

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA  
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

BIOPROSPECÇÃO DE ENZIMAS MICROBIANAS A PARTIR DE BACTÉRIAS  
ISOLADAS DO ALIMENTO LARVAL DE ABELHAS SEM FERRÃO

DARLAN SEDINÁRIO DE LIMA

Monografia apresentada à Coordenação do  
Curso de Biotecnologia, da Universidade  
Federal de Uberlândia, para obtenção do  
grau de Bacharel em Biotecnologia.

Uberlândia - MG

Novembro - 2024

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA  
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

BIOPROSPECÇÃO DE ENZIMAS MICROBIANAS A PARTIR DE BACTÉRIAS  
ISOLADAS DO ALIMENTO LARVAL DE ABELHAS SEM FERRÃO

DARLAN SEDINÁRIO DE LIMA

DRA. RAQUEL CRISTINA CAVALCANTI  
DRA. ANA CAROLINA COSTA SANTOS

Monografia apresentada à Coordenação do  
Curso de Biotecnologia, da Universidade  
Federal de Uberlândia, para obtenção do  
grau de Bacharel em Biotecnologia.

Uberlândia – MG  
Novembro - 2024

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA  
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

BIOPROSPECÇÃO DE ENZIMAS MICROBIANAS A PARTIR DE BACTÉRIAS  
ISOLADAS DO ALIMENTO LARVAL DE ABELHAS SEM FERRÃO

DARLAN SEDINÁRIO DE LIMA

DRA. RAQUEL CRISTINA CAVALCANTI  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

DRA. ANA CAROLINA COSTA SANTOS  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

Homologado pela coordenação do Curso  
de Biotecnologia em \_\_ / \_\_ / \_\_

DR. NILSON NICOLAU JÚNIOR

Uberlândia - MG  
Novembro – 2024

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA  
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

BIOPROSPECÇÃO DE ENZIMAS MICROBIANAS A PARTIR DE BACTÉRIAS  
ISOLADAS DO ALIMENTO LARVAL DE ABELHAS SEM FERRÃO

DARLAN SEDINÁRIO DE LIMA

Aprovado pela Banca Examinadora em: 21 / 11 / 2024 Nota: 100

**Dra. Raquel Cristina Cavalcanti Dantas**

Uberlândia, de de

Dedico este trabalho a todos os meus  
professores, amigos e familiares que  
contribuíram de alguma forma para minha  
formação acadêmica e como ser humano.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço em primeiro lugar a Deus por me abençoar com uma ótima saúde e permitir com que eu tivesse uma família maravilhosa, minhas irmãs Denise e Daniela e meus pais, Carlos José Sedinário da Silva e Dagma Maria de Lima Silva, que sempre estiveram ao meu lado e me apoiaram. Agradeço a minha filha Manuela, que sempre foi o meu maior incentivo para continuar correndo atrás dos meus objetivos mesmo perante das adversidades que surgem durante percurso da vida. Agradeço a todos amigos que me fizeram companhia durante todos os momentos da minha vida me permitindo sempre ter a certeza de que eles também contribuem para minhas conquistas. Agradeço também a todos os professores e colegas do instituto de biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia pelos ensinamentos, incentivo, motivação e orientação durante minha caminhada acadêmica, em especial a Dra. Raquel Cristina Cavalcanti Dantas, minha orientadora, e a Dra. Ana Carolina Costa Santos, minha coorientadora, pela oportunidade e pelo conhecimento adquirido durante o tempo em que trabalhamos juntos para elaboração do presente trabalho. Agradeço também a Universidade Federal de Uberlândia como instituição por me oferecer a melhor qualidade de ensino durante minha formação acadêmica e ao instituto de biotecnologia, em especial, ao laboratório de genética e bioquímica da UFU (LABGEN), pela estrutura disponibilizada e as condições necessárias para que eu pudesse desenvolver este trabalho.

## RESUMO

A busca por alternativas mais sustentáveis para processos industriais tem se tornado o foco de muitas pesquisas que visam substituir a utilização de produtos químicos, os quais oferecem riscos ao meio ambiente e necessitam de grandes quantidades de recursos naturais, por insumos biodegradáveis extraídos da natureza. Nessa perspectiva as enzimas microbianas se tornam uma opção interessante por apresentarem maior eficiência e estabilidade em pH's extremos e temperaturas elevadas, quando utilizadas em processos industriais. O objetivo do presente trabalho foi identificar um possível potencial biotecnológico para produção de amilase e celulase microbianas com possíveis aplicações industriais, ao avaliar 20 bactérias isoladas do alimento larval de abelhas sem ferrão nativas do Brasil, pertencentes a Coleção de Microrganismos Isolados de Abelha sem Ferrão (CoMISBee) da Universidade Federal de Uberlândia. Primeiramente, foi realizada a triagem das bactérias produtoras de enzimas utilizando meio sólido enriquecido com 1% de amido solúvel ou carboximetilcelulose (CMC), e as bactérias com melhores índices enzimáticos (IE) foram inoculadas e incubadas em meio líquido também enriquecido com os substratos supracitados para dar origem ao extrato enzimático bruto. Posteriormente o extrato enzimático bruto foi avaliado quantitativamente quanto a sua capacidade de hidrolisar o amido solúvel e o CMC utilizando o teste de DNS (ácido-3,5-dinitrosalicílico). As bactérias Ta19 e Ta35 apresentaram maiores valores de IE, sendo que a bactéria Ta19 produziu enzimas capazes de hidrolisar o amido solúvel e a bactéria Ta35 produziu enzimas que degradaram tanto o amido solúvel quanto a CMC. A metodologia utilizada como base para este estudo foi adaptada para a utilização de uma menor quantidade de reagentes e outros insumos laboratoriais ao substituir eppendorf por microplacas de PCR e o banho maria por termociclador. Os parâmetros tempo e temperatura de incubação do teste enzimático foram escolhidos conforme literatura. Conclui-se que são necessários estudos mais

aprofundados para esclarecer o real potencial das enzimas microbianas ao avaliar sua atividade utilizando diferentes variações de temperatura, pH e tempo de incubação.

