve com valores próximos de 0,190 g até as 144 horas de experimento, período o qual pode ser correspondido a fase estacionária na curva de crescimento. A partir daí, a massa diminuiu, sendo o último ponto de coleta com 288 horas de crescimento e massa seca no valor de 0,168 g.

Já no meio ISP-2, foi observada que nas primeiras 24 horas de experimento, os valores de biomassa tiveram pouca alteração, se mantendo com valores aproximados entre 0,070 g e 0,080 g, período correspondente a fase de adaptação. A fase exponencial se deu até em torno de 96 horas, período em que houve rápido aumento da biomassa, cessando no valor de 0,244g,

a partir daí, os valores de biomassa foram diminuindo, fases da curva de crescimento correspondente a estacionária e de morte, terminando o experimento com valor de 0,165g as 288 horas. Com relação ao pH, houve queda contínua dos valores também durante a fase exponencial de crescimento, porém, após 96 horas, os valores de pH começaram a subir, atingindo pH mais alcalino em torno de 8,0 no final da curva de crescimento. Porém, conforme mostrado estatisticamente (item 4.5), não houve correlação entre variação de pH e massa seca que apresentasse relevância estatística.

No meio BD, a glicose foi consumida durante o experimento, sendo que no período de 36 horas (atribuído como a fase exponencial de acordo com a rápida variação de massa), cerca de metade da quantidade havia sido consumida, registrando valor de 11,48 g/L. A glicose continuou sendo consumida na fase estacionária, restando cerca de 4,26 g/L após a finalização do experimento. Já no meio ISP-2, a glicose foi basicamente toda consumida, sendo que até as 96 horas (fase exponencial) o valor registrado foi em torno de 0,12 g/L, restando apenas 0,07 g/L no último ponto medido. O uso de diferentes substratos para o crescimento bacteriano requer a secreção de enzimas extracelulares e a incorporação dos produtos de degradação solúveis (ROMERO-RODRÍGUEZ *et al.*, 2017). A variedade e multiplicidade das vias de degradação de carboidratos e proteínas abrigadas por *Streptomyces* refletem a diversidade e multiplicidade desse gênero. Portanto, o controle do metabolismo primário em *Streptomyces* depende da disponibilidade de nutrientes, afetando diretamente na forma como são processados e portanto atuando diretamente na variação de pH.

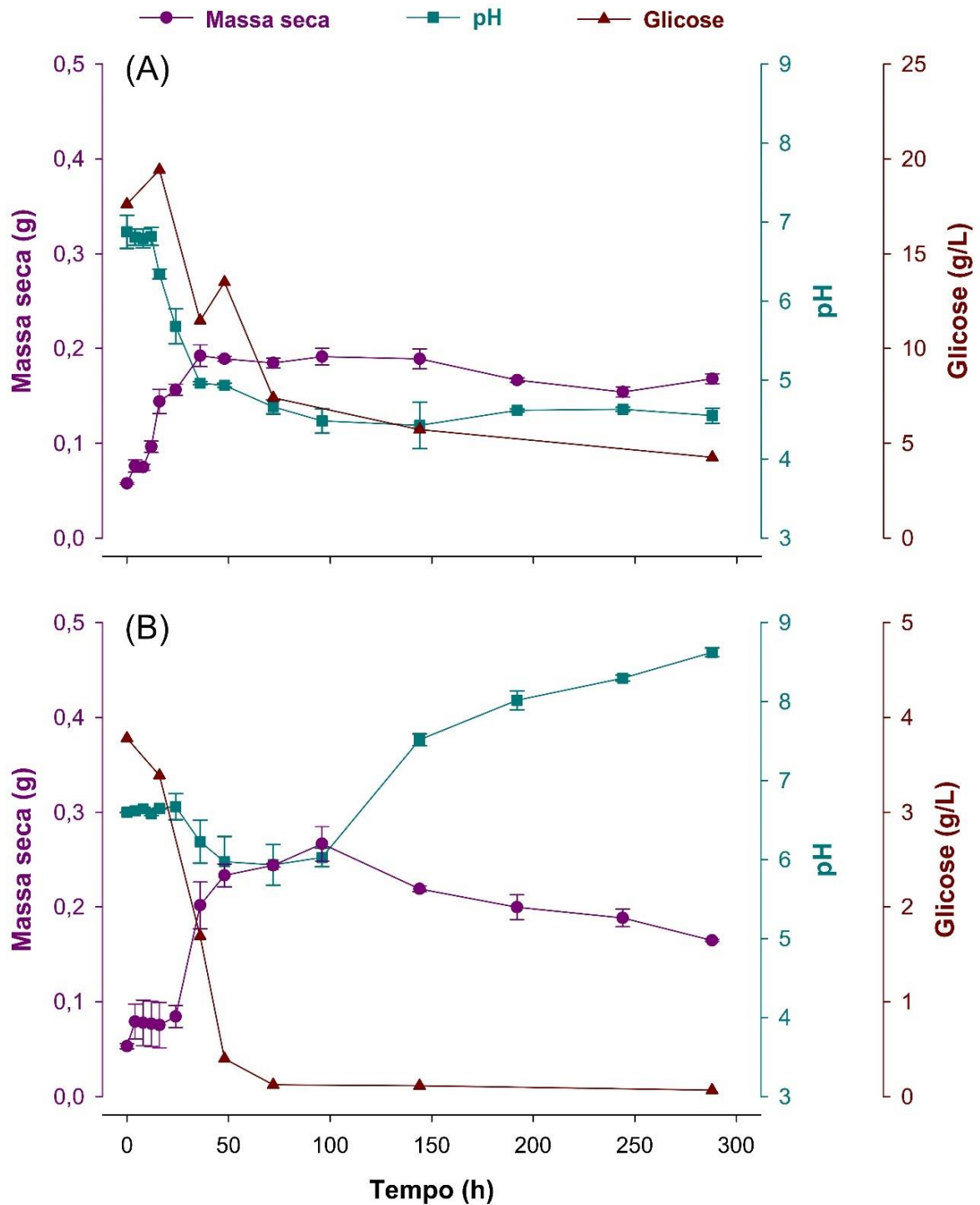


Figura 10. Curva de crescimento, alteração de pH e concentração de glicose do isolado CAB25 nos meios de cultivo BD (A) e ISP-2 (B) ao longo de 288 horas

Conforme demonstrado na Figura 11, em meio BD (A), o isolado CAB50 se manteve com valores sem muita alteração apenas nas primeiras 4 horas de experimento (fase de adaptação), atingindo maior valor de biomassa por volta de 36 horas após o início do

experimento (0,424 g), podendo-se determinar esse intervalo como o sendo a sua fase exponencial de crescimento. A partir das 48 horas, os valores variaram discretamente entre 0,390 g e 0,410 g, período correspondente a fase estacionária e de morte na curva de crescimento. O pH manteve-se estável com valores aproximados da neutralidade até esse ponto em que o pH passa de 6,93 (24 horas) para 4,02 (36 horas). Sabe-se que durante o crescimento, bactérias liberam ácidos e produtos do metabolismo que podem alterar o pH, esse rápido crescimento do isolado CAB50 pode ser uma das justificativas para essa queda brusca do pH (KONTRO *et al.*, 2005).

No meio ISP-2, a fase lag também se manteve até por volta das 4 horas, mas a exponencial durou um pouco mais do que o BD, tendo se estabilizado por volta das 48 horas. Neste ponto, a biomassa do isolado CAB50 também foi ligeiramente maior (0,449 g) que os valores registrados em BD (0,424 g), e os valores de pH tiveram menos alteração quando em comparação com BD, sendo os valores mantidos próximos a neutralidade, quando por fim começam a ficar mais alcalinos, conforme demonstrado na Figura 11 (B).