**Palavras-chave:** bactérias; enzimas microbianas; amilase; celulase; abelhas sem ferrão

## ABSTRACT

The search for more sustainable alternatives for industrial processes has become the focus of much research that aims to replace the use of chemical products, which pose risks to the environment and require large amounts of natural resources, with biodegradable inputs extracted from nature. From this perspective, microbial enzymes become an interesting option as they present greater efficiency and stability at extreme pHs and high temperatures, when used in industrial processes. The objective of the present work was to identify a possible biotechnological potential for the production of microbial amylase and cellulase with possible industrial applications, by evaluating 20 bacteria isolated from the larval food of stingless bees native to Brazil, belonging to the Collection of Microorganisms Isolated from Stingless Bees (CoMISBee) from the Federal University of Uberlândia. First, enzyme-producing bacteria were screened using solid medium enriched with 1% soluble starch or carboxymethyl cellulose (CMC), and bacteria with the best enzymatic indexes (IE) were inoculated and incubated in liquid medium also enriched with the aforementioned substrates. to give rise to the crude enzyme extract. Subsequently, the crude enzyme extract was quantitatively evaluated for its ability to hydrolyze soluble starch and CMC using the DNS test (3,5-dinitrosalicylic acid). Ta19 and Ta35 bacteria showed higher IE values, with Ta19 bacteria producing enzymes capable of hydrolyzing soluble starch and Ta35 bacteria producing enzymes that degraded both soluble starch and CMC. The methodology used as the basis for this study was adapted to use a smaller amount of reagents and other laboratory supplies by replacing eppendorf with PCR microplates and the water bath with a thermocycler. The incubation time and temperature parameters for the enzymatic test were chosen according to the literature. It is concluded that further studies are needed to clarify the real potential of microbial enzymes when evaluating their activity using different variations in temperature, pH and incubation time.

**Keywords:** microbial enzymes; amylase; cellulase; bacteria; stingless bees

## SUMÁRIO

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO .....</b>  | <b>14</b> |
| <b>2 JUSTIFICATIVA.....</b>  | <b>15</b> |
| <b>3 OBJETIVO .....</b>  | <b>16</b> |
| <b>3.1 Objetivo geral .....</b>  | <b>16</b> |
| <b>3.2 Objetivos específicos .....</b>   | <b>16</b> |
| <b>4 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>   | <b>17</b> |
| <b>4.1 Microrganismos.....</b>   | <b>17</b> |
| <b>4.2 Ensaio qualitativo para produção de enzimas.....</b>                            | <b>18</b> |
| <b>4.3 Ensaio de atividade enzimática .....</b>  | <b>20</b> |
| <b>4.3.1 Produção da cultura semente para quantificação do inóculo .....</b>           | <b>20</b> |
| <b>4.3.2 Preparo dos reagentes colorimétricos e solução estoque de substrato .....</b> | <b>21</b> |
| <b>4.3.3 Fermentação submersa .....</b>  | <b>22</b> |
| <b>4.3.4 Obtenção do extrato enzimático bruto.....</b>                                 | <b>23</b> |
| <b>4.3.5 Construção da curva padrão de glicose.....</b>                                | <b>23</b> |
| <b>4.3.6 Quantificação de açúcares redutores utilizando DNS.....</b>                   | <b>24</b> |
| <b>4.3.7 Quantificação da atividade enzimática.....</b>                                | <b>25</b> |
| <b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>  | <b>26</b> |
| <b>5.1 Seleção das bactérias produtoras de enzimas.....</b>                            | <b>26</b> |
| <b>5.2 Determinação dos índices enzimáticos (IE).....</b>                              | <b>27</b> |
| <b>5.3 Quantificação da atividade amilolítica e celulolítica.....</b>                  | <b>29</b> |
| <b>6 CONCLUSÃO.....</b>  | <b>30</b> |
| <b>REFERÊNCIAS .....</b>   | <b>31</b> |

## LISTA DE TABELAS

|                   |   |    |
|-------------------|---|----|
| <b>Tabela 1 -</b> | Código das bactérias selecionadas da Coleção de<br>Microorganismos Isolados de Abelhas sem ferrão do CoMISBee e<br>suas respectivas abelhas sem ferrão..... | 18 |
| <b>Tabela 2 -</b> | Quantificação do inóculo utilizado para produção do extrato<br>enzimático bruto.....  | 21 |
| <b>Tabela 3 -</b> | Índices enzimáticos de bactérias produtoras de enzimas<br>amilolíticas .....  | 28 |
| <b>Tabela 4 -</b> | Índices enzimáticos de bactérias produtoras de enzimas<br>celulolíticas .....   | 28 |

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1</b> – Produção do inóculo.....  | 21 |
| <b>Figura 2</b> – Meios para produção enzimática após 48 horas de incubação.....  | 22 |
| <b>Figura 3</b> - Gráfico representando a curva padrão de glicose com a absorvância em função da concentração da glicose .....    | 24 |
| <b>Figura 4</b> – Bactérias cultivadas em meio enriquecido com amido e coradas com lugol.....                                     | 27 |
| <b>Figura 5</b> – Bactérias cultivadas em meio enriquecido com CMC, coradas com vermelho congo e lavadas com solução de NaCl..... | 27 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|          |  |
|----------|--|
| CoMISBee | Coleção de Microrganismos Isolados de Abelha sem ferrão do Laboratório de Genética |
| UFU      | Universidade Federal de Uberlândia   |
| LABGEN   | Laboratório de Genética de Bioquímica  |
| BHI      | Brain Heart Infusion   |
| g/L      | Grama por Litro  |
| M        | Molar  |
| CMC      | Carboximetilcelulose   |
| LB       | Luria Bertani  |
| IE       | Índice Enzimático  |
| UFC      | Unidade Formadora de Colônia   |
| µg       | Microgramas  |
| g        | Grama  |
| rpm      | Rotações por Minuto  |
| PCR      | Reação em cadeia da polimerase   |
| DNS      | Ácido dinitrosalicílico  |
| nm       | Nanômetros   |
| µmol     | Micro Molar  |
| MDC      | Média do Diâmetro das Colônia  |
| MDH      | Média do Diâmetro do Halo  |
| U        | Unidade Internacional de Atividade Enzimática                                      |