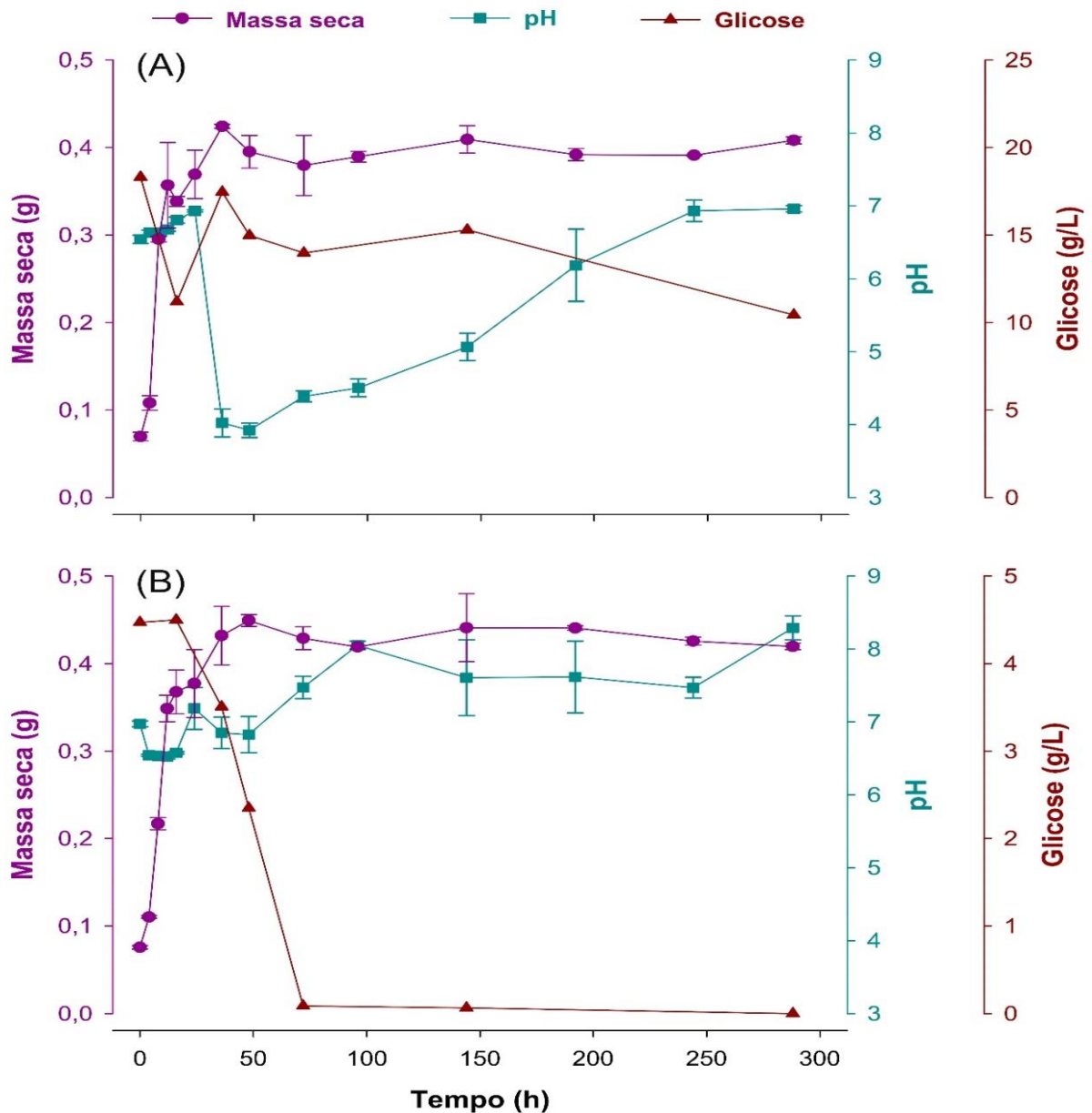


Figura 11. Curva de crescimento, alteração de pH e concentração de glicose do isolado CAB50 nos meios de cultivo BD (A) e ISP-2 (B) ao longo de 288 horas.

No meio BD, a concentração de glicose permaneceu com valores correspondentes a cerca da metade dos valores iniciais, tendo registro do valor de 10,43 g/L. Isso demonstra que o resultado de alto valor de biomassa só é parcialmente devido ao consumo de glicose, uma vez que não foi completamente metabolizada. Conforme demonstrado nos resultados descritos no item 4.1, CAB50 tem alta taxa de produção de amilase, e como o meio BD é rico em amido, o isolado pode ter usado essa fonte de carbono além da glicose, o que explicaria a alta taxa de crescimento, mesmo a glicose não sendo consumida em alta quantidade (10,43 g).

Um dos mecanismos de controle mais significativo dos processos fisiológicos no gênero *Streptomyces* é a repressão catabólica de carbono. Este mecanismo controla a expressão de genes envolvidos na captação e utilização de fontes alternativas de carbono em *Streptomyces*, além de afetar a diferenciação morfológica e a síntese de metabólitos secundários (ROMERO-RODRÍGUEZ *et al.*, 2017). Embora normalmente a glicose desencadeie esse fenômeno, outras fontes de carbono metabolizadas rapidamente também podem causar a repressão catabólica (RUIZ *et al.*, 2010), o que parece ter acontecido no meio BD, devido à alta concentração de amido. Já no meio ISP-2, com 72 horas de experimento, os valores de concentração de glicose já se mostravam bem baixos (0,09 g/L), tendo se exaurido completamente até o fim do experimento..

Conforme demonstrado nos resultados mostrados na Figura 12 (A), em meio BD, o isolado CAB66 apresentou fase de crescimento exponencial até por volta de 72 horas, onde atingiu o maior valor de biomassa (0,259g). Nas 12 primeiras horas de crescimento, os valores permaneceram sem muita alteração com valores entre 0,070g e 0,077g, condizente com a fase lag da curva de crescimento. A fase estacionária e de morte foi registrada a partir das 72 horas, sendo o valor final de biomassa 0,193 com 288 horas de crescimento. Com relação ao pH, nas primeiras 24 horas os valores variaram entre 6,11 e 6,37, tendo uma queda acentuada (4,91) por volta das 36 horas de experimento, e permaneceu com valores mais ácidos até o fim do experimento.

No meio ISP-2, a fase lag também se estendeu até por volta das 12 horas, onde os valores de biomassa se mantiveram constantes entre 0,064 g e 0,067 g. A fase exponencial se estendeu até por volta das 96 horas, atingindo valor máximo de 0,237 g. O pH mostrou-se bem estável nas primeiras 24 horas de experimento com valores próximos a 6,40, tendo um leve decréscimo até as 72 horas, quando foi registrado o menor valor (5,49), quando começou a subir novamente, permanecendo mais alcalino até o final do experimento (Figura 12 B).

Com relação ao consumo de glicose, às 72 horas (período correspondente a fase exponencial) no meio BD, a concentração de glicose foi 7,25 g/L, sendo o consumo final também bem alto, restando apenas 0,27 g/L ao fim do experimento. Apesar de quantidade de glicose no meio ISP-2 ser bem menor que em BD (0,4% em comparação com 2% em BD), o isolado CAB66 também teve alta taxa de consumo de glicose, tendo exaurido esse açúcar quase que por completo no fim do experimento, restando apenas 0,08 g/L.