## 1 INTRODUÇÃO

Enzimas de origem microbiana são aquelas produzidas pelo metabolismo primário e/ou secundário de fungos e bactérias, durante seu crescimento. Essas enzimas possuem diversas aplicações em diferentes setores da indústria, como é o caso de enzimas utilizadas na indústria têxtil, alimentos, couro e papel (ALAM KHAN; PRIYA BIOCON, 2011). Mais da metade das enzimas industriais são produzidas por leveduras e fungos filamentosos e cerca de 30% por bactérias (RIGO et al., 2021).

A produção de enzimas microbianas depende de vários fatores como tipo de microrganismo que será utilizado, tipo de processo fermentativo, tipo e a quantidade de substrato utilizado, temperatura ideal e aeração mais adequados para o processo. Estimasse uma taxa de crescimento anual de 6,7% no mercado global de enzimas fazendo com que o valor total deste mercado atinja US\$ 525 bilhões até o ano de 2030 (HASSAN et al., 2024).

Dentre as enzimas mais pesquisadas e comercializadas estão as amilases e celulasas, ambas capazes de hidrolisar cadeias de polissacarídeos. As amilases produzem compostos poliméricos menores a partir do amido, como dextrinas e glicose de forma isolada (GUPTA et al., 2003). Essas enzimas possuem grande importância na indústria sendo empregadas para formação de oligossacarídeos no processamento de alimentos e nas indústrias de detergentes e bebidas, representando entre 25% e 33% do mercado mundial de enzimas (RAJAGOPALAN; KRISHNAN, 2008). Por outro lado, as celulasas, as quais geralmente são extraídas de fungos filamentosos, são as enzimas mais utilizadas na indústria têxtil, sendo aplicadas na lavagem do jeans e de outros tecidos para obtenção de aspecto envelhecido e são utilizadas em novos tecidos sintéticos como o Lyocell, também chamado Tencel, realizando a decomposição prévia do resíduo celulolítico (MONTEIRO; SILVA, 2009). Outra importante aplicação das celulasas é na produção de etanol de segunda geração, uma vez que a celulose é uma das matérias primas

naturais mais abundante do planeta e a enzima celulase é capaz de disponibilizar açúcar fermentescíveis a partir da quebra da celulose (CHUNDAWAT et al., 2011).

Para conseguir explorar o enorme potencial biotecnológico de microrganismos produtores de enzimas presentes na natureza nos mais diversos ecossistemas, são necessárias ferramentas que visam identificá-los para posteriormente potencializar a produção enzimática a partir de estudos mais aprofundados (ADRIO; DEMAIN, 2014).

Estudos recentes demonstraram uma relação simbiótica entre abelhas sem ferrão e microrganismos que fazem parte da sua microbiota natural, indicando a presença de bactérias benéficas produtoras de enzimas extracelulares que podem estar envolvidas na conversão de materiais de origem vegetal, como o pólen em substâncias nutritivas e antimicrobianas (SANTOS et al., 2022). Essas bactérias têm papel importante na saúde da colmeia, uma vez que são responsáveis por produzir moléculas antimicrobianas que inibem o crescimento de outros microrganismos competidores e patogênicos, além de produzir compostos que protegem os produtos apícolas da degradação, garantindo sua boa qualidade (NGALIMAT et al., 2020).

O presente trabalho tem como objetivo ampliar o conhecimento a respeito do potencial biotecnológico de microrganismos isolados do alimento larval de abelhas sem ferrão nativas do Brasil em relação a produção de enzimas com possíveis aplicações industriais.

## **2 JUSTIFICATIVA**

A crescente preocupação com a degradação do meio ambiente causada pelos processos produtivos industriais e a busca por alternativas mais limpas e eficientes com menores gastos de recursos naturais e energia, faz com que a busca por enzimas microbianas que possam ser utilizadas em diversos setores industriais se torne muito importante para possibilitar com que os processos industriais sejam mais sustentáveis. Estudos recentes mostraram uma grande

diversidade de microrganismos, fungos e bactérias, vivendo em simbiose com abelhas sem ferrão nativas do Brasil onde podem desempenhar papéis importantes nas colmeias, que variam desde a ação antimicrobiana contra microrganismos patogênicos até na produção dos produtos apícolas, como o mel e própolis. Este estudo investigará o potencial biotecnológico de bactérias presentes nas colmeias de abelha sem ferrão em relação à produção de enzimas que possam ser utilizadas na indústria de uma forma geral, assim como a possível produção dessas enzimas em larga escala utilizando processos fermentativos.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Avaliar o potencial biotecnológico para produção de enzimas microbianas de 20 espécies de bactérias isoladas do alimento larval de abelhas sem ferrão pertencentes à Coleção de Microrganismos Isolados de Abelha sem Ferrão do Laboratório de Genética da UFU (CoMISBee).

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Identificar qualitativamente quais das 20 bactérias isoladas do alimento larval de abelhas sem ferrão são capazes de produzir as enzimas amilase e celulase utilizando o método semiquantitativo que relaciona os diâmetros dos halos enzimáticos produzidos pelas respectivas bactérias com o diâmetro da colônia de onde se originou, obtendo assim o índice enzimático (IE).

- Determinar quantitativamente a atividade das enzimas produzidas por aquelas bactérias que apresentarem melhores índices enzimáticos na etapa qualitativa do experimento.
- Adaptação da metodologia utilizada com o objetivo de substituir a utilização de eppendorfs ou tubos de vidro por microplacas de PCR e microplacas de fundo transparente (microplaca para ELISA), diminuindo assim a quantidade de insumos laboratoriais necessários para realização do experimento.

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Microrganismos**

Vinte bactérias da Coleção de Microrganismos Isolados de Abelha sem Ferrão do Laboratório de Genética (CoMISBee) (Tabela 1), pertencente ao Laboratório de Genética (LABGEN) do Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia foram utilizadas para avaliar produção de enzimas microbianas. As bactérias foram reativadas em meio sólido BHI (Brain Heart Infusion) e incubadas a 37°C durante um período de 24 horas.

**Tabela 1.** Código das bactérias selecionadas da Coleção de Microrganismos Isolados de Abelhas sem ferrão do CoMISBee e suas respectivas abelhas sem ferrão

| <b>Abelha sem ferrão</b>       | <b>Código da bactéria</b>                          |
|--------------------------------|--|
| <i>Tetragonisca angustula</i>  | Ta14A; Ta19; Ta23; Ta24; Ta28; Ta29;<br>Ta30; Ta35 |
| <i>Melipona quadrifasciata</i> | Mq02; Mq9BI; Mq16; Mq39B; Mq47;<br>Mq64; Mq66      |
| <i>Melipona scutellaris</i>    | Ms21; Ms29; Ms30A; Ms45; Ms47                      |

## 4.2 Ensaio qualitativo para produção de enzimas

Para identificar as bactérias produtoras de amilases e celulases, as bactérias foram inoculadas em placas de petri contendo meio LB sólido enriquecido com o respectivo substrato utilizado por cada uma das enzimas de interesse.

Para avaliar a produção de celulases foi realizada uma adaptação da metodologia proposta por Barajas e colaboradores (2019) em que foi produzido um meio de cultura Luria Berthani (LB) sólido enriquecido com 1% carboximetilcelulose (CMC) como principal fonte de carbono. A avaliação da produção de amilases foi realizada utilizando a mesma metodologia, no entanto, utilizou-se, ao invés do CMC, amido solúvel também na concentração de 1%.

As bactérias foram inoculadas em triplicata nas placas de petri contendo os meios específicos para avaliação de cada enzima utilizando palitos de madeira, previamente esterilizados (SILVA; ADIWARDANA, 2021). As placas foram, então, encubadas por 24 horas para, então, avaliar a atividade enzimática.

Após o período de incubação de 24 horas, as placas de petri contendo o meio LB sólido enriquecido com 1% de amido e inoculadas com as bactérias estudadas foram inundadas com lugol 1%, mesmo corante utilizando na técnica de coloração gram, para possibilitar a visualização dos halos oriundos de atividade amilolítica, uma vez que este corante é utilizado para indicar a presença de amido, formando um complexo de coloração escura variando de azul a marrom. Quando o amido é hidrolisado não ocorre a formação dessa coloração fazendo com que o meio em questão apresente áreas claras após a adição do lugol (MADHAV; VERMA; TANTA, 2011). Com esse método, foi possível identificar os microrganismos produtores de enzimas amilolíticas e medir os halos de atividade enzimática utilizando um paquímetro digital. Para identificar os microrganismos produtores de enzimas celulolíticas e avaliar a formação de halos de atividade enzimática, as placas de petri contendo as bactérias inoculadas nos meios enriquecidos com 1% de CMC foram inundadas com uma solução de vermelho congo (1 M) e incubadas por 15 minutos. Após o período de incubação as placas foram lavadas com solução de NaCl (1 M) para melhor observação dos halos enzimáticos, sendo que áreas mais claras confirmam a hidrólise da CMC, indicando a presença de enzimas celulolíticas (ISLAM, 2019).

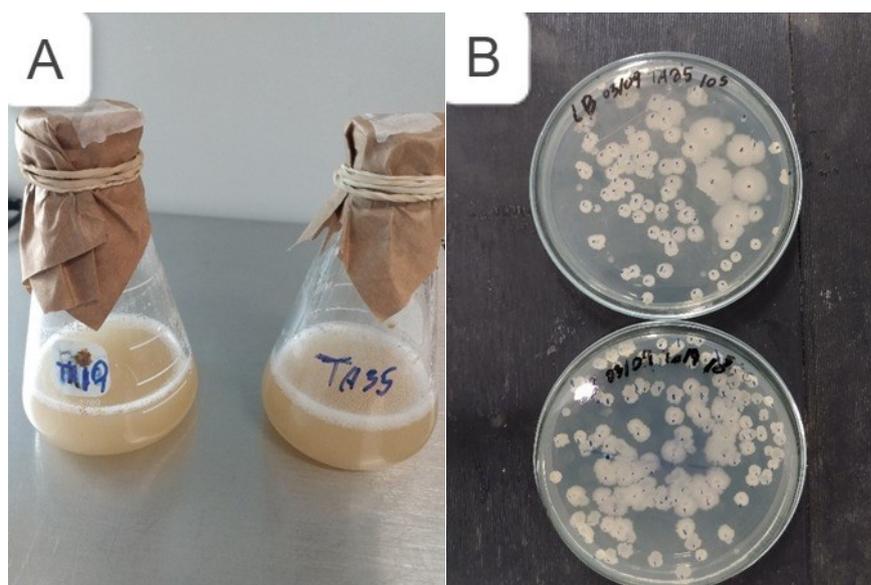
Após os respectivos períodos de incubação e a utilização de métodos adicionais para observação dos halos enzimáticos, o índice enzimático (IE) foi calculado ao dividir o valor encontrado para a média dos diâmetros dos halos formados, devido a hidrólise do substrato específico (amido solúvel ou CMC) realizada pela enzima, pelo valor encontrado para a média dos diâmetros das colônias bacterianas responsáveis por originar os respectivos halos enzimáticos, ambos mensurados utilizando um paquímetro digital (HANKIN; ANAGNOSTAKIS, 1975).