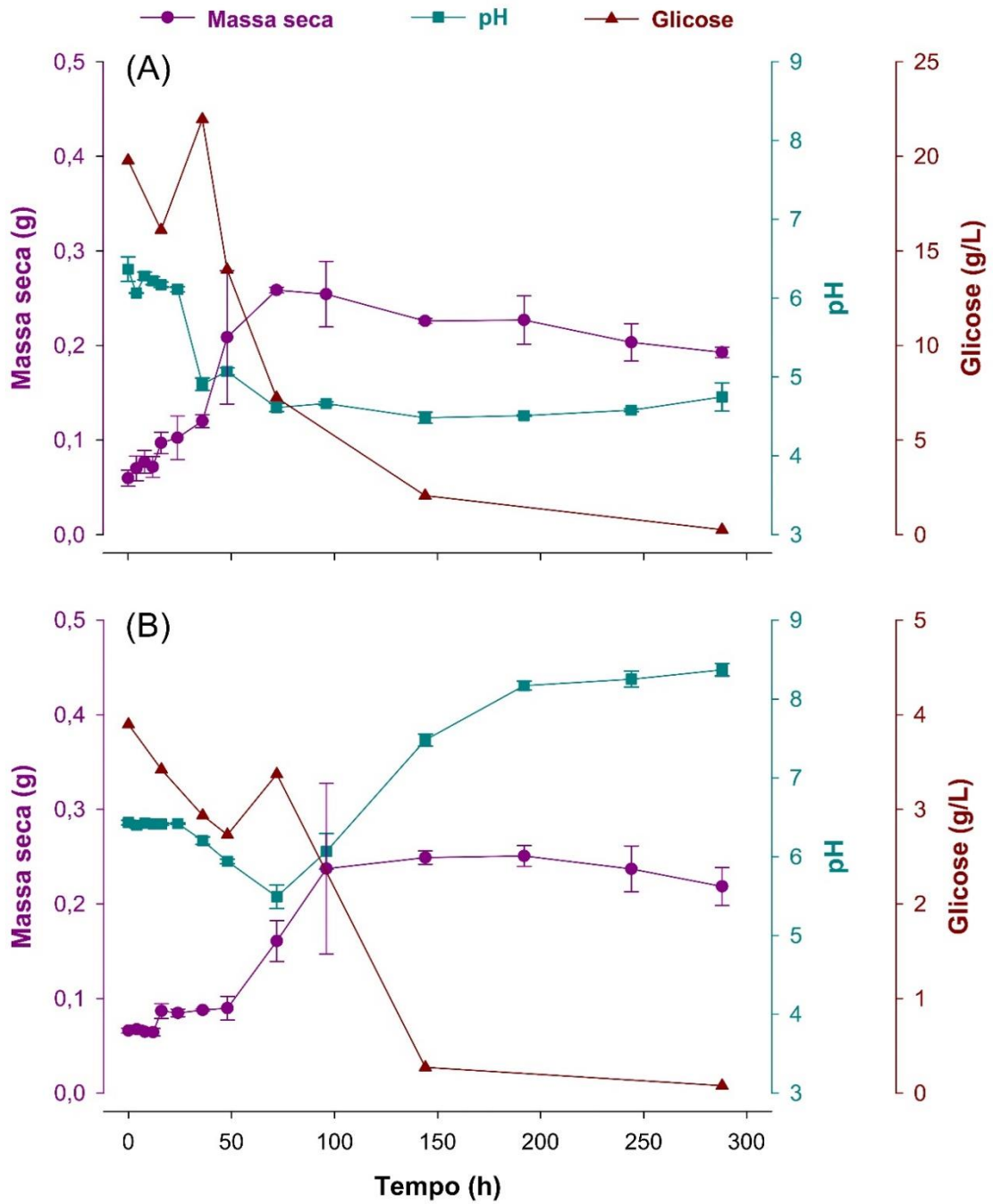


Figura 12. Curva de crescimento, alteração de pH e concentração de glicose do isolado CAB66 nos meios de cultivo BD (A) e ISP-2 (B) ao longo de 288 horas.

4.4 Análise por HPLC

De acordo com o gráfico obtido no experimento de massa seca, foram selecionados 7 pontos para verificar a concentração de glicose e ácidos orgânicos em HPLC para cada isolado (por hora: 0, 16, 36, 48, 72, 144 e 288). Nos resultados obtidos, não foi percebida a presença de nenhum ácido orgânico, demonstrando que não houve fermentação metabólica e os resultados referentes à concentração de glicose foram demonstrados nas Figuras 10, 11 e 12 e discutidos no item 4.3.

4.5 Análises estatísticas

A partir dos resultados do teste de correlação de Pearson realizado entre a massa seca e o pH e, entre a massa seca e o consumo de glicose, foi obtida a Tabela 1, na qual é possível determinar a significância estatística de correlação entre cada experimento.

Entre as correlações estimadas entre a massa seca e pH, apenas a do isolado CAB25 no meio ISP-2 não foi significativa. Também, uma relação negativa bastante forte (valor próximo de -0,9) foi encontrada entre o pH e a massa seca do isolado CAB25 e do isolado CAB66, ambos no meio BD. Ao contrário, uma correlação fraca (valores entre -0,5 e 0,5) foi encontrada entre a massa seca e o pH para o isolado CAB50 em ambos os meios de cultura.

As correlações obtidas entre a massa seca e a concentração de glicose, apenas aquelas estimadas para os isolados CAB 25 e CAB 66, ambos no meio ISP-2, foram estatisticamente significativas, sendo elas também, negativamente bastante fortes.

Tabela 1. Correlação de Pearson entre a massa seca e o pH ou consumo de glicose.

Variável	Isolado	Meio de Cultura	Correlação(r) ¹	t _{calc.} ²	Valor de p ³	gl ⁴
pH	25	BD	-0,897	-12,828	<0,001	40
	25	ISP-2	-0,011	-0,070	0,945	40
	50	BD	-0,369	-2,513	0,016	40
	50	ISP-2	0,474	3,400	0,002	40
	66	BD	-0,886	-12,106	<0,001	40
	66	ISP-2	0,630	5,134	<0,001	40
Glicose	25	BD	-0,597	-1,666	0,157	5
	25	ISP-2	-0,897	-4,527	0,006	5
	50	BD	-0,448	-1,121	0,313	5
	50	ISP-2	-0,576	-1,577	0,176	5
	66	BD	-0,746	-2,502	0,054	5
	66	ISP-2	-0,886	-4,270	0,008	5

¹ Correlações significativas estão em negrito. ² Valor da estatística do teste. ³ Valor de p para o teste t bilateral realizado com nível de significância de 5%. ⁴ graus de liberdade.

A tendência de incremento de biomassa ao longo do tempo é significativamente diferente entre os meios de cultura BD e ISP-2 para os isolados C25 (edf = 8,49; F = 14,68; $P < 0,001$; Anexo 2), C50 (edf = 2,66; F = 4,95; $P = 0,003$; Anexo 2B) e C66 (edf = 6,78, F = 6,60, $P < 0,001$; Anexo 2C). A quantidade de biomassa produzida no meio ISP-2 é significativamente maior daquela produzida no meio BD (estimativa: 0,0088; $t = 2,60$; $P = 0,0114$) para o isolado CAB25 (Anexo 2A). A quantidade de biomassa produzida no meio ISP-2 é significativamente maior daquela produzida no meio BD (estimativa: 0,0161; $t = 3,21$; $P = 0,0021$) para o isolado CAB50 (Anexo 2B). A quantidade de biomassa produzida no meio ISP-2 é significativamente menor daquela produzida no meio BD (estimativa: -0.0146; $t = -2,60$; $P = 0,0113$) para o isolado CAB66 (Anexo 2C).

5. CONCLUSÃO

O presente estudo evidencia que os isolados de *Streptomyces* provenientes de composto de bananeira se mostraram promissores na produção de diversas enzimas hidrolíticas. Houve uma grande variedade na distribuição e intensidade da produção das enzimas, sendo que todos os 43 isolados analisados foram capazes de produzir pelo menos uma das enzimas investigadas (amilase, celulase, protease, lipase, L-asparaginase e L-glutaminase) e os isolados CAB75 e CAB77 os únicos capazes de produzir todas estas em diferentes intensidades. A partir desses resultados, pôde-se elucidar a utilidade potencial de isolados de *Streptomyces* na produção enzimática, apontando a ampla diversidade desses microrganismos como um recurso essencial para o mercado industrial.

Os isolados CAB25, CAB50 e CAB66 apresentaram propriedades como inibição de patógenos e promoção de crescimento em trabalhos anteriores, sendo então selecionados para uma análise fisiológica. Esta análise foi feita nos meios de cultivo BD e ISP-2, e a partir desses resultados, foi possível concluir que a composição de cada meio influenciou no fenótipo (como produção de pigmentos) e ainda nos valores de pH, limitando ou potencializando o crescimento do microrganismo. O isolado CAB50 foi o que obteve maior crescimento de biomassa em ambos os meios, e ainda foi demonstrado que a tendência de incremento de biomassa ao longo do tempo é significativamente diferente entre os meios de cultura BD e ISP-2 para os 3 isolados testados. Na maioria dos testes houve uma relação direta entre variação de pH e aumento de massa seca, mas de maneira geral, os isolados crescidos em meio BD tiveram o pH reduzido ao longo do experimento, enquanto que a tendência do crescimento em ISP-2 foi de manter o pH mais próximo da neutralidade à alcalino. Com isso, pôde-se concluir que em ensaios *in vitro*, o crescimento em ISP-2 é favorável para o crescimento desses isolados, característica que pode ser investigada futuramente para aplicação *in vivo* desses isolados em solos diversos e em diferentes agriculturas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

NETO, Abrahão. Algumas aplicações de enzimas. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. (Coords.). **Biotecnologia industrial – processos fermentativos e enzimáticos**. São Paulo: Edgard Blücher Ltda. p. 405-412, 2001.