### **4.3 Ensaio de atividade enzimática**

Para avaliar a atividade enzimática de forma quantitativa, as enzimas produzidas pelas bactérias com melhores Índices Enzimáticos (IE) nos ensaios qualitativos foram avaliadas quanto a sua capacidade de disponibilizar açúcares redutores a partir da hidrólise do amido e do CMC.

#### **4.3.1 Produção da cultura semente e quantificação do inóculo**

As bactérias com os melhores resultados no teste semiquantitativo para produção de enzimas extracelulares foram inoculadas em 50 ml de meio LB líquido dentro de Erlenmeyers de 150 ml, e incubadas a 37 °C durante 24 horas sob agitação. Após o período de incubação, 1 ml de meio contendo bactérias ativas foi utilizado como inóculo para produção de extrato enzimático bruto, ao ser adicionado em 49 mL de meio contendo os substratos específicos para cada tipo de enzima (RAWAT; TEWARI, 2012). Para quantificação do inóculo, foi utilizada uma adaptação da metodologia proposta por Davis e outros (2005), em que 0,1 mL de meio contendo bactérias ativas foi adicionado em 0,9 mL de solução salina esterilizada, e a partir dessa solução foi realizada uma diluição seriada até a proporção 1:100.000.000, ou  $10^8$ . Para cada diluição foi realizado o plaqueamento, utilizando o método de espalhamento de placa, de 0,1 mL da diluição em meio sólido (LB), para cálculo do UFC. As placas foram, então, encubadas em estufa (37°C) por 24 horas. A contagem de unidades formadoras de colônia foi realizada visando quantificar o inóculo, e assim, utilizá-lo na produção do extrato enzimático bruto.



**Figura 1.** Produção do inóculo. **A)** Cultura semente contendo as bactérias Ta19 e Ta35 inoculadas em 50 mL de meio LB líquido e incubadas por 24 horas sob agitação e temperatura de 37 °C; **B)** Contagem das unidades formadoras de colônia (UFC's) para quantificação do inóculo.

**Tabela 2.** Quantificação do inóculo utilizado para produção do extrato enzimático bruto

| Bactérias | Unidades formadoras de colônia (UFC's) |
|-----------|--|
| Ta 19     | $1,1 \times 10^8$                      |
| Ta 35     | $7,5 \times 10^7$                      |

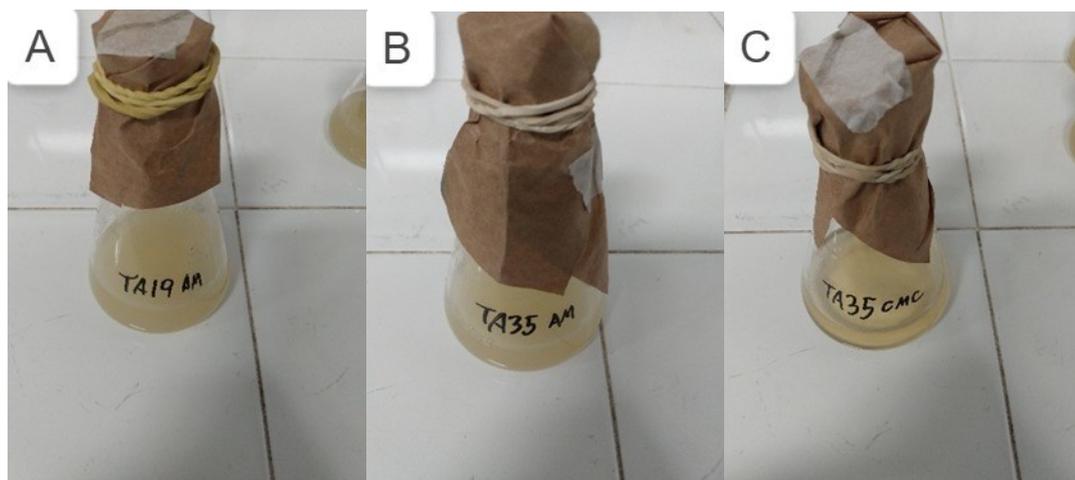
#### 4.3.2 Preparo dos reagentes colorimétricos e solução estoque de substrato.

A avaliação das atividades amilolíticas e celulolíticas foi realizada utilizando o reagente colorimétrico ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), que consegue mensurar a quantidade de açúcares redutores livres em uma mistura, a partir de uma curva padrão previamente construída com diferentes concentrações conhecidas de glicose. A solução de DNS foi preparada conforme metodologia proposta por Moura de Vasconcelos e colaboradores (2013), e adaptada, mantendo

as devidas proporções, para a utilização de microplacas de PCR com 96 poços. 1 g de DNS foi dissolvido em 20 mL de solução de NaOH (2 M) (solução A) e 30 g de tartarato de sódio e potássio foi dissolvido em 50 mL de água destilada sob agitação constante e temperatura igual a 60 °C (solução B). Após a dissolução completa do tartarato de sódio e potássio, a solução B foi adicionada sobre a solução A e o volume total ajustado para 100 mL adicionando água destilada. Tanto as atividades amilolítica e celulolítica foram determinadas utilizando soluções estoque com 1% de substrato (amido ou CMC) dissolvidos em tampão acetato 50 mM, com pH igual a 5 (RAWAT; TEWARI, 2012).

#### 4.3.3 Fermentação submersa

Após adicionar 1 mL da cultura semente em Erlenmeyers contendo 49 mL de meio líquido com os substratos específicos para cada combinação enzima/bactéria, os Erlenmeyers foram incubados a 37 °C, durante um período de 48 horas com agitação constante para produção do extrato enzimático bruto (RAWAT; TEWARI, 2012).



**Figura 2.** Meios para produção enzimática após 48 horas de incubação. **A)** Meio LB enriquecido com 1% de amido solúvel e inoculado com a bactéria Ta19; **B)** Meio LB enriquecido com 1% de amido solúvel e inoculado com a bactéria Ta35; **C)** Meio LB enriquecido com 1% de CMC e inoculado com a bactéria Ta35.