ANADAN, R.; DHANASEKARAN, D.; GOPINATH, P. M. An Introduction to Actinobacteria. **Actinobacteria - Basics and Biotechnological Applications**, [S.L.], p. 1-37, 11 fev. 2016. InTech. <http://dx.doi.org/10.5772/62329>.

ARYAL, SAGAR. Potato Dextrose Agar (PDA)- Principle, Uses, Composition, Procedure and Colony Characteristics. **MicrobiologyInfo**. August 15, 2019.

AZIMIL, Saba; SALEHIL, Majid Basei; BAHADOR, Nima. Isolation and Identification of *Streptomyces ramulosus* from Soil and Determination of Antimicrobial Property of its Pigment. **Modern Medical Laboratory Journal**, Iran, v. 1, n. 1, p. 36-41, jun. 2017.

BAREA, J.M.; POZO, M.J.; AZCÓN, R. & AZCÓN-AGUILAR, C. Microbial co-operation in the rhizosphere. **J. Exp. Bot.**, v. 56, p. 1761-1778, 2005

BARKA, Essaid Ait; VATSA, Parul; SANCHEZ, Lisa; GAVEAU-VAILLANT, Nathalie; JACQUARD, Cedric; KLENK, Hans-Peter; CLÉMENT, Christophe; OUHDOUCH, Yder; VAN WEZEL, Gilles P.. Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, [S.L.], v. 80, n. 1, p. 1-43, 25 nov. 2015. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/membr.00019-15>.

BASTOS, Aline. Enzimas: a chave da biotecnologia. **EMBRAPA**. [S.L.], v.21, n.11, dez. 2015.

BEHROUZPOUR, Elmira; AMINI, Kumarss. Molecular isolation, cloning and expressions of L- glutaminase encoded gene from the aquatic *Streptomyces* collected from Persian Gulf. **International Journal of Molecular and Clinical Microbiology**., v.9, p.1181-1187, 2019.

BOYER, Paul D., KREBS, Edwin G.. The enzymes. Volume 3. **Journal of Chemical Education**, [S.L.], v. 39, n. 3, p. 21-35, mar. 1962. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/ed039pa240>.

CAMARGO, Ademir João (ed.). Aplicações Industriais da Biotecnologia Enzimática. **Revista Processos Químicos/SENAI**. Goiânia v.3, n.5 p.1-140, 2009.

CELAYA-HERRERA, Samuel; CASADOS-VÁZQUEZ, Luz E.; VALDEZ-VAZQUEZ, Idania; BARONA-GÓMEZ, Francisco; BIDESHI, Dennis K.; BARBOZA-CORONA, José E. A Cellulolytic *Streptomyces* Sp. Isolated from a Highly Oligotrophic Niche Shows Potential for Hydrolyzing Agricultural Wastes. **Bioenergy Research**, [S.L.], p. 155-178, 31 jul. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s12155-020-10174-z>.

CHAKRABARTI, S.; MATAI, S; CHANDRA, A. L. Exocellular lipase production by a soil streptomycete. **Curr Sci**. [S.L.], v. 48, p. 268-269, 1978.

CHAKRABORTY, Samrat; KHOPADE, Abhijit; KOKARE, Chandrakant; MAHADIK, Kakasaheb; CHOPADE, Balasaheb. Isolation and characterization of novel α -amylase from marine *Streptomyces* sp. D1. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, [S.L.], v. 58, n. 1-4, p. 17-23, jun. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcatb.2008.10.011>.

CHANDRA, M.; KALRA, A.; SHARMA, P.K.; KUMAR, H.; SANGWAN, R.S. Cellulase production by six *Trichoderma* spp fermented on medicinal plant process. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** v.36, p. 605-609, 2009.

CHEN, Qianqian; WANG, Jieping; ZHANG, Haifeng; SHI, Huai; LIU, Guohong; CHE, Jianmei; LIU, Bo. Microbial community and function in nitrogen transformation of ectopic fermentation bed system for pig manure composting. **Bioresource Technology**, [S.L.], v. 319, p. 124-155, jan. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124155>.

CHEVRETTE, Marc G.; CARLSON, Caitlin M.; ORTEGA, Humberto E.; THOMAS, Chris; ANANIEV, Gene E.; BARNS, Kenneth J.; BOOK, Adam J.; CAGNAZZO, Julian; CARLOS, Camila; FLANIGAN, Will. The antimicrobial potential of *Streptomyces* from insect microbiomes. **Nature Communications**, [S.L.], v. 10, n. 1, p. 1-11, 31 jan. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-019-08438-0>.

CIESAROVÁ, Z.; KISS, E.; BOEGL, P. Impact of L-asparaginase on acrylamide content in potato product.. 45. 141-146. **Journal of Food And Nutrition Research**, Petra, v. 45, n. 1, p. 141-146, jan. 2006.

COLLA, Luciane Maria; RIZZARDI, Juliana; PINTO, Marta Heidtmann; REINEHR, Christian Oliveira; BERTOLIN, Telma Elita; COSTA, Jorge Alberto Vieira. Simultaneous production of lipases and biosurfactants by submerged and solid-state bioprocesses. **Bioresource Technology**, [S.L.], v. 101, n. 21, p. 8308-8314, nov. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.05.086>.

COON, H.J.; JENNISON, M.W.; WEEK, O.B. Routine tests for the identification of bacteria. In: SOCIETY OF AMERICAN BACTERIOLOGISTS (Ed.) **Manual of microbiological methods**. New York: McGraw-Hill, 1957. p.239-262.

CORDEIRO, Carlos Alberto Martins; MARTINS, Meire Lelis Leal; LUCIANO, Angélica Bárbara. Production and properties of alpha-amylase from thermophilic *Bacillus* sp. **Brazilian Journal of Microbiology**, [S.L.], v. 33, n. 1, p. 57-61, jan. 2002. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1517-83822002000100012>.

CORDEIRO, M. A. S., CORÁ, J. E., NAHAS, E. Atributos bioquímicos e químicos do solo rizosférico e não rizosférico de culturas em rotação no sistema de semeadura direta. **R. Bras. Ci. Solo**, v.36, p.1794-1803, 2012.

DORIYA, Kruthi; KUMAR, Devarai Santhosh. Isolation and screening of l-asparaginase free of glutaminase and urease from fungal sp. **3 Biotech**, [S.L.], v. 6, n. 2, p. 239-252, 12 nov. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s13205-016-0544-1>.

FERNANDES, H. S.; TEIXEIRA, C. S. Silva; FERNANDES, P. A.; RAMOS, M. J.; CERQUEIRA, N. M. F. S. A.. Amino acid deprivation using enzymes as a targeted therapy for cancer and viral infections. **Expert Opinion On Therapeutic Patents**, [S.L.], v. 27, n. 3, p. 283-297, 15 nov. 2016. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/13543776.2017.1254194>.

FLOWERS, T. H.; WILLIAMS, S. T.. Measurement of Growth Rates of Streptomycetes: Comparison of Turbidimetric and Gravimetric Techniques. **Journal of General Microbiology**, Great Britain, n. 98, p. 285-289, ago. 1977.

GOPALAKRISHNAN, Subramaniam; SRINIVAS, Vadlamudi; VIDYA, Meesala Sree; RATHORE, Abhishek. Plant growth-promoting activities of *Streptomyces* spp. in sorghum and rice. **Springerplus**, [S.L.], v. 2, n. 1, p. 574-581, 29 out. 2013. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/2193-1801-2-574>.

GRAND VIEW RESEARCH, MARKET RESEARCH REPORT (2020) Enzymes market size, share & trends analysis report by application (industrial enzymes, specialty enzymes), by product (carbohydrase, proteases, lipases), by source, by region, and segment forecast 2020–2027. **Grand View Research**. Available via <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/enzymes-industry>. *Acesso em*: set. 2020.

GULATI, R.; SAXENA, R. K.; GUPTA, R.. A rapid plate assay for screening l -asparaginase producing micro-organisms. **Letters In Applied Microbiology**, [S.L.], v. 24, n. 1, p. 23-26, jan. 1997. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1472-765x.1997.00331.x>.

GUPTA, Rani; GIGRAS, Paresh; MOHAPATRA, Harapriya; GOSWAMI, Vineet Kumar; CHAUHAN, Bhavna. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. **Process Biochemistry**, [S.L.], v. 38, n. 11, p. 1599-1616, jun. 2003. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0032-9592\(03\)00053-0](http://dx.doi.org/10.1016/s0032-9592(03)00053-0).

HASHIZUME, R.; YAMAGUCHI, S.; MIKAMI, B.. Crystal structure of pro- protein-glutaminase. **The Journal Of Biological Chemistry**, [S.L.], p. 38691-38702, 11 ago. 2010. Worldwide Protein Data Bank. <http://dx.doi.org/10.2210/pdb3a56/pdb>.

HARIR, Mohammed; BENDIF, Hamdi; BELLAHCENE, Miloud; POGNI, Zohra Fortas And Rebecca. Streptomyces Secondary Metabolites. **Basic Biology And Applications Of Actinobacteria**, [S.L.], 5 dez. 2018. IntechOpen. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.79890>.

HENDRIKSEN, Hanne V.; KORNBRUST, Beate A.; ØSTERGAARD, Peter R.; STRINGER, Mary A.. Evaluating the Potential for Enzymatic Acrylamide Mitigation in a Range of Food Products Using an Asparaginase from *Aspergillus oryzae*. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [S.L.], v. 57, n. 10, p. 4168-4176, 27 maio 2009. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jf900174q>

HOBBS, Glyn; FRAZER, Catherinem.; GARDNER, Davidc.J.; CULLUM, Johna.; OLIVER, Stepheng.. Dispersed growth of *Streptomyces* in liquid culture. **Applied Microbiology And Biotechnology**, [S.L.], v. 31, n. 3, p. 272-277, set. 1989. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/bf00258408>.

HOPWOOD D.A. *Streptomyces* in Nature and Medicine. **Oxford University Press**; 2007.

JAEGER, K. E.; EGGERT, T. Lipases for Biotechnology. **Current Opinion Biotechnology**, Germany, v.13, n.4, p.390–397, 2002.

JAYANI, Ranveer Singh; SAXENA, Shivalika; GUPTA, Reena. Microbial pectinolytic enzymes: a review. **Process Biochemistry**, [S.L.], v. 40, n. 9, p. 2931-2944, set. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2005.03.026>.

JANG, Hung-Der; CHEN, K. S.. Production and characterization of thermostable cellulases from *Streptomyces* transformant T3-1. **World Journal Of Microbiology And Biotechnology**,

[S.L.], v. 19, n. 3, p. 263-268, 2003. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1023/a:1023641806194>.

JOG, R.; NARESHKUMAR, G.; RAJKUMAR, S.. Enhancing Soil Health and Plant Growth Promotion by Actinomycetes. **Plant Growth Promoting Actinobacteria**, [S.L.], p. 33-45, 2016. Springer Singapore. http://dx.doi.org/10.1007/978-981-10-0707-1_3.

JONES, Stephanie e; A ELLIOT, Marie. 'Exploring' the regulation of Streptomyces growth and development. **Current Opinion In Microbiology**, [S.L.], v. 42, p. 25-30, abr. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2017.09.009>.

KIDD, John G.. REGRESSION OF TRANSPLANTED LYMPHOMAS INDUCED IN VIVO BY MEANS OF NORMAL GUINEA PIG SERUM. **Journal Of Experimental Medicine**, [S.L.], v. 98, n. 6, p. 565-582, 1 dez. 1953. Rockefeller University Press. <http://dx.doi.org/10.1084/jem.98.6.565>

KIM, K; ROH, J. K.; WEE, H.; KIM, C. Cancer Drug Discovery: Science and History. **Springer**. p. 147. ISBN 9789402408447, 2016.

KING, John V.; LIANG, Wenguang G.; SCHERPELZ, Kathryn P.; SCHILLING, Alexander B.; MEREDITH, Stephen C.; TANG, Wei-Jen. Molecular Basis of Substrate Recognition and Degradation by Human Presequence Protease. **Structure**, [S.L.], v. 22, n. 7, p. 996-1007, jul. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.str.2014.05.003>.

KLUEPFEL, D.A. The behavior and tracking of bacteria in the rhizosphere. **Ann. Rev. Phytopathol**, [S.L.], v. 31, p. 441-472, 1993.

KREWSKI, Daniel; A YOKEL, Robert; NIEBOER, Evert; BORCHELT, David; COHEN, Joshua; HARRY, Jean; KACEW, Sam; LINDSAY, Joan; MAHFOUZ, Amal M; RONDEAU, Virginie. Human Health Risk Assessment for Aluminium, Aluminium Oxide, and Aluminium Hydroxide. **Journal Of Toxicology And Environmental Health, Part B**, [S.L.], v. 10, n. 1, p. 1-269, 16 nov. 2007. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/10937400701597766>.

KONTRO, M.; LIGNELL, U.; HIRVONEN, M.-R.; NEVALAINEN, A.. PH effects on 10 Streptomyces spp. growth and sporulation depend on nutrients. **Letters In Applied Microbiology**, [S.L.], v. 41, n. 1, p. 32-38, jul. 2005. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1472-765x.2005.01727.x>.

KORNBRUST, Beate A.; STRINGER, Mary Ann; LANGE, Niels Erik Krebs; HENDRIKSEN, Hanne Vang. Asparaginase– An Enzyme for Acrylamide Reduction in Food Products. **Enzymes In Food Technology**, [S.L.], p. 59-87, jan. 2009. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/9781444309935.ch4>.

KUMAR, DEVARAI; SOBHA, KOTA. L-Asparaginase from Microbes: a Comprehensive Review. **Advances in Bioresearch**. Soe, India, v. 3, p.137-157, 2012.

KUTZNER, H.J. The family Streptomycetaceae. **The Prokaryotes, A Handbook on Habitats, Isolation, and Identification of Bacteria**, New York: Springer-Verlag. v.2 p. 2028–2090, 1986.

LAKSHMI, Selvaraj Alagu; SHAFREEN, Rajamohamed Beema; PRIYANGA, Appasamy; SHIBURAJ, Sugathan; PANDIAN, Shunmugiah Karutha. A highly divergent α -amylase from *Streptomyces* spp.: an evolutionary perspective. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [S.L.], v. 163, p. 2415-2428, nov. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.09.103>.

LAMBERTZ, Camilla; GARVEY, Megan; KLINGER, Johannes; HEESEL, Dirk; KLOSE, Holger; FISCHER, Rainer; COMMANDEUR, Ulrich. Challenges and advances in the heterologous expression of cellulolytic enzymes: a review. **Biotechnology For Biofuels**, [S.L.], v. 7, n. 1, p. 135-150, 18 out. 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s13068-014-0135-5>.

LAZARUS, Philip; PANASCI, Lawrence C. Characterization of l-threonine and l-glutamine transport in murine P388 leukemia cells in vitro. Presence of an N-like amino acid transport system. **Biochimica Et Biophysica Acta (Bba) - Biomembranes**, [S.L.], v. 856, n. 3, p. 488-495, abr. 1986. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0005-2736\(86\)90140-9](http://dx.doi.org/10.1016/0005-2736(86)90140-9).

LEE, Y. H.; FAN, L. T. Properties and mode of action of cellulases. **Products from Alkanes, Cellulose and Other Feedstocks** (A. Fiechter, ed.); p. 101-129. Akademie Verlag, Berlin. 1981.

LEWIS, K.J. Biological control mechanism of the mycoparasite *Phytium oligandum* Dreschler. **Sheffield: University of Sheffield**, [S.L.], p.125. PhD Thesis, 1988.

LIN, En-Shyh; WANG, Chee-Chan; SUNG, Shu-Chiao. Cultivating conditions influence lipase production by the edible Basidiomycete *Antrodia cinnamomea* in submerged culture. **Enzyme**

And Microbial Technology, [S.L.], v. 39, n. 1, p. 98-102, jun. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.10.002>.

LOCCI, R. Streptomycetes and related genera. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, Baltimore, MD, v. 4, ed. Williams, S.T., Sharpe, M.E. and Holt, L.G. p. 2451–2505. Williams & Wilkins, 1989.