#### **4.3.4 Obtenção do extrato enzimático bruto**

Após o período de incubação das bactérias, em meios líquidos contendo os respectivos substratos específicos para cada tipo de enzima (amido e CMC), 2 mL de cada um dos meios foram adicionados em ependorfs de 2 mL e centrifugados a 12.000 rpm durante 10 minutos a 4 °C para obtenção do sobrenadante livre de células contendo as enzimas pesquisadas e utilizado como extrato enzimático bruto (RAWAT; TEWARI, 2012).

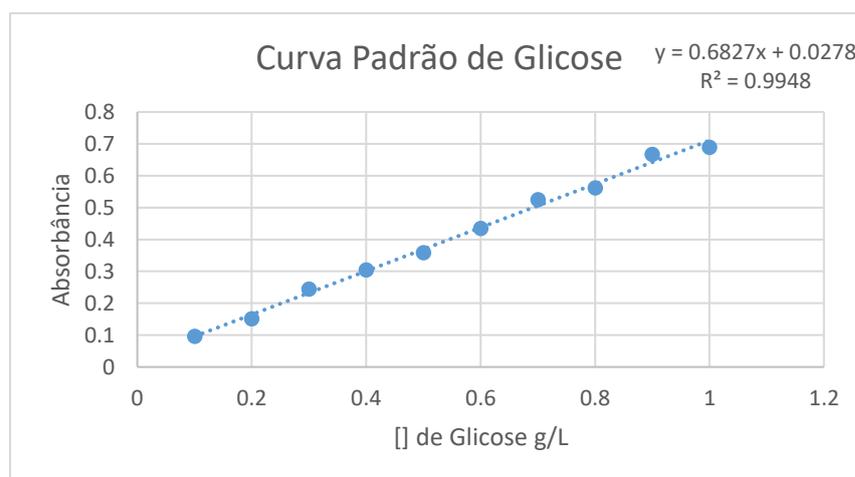
#### **4.3.5 Construção da curva padrão de glicose**

Para construção da curva padrão de glicose foi utilizada a metodologia proposta por Moura de Vasconcelos e colaboradores (2013) e adaptada para utilização de uma microplaca de PCR de 96 poços. Uma solução mãe contendo 1 g/L de glicose anidra foi preparada dissolvendo-se 0,1g de glicose em 100 mL de água destilada. Para a construção da curva padrão, utilizada para determinar a quantidade de açúcares redutores hidrolisados pelas enzimas que atuam sobre o amido solúvel e sobre a CMC, foram preparadas diluições a partir da solução mãe de glicose variando entre 0,1 e 0,9 g/L, e 0,04 mL essas diluições foram adicionadas em triplicada à poços de uma placa de PCR de 96 poços e incubadas em um termociclador durante um período de 15 minutos a 100 °C, juntamente com 0,04 mL de reagente DNS. Após o período de incubação, a mistura reacional foi transferida para uma placa de 96 poços com fundo transparente (placa de Elisa) diluída utilizando água destilada e a mistura então transferida para uma placa de 96 poços com fundos transparentes para realização da leitura em um espectrofotômetro calibrado em 540 nm. As absorbâncias para cada concentração de glicose foram então registradas e utilizadas para a construção de uma curva padrão. Utilizando a

equação da reta definida a partir da curva padrão foi possível obter as concentrações de açúcares redutores oriundos da ação das enzimas amilase e celulase.

#### 4.3.6 Quantificação de açúcares redutores utilizando DNS

O método de quantificação de açúcares redutores se baseia na redução do ácido 3, 5-dinitrosalicílico (DNS), ocasionada pela glicose, em um composto análogo (ácido 3-amino-5-nitrosalicílico), que por sua vez é um composto aromático colorido com grande capacidade de absorver a luz, possibilitando assim criar uma relação direta entre a absorbância e a concentração de açúcares redutores (MOURA DE VASCONCELOS et al., 2013). As absorbâncias obtidas após a leitura em espectrofotômetro da placa de 96 poços com fundo transparente contendo as diferentes concentrações de glicose incubadas com o reagente DNS, foram utilizadas para a construção de uma curva padrão e para obtenção da equação da reta, cujo coeficiente de determinação foi igual a 0,9948 indicando o quão próximo estão os dados da linha de regressão ajustada e que, portanto, a estimativa para a quantidade de açúcares redutores encontrados nas amostras é bastante representativa (Figura 3).