MAHAJAN, Richi V.; SARAN, Saurabh; KAMESWARAN, Karthikeya; KUMAR, Vinod; SAXENA, R.K.. Efficient production of l-asparaginase from *Bacillus licheniformis* with low-glutaminase activity: optimization, scale up and acrylamide degradation studies. **Bioresource Technology**, [S.L.], v. 125, p. 11-16, dez. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.08.086>.

MAHAJAN, Richi V.; SARAN, Saurabh; SAXENA, Rajendra K.; SRIVASTAVA, Ayush K. A rapid, efficient and sensitive plate assay for detection and screening of l-asparaginase-producing microorganisms. **Fems Microbiology Letters**, [S.L.], v. 341, n. 2, p. 122-126, 11 mar. 2013. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1111/1574-6968.12100>.

MANIGUNDAN, K., JOSEPH, J., AYSWARYA, S., VIGNESH, A., VIJAYALAKSHMI, G., SOYTONG, K., GOPIKRISHNAN, V. AND RADHAKRISHNAN, M. - Identification of biostimulant and microbicide compounds produced by *Streptomyces* sp. UC1A-3 for plant growth promotion and disease control. **International Journal of Agricultural Technology**, v.16, p.1125-1144, 2020.

MARCHESSAULT, R. H.; SUNDARARAJAN, P. R. Cellulose. **The Polysaccharides**, Volume (G.O. Aspinall, ed.); p. 11-95. Academic Press, London and New York, 1983.

MARCY, J.A.; PRUETT, W.P. Proteolytic microorganisms. In: DOWNS, F.P.; ITO K. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4.ed. Washington DC: American Public Health Association, p.175-181, 2001.

MARGESIN, Rosa; ZIMMERBAUER, Astrid; SCHINNER, Franz. Biotechnology Techniques. **Biotechnology Techniques**, [S.L.], v. 13, n. 12, p. 859-863, 1999. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1023/a:1008928308695>.

MASHBURN, Louise T.; WRISTON, John C.. Tumor inhibitory effect of l-asparaginase from *Escherichia coli*. **Archives Of Biochemistry And Biophysics**, [S.L.], v. 105, n. 2, p. 450-453, maio 1964. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0003-9861\(64\)90032-3](http://dx.doi.org/10.1016/0003-9861(64)90032-3).

MEENA, Balakrishnan *et al.* L-Asparaginase from *Streptomyces griseus* NIOT-VKMA29: optimization of process variables using factorial designs and molecular characterization of l-asparaginase gene. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 5, n. 1, p. 1-12, 24 jul. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/srep12404>.

MELO, R, C. Diversidade de actinobactérias em solos sob cultivo de bananeira e potencial de biocontrole. Viçosa, 2019. No prelo.

MINOTTO, E.; PASQUALINI, M.; MARTHA, OLIVEIRA M.; VAN DER SAND T. Enzyme characterization of endophytic actinobacteria isolated from tomato plants. **Journal of Advanced Scientific Research**, Porto Alegre, v. 5, n,2, p. 16–23, 2014.

MONOD, J. The Growth of Bacterial Cultures. **Annual Review Of Microbiology**, [S.L.], v. 3, n. 1, p. 371-394, out. 1949. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.mi.03.100149.002103>.

MOZERSKY, S., MARMER, W., DALE, A.O. Vigorous proteolysis: Relining in the presence of an alkaline protease and bating (Post-Liming) with an extremophile protease.; **JALCA**, [S.L.], 97:150-155, 2002.

NAKATANI, A. S.; SIQUEIRA, J. O.; SOARES, C. R. F. S.; LAMBAIS, M. R. Comunidades microbianas, atividade enzimática e fungos micorrízicos em solo rizosférico de “landfarming” de resíduos petroquímicos, **R. Bras. Ci. Solo**, [S.L.], v. 32, p. 1501-1512, 2008

NARAYANA, K. J. P.; KUMAR, K. G.; VIJAYALAKSHMI, M.. L-asparaginase production by *Streptomyces albidoflavus*. **Indian Journal Of Microbiology**, [S.L.], v. 48, n. 3, p. 331-336, 12 jun. 2008. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s12088-008-0018-1>.

OGAWA, Jun; SHIMIZU, Sakayu. Industrial microbial enzymes: their discovery by screening and use in large-scale production of useful chemicals in japan. **Current Opinion In Biotechnology**, [S.L.], v. 13, n. 4, p. 367-375, ago. 2002. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0958-1669\(02\)00331-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0958-1669(02)00331-2).

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.

PALLEM, Chanakya; MANIPATI, Srikanth; SOMALANKA, Subba Rao. PROCESS OPTIMIZATION OF L-GLUTAMINASE PRODUCTION BY *Trichoderma koningii* UNDER

SOLID STATE FERMENTATION. **International Journal Of Applied Biology And Pharmaceutical Technology**, India, v. 1, n. 3, p. 1168-1174, dez. 2010.

PELCZAR, M. J.; REID, R.; CHAN, E. C. S. *Microbiologia*, v1., **McGraw-Hill**, São Paulo, 576p. 1981

POLITZER, Kurt. *Enzimas Industriais e Especiais*. Centro de Gestão e Estudos Estratégicos, Rio de Janeiro, Maio, 2010. Disponível em: https://www.redetec.org.br/wp-content/uploads/2015/02/tr03_enzimas.pdf. Acesso em: 26 set.2020.

PROCÓPIO, Rudi Emerson de Lima; SILVA, Ingrid Reis da; MARTINS, Mayra Kassawara; AZEVEDO, João Lúcio de; ARAËJO, Janete Magali de. Antibiotics produced by *Streptomyces*. **The Brazilian Journal Of Infectious Diseases**, [S.L.], v. 16, n. 5, p. 466-471, set. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjid.2012.08.014>.

PEREIRA, M. R; MAESTER, T. C; ALVES, L. M. C; LEMOS, E. G. M. Utilização de enzimas lipolíticas na produção de biodiesel. **Bioenergia: desenvolvimento, pesquisa e inovação**. p.319-339. São Paulo, 2012,

PIRT, S. J. A kinetic study of the mode of growth of surface colonies of bacteria and fungi. **J Gen Microbiol** v.47, p.181-197, 1967.

R CORE TEAM R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>. 2020.

RADZICKA, Anna; WOLFENDEN, Richard. Rates of Uncatalyzed Peptide Bond Hydrolysis in Neutral Solution and the Transition State Affinities of Proteases. **Journal Of The American Chemical Society**, [S.L.], v. 118, n. 26, p. 6105-6109, jan. 1996. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/ja954077c>.

ROBERT, J.; ALLISTER, J. W.; SETHURAMAN, N.; *et al.* Genetically engineered glutaminase and its use in antiviral and anticancer therapy. **U.S. Patent**, No. 6312939. 2001.

ROBERTS, J.; MCGREGOR, W. G.. Inhibition of mouse retroviral disease by bioactive glutaminase-asparaginase. **Journal Of General Virology**, [S.L.], v. 72, n. 2, p. 299-305, 1 fev. 1991. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/0022-1317-72-2-299>.

ROMANO-ARMADA, Neli; YAÑEZ-YAZLLE, María Florencia; IRAZUSTA, Verónica P.; RAJAL, Verónica B.; MORAGA, Norma B.. Potential of Bioremediation and PGP Traits in *Streptomyces* as Strategies for Bio-Reclamation of Salt-Affected Soils for

Agriculture. **Pathogens**, [S.L.], v. 9, n. 2, p. 117-147, 13 fev. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/pathogens9020117>.

ROMERO-RODRÍGUEZ, A., ROCHA, D., RUIZ-VILLAFÁN, B., GUZMÁN-TRAMPE, S., MALDONADO-CARMONA, N., VÁZQUEZ-HERNÁNDEZ, M., ... SÁNCHEZ, S. Carbon catabolite regulation in *Streptomyces*: new insights and lessons learned. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, [S.L.], v. 33, n. 9, p. 1-11, 30 jul. 2017. doi:10.1007/s11274-017-2328-0

RUIZ B, CHÁVEZ A, FORERO A, GARCÍA-HUANTE Y, ROMERO A, SÁNCHEZ M, ROCHA D, SÁNCHEZ B, RODRÍGUEZ-SANOJA R, SÁNCHEZ S, LANGLEY E. Production of microbial secondary metabolites: regulation by the carbon source. **Crit Rev Microbiol**, [S.L.], v. 36, n. 2, p. 146–167, 2010.

SADEGHIAN, Mahdiah; BONJAR, Gholam Hosein Shahidi; SIRCHI, Gholam Reza Sharifi. Post harvest biological control of apple bitter rot by soil-borne Actinomycetes and molecular identification of the active antagonist. **Postharvest Biology And Technology**, [S.L.], v. 112, p. 46-54, fev. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.postharvbio.2015.09.035>.

SAHU, M. K.; SIVAKUMAR, K.; POORANI, E.; THANGARADJOU, T.; KANNAN, L. Studies on L-asparaginase enzyme of actinomycetes isolated from estuarine fishes. **J Environ Biol**. v. 2, p. 465-474. PMID: 17929767, aug, 2007

SANCHEZ-MARROQUIN, J.; A, ZAPATA. Observations on the Pigment of *Streptomyces coelicolor*. **National Polytechnic Institute**, Mexico City, p.102- 106, nov, 1953.

SATHYA, R.; USHADEVI, T.. Industrially important enzymes producing streptomyces species from mangrove sediments. **International Journal Of Pharmacy And Pharmaceutical Sciences**, India, v. 10, n. 6, p. 232-237, set. 2014.

SHEIKH, Tahir N.; PATWARDHAN, Parag P.; CREMERS, Serge; SCHWARTZ, Gary K.. Targeted inhibition of glutaminase as a potential new approach for the treatment of NF1 associated soft tissue malignancies. **Oncotarget**, [S.L.], v. 8, n. 55, p. 94054-94068, 6 out. 2017. Impact Journals, LLC. <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.21573>.

SHIRLING, E. B.; GOTTLIEB, D.. Methods for characterization of *Streptomyces* species. **International Journal Of Systematic Bacteriology**, [S.L.], v. 16, n. 3, p. 313-340, 1 jul. 1966. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/00207713-16-3-313>.

SHEPHERD, Micah D.; KHAREL, Madan K.; BOSSERMAN, Mary A.; ROHR, Jürgen. Laboratory Maintenance of Streptomyces Species. **Current Protocols In Microbiology**, [S.L.], v. 18, n. 1, p. 1-10, ago. 2010. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/9780471729259.mc10e01s18>.

SIERRA, Gonzalo. A simple method for the detection of lipolytic activity of micro-organisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. **Antonie van Leeuwenhoek**, [S.L.], v. 23, n. 1, p. 15-22, dez. 1957. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/bf02545855>.

SIEGFRIED, B. R.; RUCKEMANN, H.; STUMPF, G. Method for the determination of organic acids in silage by high performance liquid chromatography. *Landwirt. Forsch.* v. 37, p. 298–304, 1984.

SIVAKUMAR, K.; SAHU, M. K.; MANIVEL, P. R.; KANNAN, L. Optimum conditions for L-glutaminase production by actinomycete strain isolated from estuarine fish, *Chanos (Forsk.)*, 1775). **Indian J Exp Biol.** n. 44, v. 3, p. 256-264. PMID: 16538868, mar, 2006.

SOUZA, H; OLIVEIRA, L; ANDRADE, J. Seleção de Basidiomycetes da Amazônia para produção de enzimas de interesse biotecnológico. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.28, p. 116-124, 2008.

SVENDSEN, Allan. Lipase protein engineering. **Biochimica Et Biophysica Acta (Bba) - Protein Structure And Molecular Enzymology**, [S.L.], v. 1543, n. 2, p. 223-238, dez. 2000. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0167-4838\(00\)00239-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0167-4838(00)00239-9).

THAMPI, Anusree; BHAI, R. Suseela. Rhizosphere actinobacteria for combating *Phytophthora capsici* and *Sclerotium rolfsii*, the major soil borne pathogens of black pepper (*Piper nigrum* L.). **Biological Control**, [S.L.], v. 109, p. 1-13, jun. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.03.006>.

TRIVEDI, Pankaj; LEACH, Jan E.; TRINGE, Susannah G.; SA, Tongmin; SINGH, Brajesh K.. Plant–microbiome interactions: from community assembly to plant health. **Nature Reviews Microbiology**, [S.L.], v. 18, n. 11, p. 607-621, 12 ago. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41579-020-0412-1>.

VAIJAYANTHI, Govindharaj; VIJAYAKUMAR, Ramasamy; DHANASEKARAN, Dharmadurai. Actinobacteria — A Biofactory of Novel Enzymes. **Actinobacteria - Basics**

And Biotechnological Applications, [S.L.], p. 329-352, 11 fev. 2016. InTech. <http://dx.doi.org/10.5772/61436>.

VEEN, Bart A van Der; UITDEHAAG, Joost C.M; DIJKSTRA, Bauke W; DIJKHUIZEN, Lubbert. Engineering of cyclodextrin glycosyltransferase reaction and product specificity. **Biochimica Et Biophysica Acta (Bba) - Protein Structure And Molecular Enzymology**, [S.L.], v. 1543, n. 2, p. 336-360, dez. 2000. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0167-4838\(00\)00233-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0167-4838(00)00233-8).

VERGER, R. Interfacial Activation of Lipases: Facts and Artifacts. **Trends Biotechnol**, France, v.15, n.1, p.32–38, 1997.

VIJAYAN, N.; SWAPNA, T.s.; HARIDAS, M.; SABU, A. Therapeutic Enzymes. **Current Developments In Biotechnology And Bioengineering**, [S.L.], p. 233-248, 2017. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-444-63662-1.00011-7>.

VINHA, F. N. M.; GRAVINA-OLIVEIRA, M. P.; FRANCO, M. N.; MACRAE, A.; BON, E. P. S.; NASCIMENTO, R. P.; COELHO, R. R. R. Cellulase Production by *Streptomyces viridobrunneus* SCPE-09 Using Lignocellulosic Biomass as Inducer Substrate. **Applied Biochemistry And Biotechnology**, [S.L.], v. 164, n. 3, p. 256-267, 14 dez. 2010. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s12010-010-9132-8>.

VITOLO, M. Aplicações de enzimas na tecnologia de alimentos. AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A. (Coords.). **Biotecnologia na produção de alimentos**. São Paulo: Edgard Blücher Ltda., p. 387-420, 2001

WICKHAM, H. ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. **Springer-Verlag**, New York, 2016.

WILLIAMS, S. T.; ENTWISTLE, S.; KURYLOWICZ, W. The morphology of *Streptomyces* growing in media used for commercial production of antibiotics. **Microbios** v.11A, p.47-60, 1974.

WOOD, S.N. Generalized additive models: an introduction with R (2nd edition). **Chapman and Hall/CRC**. 2017.

WOOD, S.N.; PYA N.; SAEFKEN B. Smoothing parameter and model selection for general smooth models (with discussion). **Journal of the American Statistical Association** 111, p. 1548-1575. 2016.

WOOD, T. M. Properties and mode of action of cellulases. **Biotechnology and Bioengineering Symposium**, v. 5, p. 111-137,1975.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (2019). World Health Organization model list of essential medicines: 21st list 2019. **Geneva: World Health Organization. hdl:10665/325771. WHO/MVP/EMP/IAU/2019.06. License: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.**

YANG, L.; LI, T.; LI, F.; LEMCOFF, J.H. & COHEN, S. Fertilization regulates soil enzymatic activity and fertility dynamics in a cucumber field. **Sci. Hortic.**, v.116, p.21-26, 2008.

ANEXOS

1 – Resultado dos testes enzimáticos para todos os isolados analisados

Tabela 1: Potencial de produção de enzimas hidrolíticas de isolados de *Streptomyces* spp. e tamanho médio dos halos de hidrólise (-) sem produção enzimática; produção enzimática (+) fraca; (++) regular; (+++) boa e (++++) excelente.