**Figura 3.** Gráfico representando a curva padrão de glicose com a absorbância em função da concentração de glicose.

#### 4.3.7 Quantificação da atividade enzimática

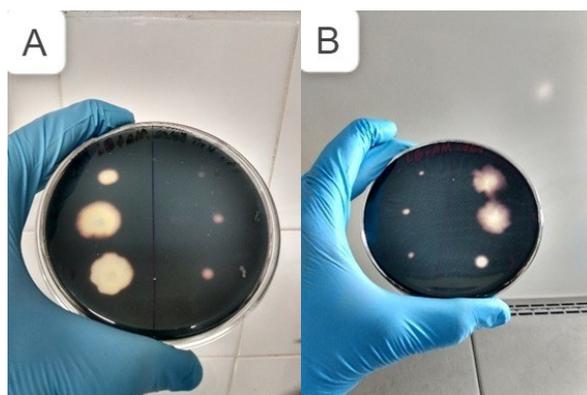
Para quantificação da atividade enzimática da amilase e celulase foram utilizadas duas metodologias, sendo a primeira proposta por Rawat e Tewari (2012) com algumas adaptações visando a utilização de microplaca de PCR com 96 poços no lugar de tubos de vidro ou endorfs e a utilização de um termociclador no lugar do banho maria. Outras adaptações realizadas, foram: o aumento do pH para avaliação de atividade enzimática para 5 e a mudança de concentração da solução estoque de substrato para 1% de cada substrato específico (amido e CMC), devido a elevada viscosidade da solução estoque de CMC. Sendo assim 0,020 ml de extrato enzimático bruto foram adicionados em triplicata aos poços da placa de PCR e incubados com 0,020 ml de solução estoque contendo 1% de cada um dos substratos específicos (amido e CMC) durante um período de 30 minutos a 60 °C (RAWAT; TEWARI, 2012). A temperatura de 60 °C, utilizada no experimento, se deve ao fato de que enzimas termoestáveis que possuem boa atividade em temperaturas variando entre 60 e 125 °C apresentam estabilidade termodinâmica e cinética, sendo capazes de limitar a contaminação microbiana ao mesmo tempo em que são capazes de acelerar a reação química tornando o processo industrial mais eficiente (THAPA et al., 2019). Após o período de incubação, uma segunda metodologia foi utilizada e, também, adaptada para utilização de placa de PCR de 96 poços e do termociclador. Mantendo as proporções utilizadas na metodologia original, foram adicionados 0,04 ml de reagente DNS a cada um dos poços contendo a mistura extrato enzimático/substrato e essa nova mistura reacional foi novamente incubada durante 15 minutos a 100 °C utilizando o termociclador (MOURA DE VASCONCELOS et al., 2013). Após esse último período de incubação, as misturas reacionais contendo extrato enzimático/substrato/DNS foram então transferidas em triplicata para uma placa de 96 poços com fundo transparente (placa de Elisa) e diluídas com água destilada até o volume de trabalho de cada poço. As absorbâncias das

misturas reacionais de cada um dos poços foram obtidas em um espectrofotômetro calibrado em 540 nm e os resultados foram analisados utilizando uma curva padrão de glicose previamente construída. Para a confecção do branco, o extrato enzimático bruto foi substituído por água destilada e essa mistura recebeu o mesmo tratamento recebido pelas amostras contendo os extratos enzimáticos. Uma unidade de atividade enzimática corresponde a quantidade de enzimas necessária para hidrolisar 1  $\mu\text{mol}$  de substrato por minuto de reação (FRAGA; THAIS; MENDES, 2021).

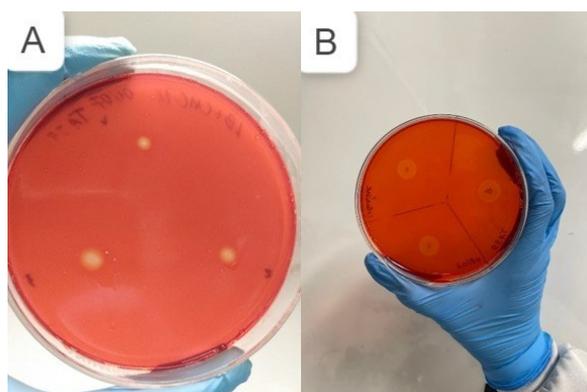
## **5 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **5.1 Seleção das bactérias produtoras de enzimas**

Das 20 bactérias inoculadas nos meios contendo substratos específicos para cada uma das duas enzimas estudadas, foi observado que apenas 5 delas apresentaram a produção de enzimas extracelulares, evidenciada pela formação de halos de atividade enzimática ao redor das colônias. Dentre as bactérias que foram capazes de produzir apenas um tipo de enzima se destacaram as bactérias Ta19, Ta28 e Ta30 que produziram apenas enzimas amilolíticas, e a Ta24 que foi capaz de produzir apenas enzimas celulolíticas do tipo CMCase. A bactéria Ta35 apresentou resultados positivos para produção de amilase e celulase.



**Figura 4.** Bactérias cultivadas em meio enriquecido com amido e coradas com lugol. **A)** halos enzimáticos formados pelas bactérias Ta19 (lado esquerdo) e Ta28 (do lado direito); **B)** halos enzimáticos formados pelas bactérias Ta30 (lado esquerdo) e Ta35 (lado direito).



**Figura 5.** Bactérias cultivadas em meio enriquecido com CMC, coradas com vermelho congo e lavadas com solução de NaCl. **A)** halo enzimático formado pela bactéria Ta24; **B)** halo enzimático formado pela bactéria Ta35.

## 5.2 Determinação dos índices enzimáticos (IE)

De acordo com Hankin e Anagnostakis (1975), é possível realizar um ensaio semiquantitativo em relação a atividade enzimática de microrganismos relacionando os diâmetros dos halos formados pela degradação do substrato com o diâmetro da colônia

microbiana. Para realizar a determinação dos índices enzimáticos, o diâmetro das colônias bacterianas inoculadas em triplicata e seus respectivos halos enzimáticos foram medidos utilizando um paquímetro digital e o diâmetro, em milímetros, dos halos formados foi dividido pelo diâmetro de suas respectivas colônias de onde se originaram. No ensaio em meio sólido, um microrganismo é considerado ótimo produtor de enzimas quando o índice enzimático é maior ou igual a 2 (FAKIRRA DE OLIVEIRA NUNES et al., 2013). Os valores encontrados para os índices enzimáticos foram inseridos nas tabelas 3 e 4.

**Tabela 3.** Índices enzimáticos de bactérias produtoras de enzimas amilolíticas

| <b>Bactéria</b> | <b>MDC (mm)</b> | <b>MDH (mm)</b> | <b>IE</b> | <b>Classificação do IE</b> |
|-----------------|-----------------|-----------------|-----------|----------------------------|
| <b>Ta 19</b>    | 6,06            | 11,82           | 1,95      | Moderado produtor          |
| <b>Ta 28</b>    | 4,04            | 4,04            | 1         | Fraco produtor             |
| <b>Ta 30</b>    | 2,61            | 3,27            | 1,25      | Fraco produtor             |
| <b>Ta 35</b>    | 6,19            | 12,55           | 2,03      | Forte produtor             |

**MDC** (Média dos diâmetros das colônias), **MDH** (Média dos diâmetros dos halos enzimáticos), **IE** (Índice Enzimático).