ISOLADO	AMILASE		CELULASE		PROTEASE		LIPASE		L-ASP		L-GLN	
CAB 12	14,71	++	0,00	-	0,00	-	23,30	+++	*	+	*	-
CAB 16	32,62	++++	24,51	+++	23,51	+++	19,21	++	*	+	*	+++
CAB 17	0,00	-	0,00	-	0,00	-	0,00	-	*	-	*	++
CAB 18	20,93	+++	15,65	++	20,81	+++	0,00	-	*	+	*	-
CAB 19	22,10	+++	19,23	++	19,36	++	24,76	+++	*	-	*	-
CAB 21	29,78	+++	16,37	++	30,66	++++	19,79	++	*	-	*	-
CAB 23	27,22	+++	0,00	-	12,77	++	0,00	-	*	++	*	++
CAB 24	24,02	+++	23,05	+++	0,00	-	21,44	+++	*	++	*	+
CAB 25	27,29	+++	26,32	+++	0,00	-	16,61	++	*	++	*	+
CAB 35	25,84	+++	18,69	++	20,72	+++	7,10	+	*	-	*	-
CAB 36	17,35	++	18,59	++	29,60	+++	24,01	+++	*	-	*	-
CAB 41	0,00	-	0,00	-	14,09	++	0,00	-	*	++	*	++
CAB 42	0,00	-	0,00	-	23,64	+++	0,00	-	*	-	*	-
CAB 45	24,63	+++	0,00	-	17,58	++	15,62	++	*	+++	*	+++
CAB 50	25,08	+++	0,00	-	0,00	-	36,98	++++	*	+++	*	++
CAB 60	26,85	+++	27,73	+++	0,00	-	26,76	+++	*	-	*	-
CAB 62	30,43	++++	28,26	+++	0,00	-	21,22	+++	*	-	*	-
CAB 63	17,50	++	0,00	-	44,11	++++	19,95	++	*	+	*	-
CAB 64	0,00	-	0,00	-	13,04	++	0,00	-	*	-	*	-
CAB 66	22,16	+++	8,97	+	0,00	-	22,11	+++	*	++	*	++
CAB 67	24,27	+++	14,01	++	0,00	-	13,77	++	*	-	*	-
CAB 68	19,76	++	11,58	++	19,18	+++	0,00	-	*	++	*	++
CAB 69	22,93	+++	20,32	+++	0,00	-	23,66	+++	*	++	*	+
CAB 70	24,30	+++	0,00	-	0,00	-	0,00	-	*	-	*	-
CAB 71	20,41	+++	0,00	-	0,00	-	18,33	++	*	-	*	+
CAB 72	12,54	++	22,02	+++	0,00	-	16,84	++	*	-	*	+
CAB 73	18,56	++	0,00	-	0,00	-	26,03	+++	*	+	*	-
CAB 75	18,60	++	10,36	++	22,44	+++	14,39	++	*	+	*	+++
CAB 76	25,92	+++	14,80	++	19,23	++	0,00	-	*	++	*	+++
CAB 77	15,08	++	15,49	++	25,32	+++	16,19	++	*	+	*	++
CAB 79	18,74	++	8,32	+	14,19	++	0,00	-	*	+	*	++
CAB 80	25,00	+++	12,84	++	0,00	-	15,81	++	*	+	*	+++
CAB 81	21,86	+++	12,22	++	0,00	-	0,00	-	*	+	*	++
CAB 91	25,26	+++	0,00	-	0,00	-	0,00	-	*	-	*	-
CAB 92	20,89	+++	13,72	++	0,00	-	0,00	-	*	+	*	++
CAB 94	21,44	+++	25,11	+++	19,13	++	31,44	++++	*	-	*	-
CAB 97	24,14	+++	0,00	-	0,00	-	0,00	-	*	-	*	-
CAB 98	33,94	++++	17,48	++	35,25	++++	23,20	+++	*	-	*	+
CAB 99	25,06	+++	23,42	+++	14,27	++	0,00	-	*	+	*	++
CAB 100	13,99	++	0,00	-	34,52	++++	0,00	-	*	+	*	+
CAB 101	0,00	-	0,00	-	0,00	-	0,00	-	*	+	*	-
CAB 103	17,70	++	0,00	-	45,90	++++	18,88	++	*	-	*	-
CAB 104	20,14	+++	0,00	-	44,13	++++	22,35	+++	*	++	*	++

*L-asp e L-glut não são avaliadas por tamanho de halo, e sim alteração da coloração do meio

2. Perfil de crescimento ao longo do tempo.

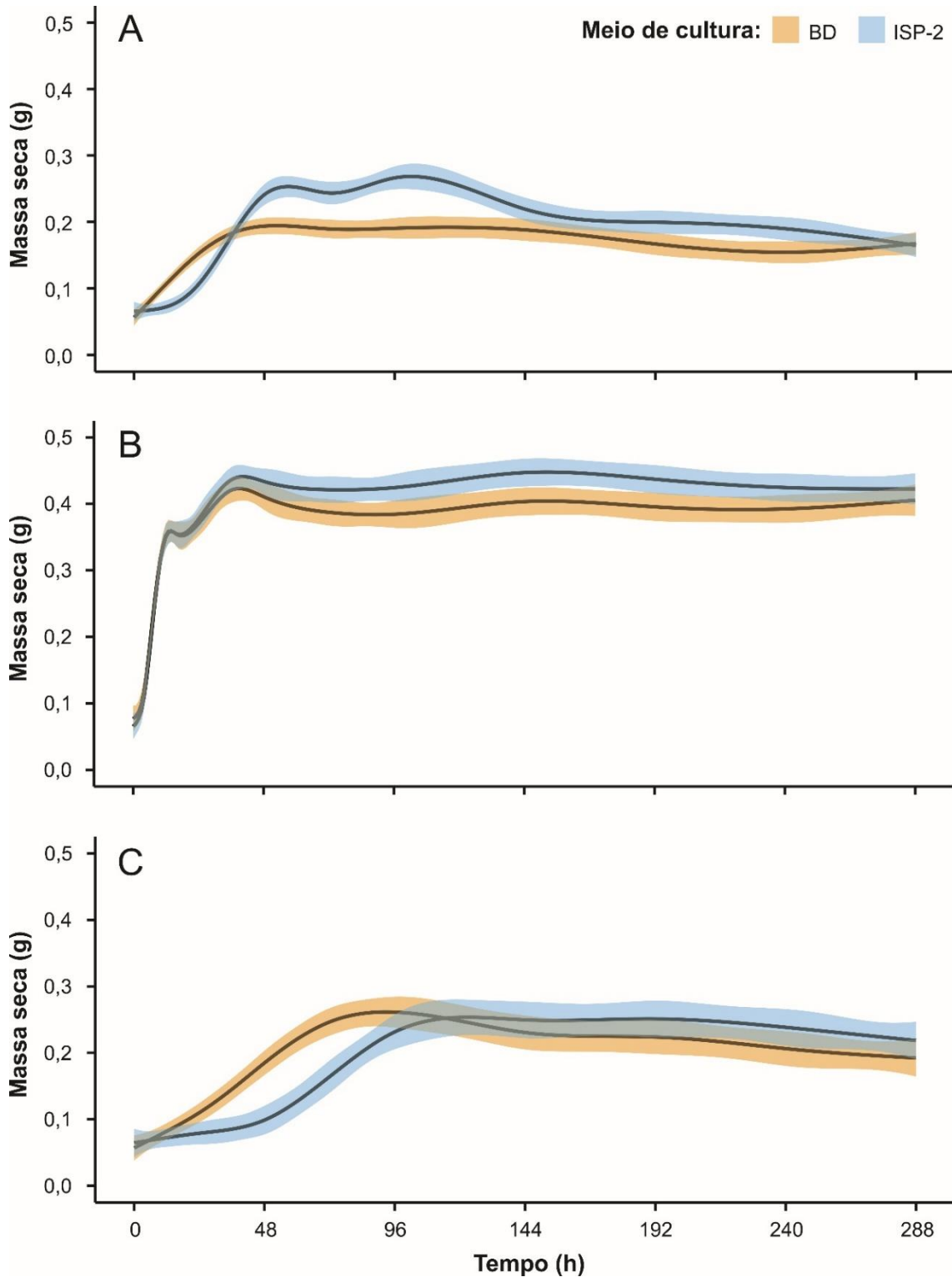


Figura 1. Estimativa de crescimento temporal em incremento de massa seca (g) nos meios de cultura BD e ISP-2. (A) isolado CAB25; (B) isolado CAB50 e; (C) isolado CAB66. Sombras coloridas em torno das linhas de tendência representam os intervalos de confiança de 95%.