**Tabela 4.** Índices enzimáticos de bactérias produtoras de enzimas celulolíticas

| <b>Bactéria</b> | <b>MDC (mm)</b> | <b>MDH (mm)</b> | <b>IE</b> | <b>Classificação do IE</b> |
|-----------------|-----------------|-----------------|-----------|----------------------------|
| <b>Ta 24</b>    | 4,28            | 5,62            | 1,31      | Fraco produtor             |
| <b>Ta 35</b>    | 4,04            | 10,84           | 2,68      | Forte produtor             |

**MDC** (Média dos diâmetros das colônias), **MDH** (Média dos diâmetros dos halos enzimáticos), **IE** (Índice Enzimático).

### 5.3 Quantificação da atividade amilolítica e celulolítica

Para a quantificação da atividade amilolítica foram selecionadas as bactérias Ta19 e Ta35 que apresentaram melhores índices enzimáticos. Utilizando a equação da reta obtida através da construção da curva padrão de glicose, foi possível determinar a quantidade de açúcares redutores liberados com ação das enzimas amilase e celulase sobre os substratos amido solúvel e CMC, respectivamente. O cálculo da atividade enzimática foi realizado multiplicando-se a quantidade de açúcares redutores em  $\mu\text{mols}$  pelo volume da mistura reacional contendo extrato enzimático e solução de substrato em mL, e o resultado dessa multiplicação foi dividido pelo volume do extrato enzimático bruto utilizado e pelo tempo de incubação, que, no trabalho em questão, foi de 30 minutos (CHANDRA BOSE, 2010). De acordo com Rawat e Tewari (2012), uma unidade de atividade enzimática é responsável pela liberação de 1  $\mu\text{mol}$  de glicose por mL, por minuto de reação. Utilizando esse conceito foi possível determinar os valores para as atividades enzimáticas, sobre a solução de amido a 1%, para os extratos das bactérias Ta19 e Ta35, que apresentaram unidades de atividade enzimáticas (U) iguais a 0,19 e 0,27 U/mL respectivamente. Khan e Biocon (2011) encontraram um valor de atividade enzimática igual a 0,018 U/mL para amilases extracelulares obtidas de *Bacillus subtilis* coletadas de solos contendo resíduos de cozinha em decomposição. Por outro lado, Madhav e colaboradores (2011) trabalhando com bactérias também do gênero *Bacillus sp.* isoladas de amostras de solo de diferentes regiões da cidade de Dehradun na Índia, encontraram o valor de atividade para amilase bacteriana variando de 6,85 a 18,33 U/mL dependendo do tempo de incubação, pH e temperatura utilizada no experimento. Em outro estudo, oito bactérias do gênero *Streptomyces sp.* isoladas de áreas de mangue na região de Muthupet na Índia, apresentaram atividade enzimática variando entre 2,4 e 5,9 U/mL (RENGASAMY; THANGAPRAKASAM, 2018). O presente trabalho, em relação à atividade celulolítica foi

encontrado o valor de 0,09 U/mL para o ensaio utilizando o extrato enzimático bruto oriundo da bactéria Ta35. Tuhin Das e colaboradores (2022), avaliaram a atividade enzimática celulolítica de uma nova cepa bacteriana identificada como *Arthrobacter woluwensis* (TDS9) utilizando CMC como única fonte de carbono e encontraram os valores de atividade enzimática CMCase iguais a 0,25 U/mL sem a otimização do meio de cultura e 1,06 U/mL com a utilização de íons de potássio, pH 8 e incubação por 72 horas a 25 °C.

## 6 CONCLUSÃO

Os valores encontrados no presente trabalho para as atividades amilolítica e celulolítica não expressam de forma definitiva a totalidade do potencial biotecnológico das bactérias Ta19 e Ta35 para produção de enzimas microbianas, uma vez que os resultados foram obtidos a partir de um experimento baseado em uma metodologia que buscava a avaliação da atividade enzimática em pH, temperatura e tempo de incubação definidos para outro microrganismo, demonstrando assim importância do incentivo à pesquisas mais aprofundadas para desvendar o real potencial biotecnológico dessas bactérias quanto a produção de enzimas microbianas, buscando a otimização do processo ao avaliar a produção e atividade enzimática em diferentes pH, temperatura e concentração de substrato, assim como a quantidade de tempo de incubação necessária para obter uma maior concentração de enzimas e a maior atividade enzimática. Uma investigação mais aprofundada dessas bactérias ou de outras bactérias também isoladas do alimento larval de abelhas sem ferrão nativas do Brasil, possibilitará desvendar o verdadeiro potencial biotecnológico quanto a utilização desses microrganismos em bioprocessos industriais para produzir produtos de alta qualidade e elevado valor agregado.

## REFERÊNCIAS

ADRIO, J. L.; DEMAIN, A. L. Microbial enzymes: tools for biotechnological processes. *Biomolecules*, 2014.

ALAM KHAN, J.; PRIYA BIOCON, R. A study on partial purification and characterization of extracellular amylases from *Bacillus subtilis*. *Advances in Applied Science Research*, v. 2, n. 3, p. 509-519, 2011.

BARAJAS, J. F. et al. Isolation and Characterization of Bacterial Cellulase Producers for Biomass Deconstruction: A Microbiology Laboratory Course. *Journal of Microbiology & Biology Education*, v. 20, n. 2, jan. 2019.

CHANDRA BOSE, S. Screening and Quantification of Marine Actinomycetes Producing Industrial Enzymes Amylase, Cellulase and Lipase from South Coast of India. *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives*, v. 2, n. 5, p. 1481-1487, 2011.

CHUNDAWAT, S. P. S. et al. Deconstruction of lignocellulosic biomass to fuels and chemicals. *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*, v. 2, p. 121–145, 15 jul. 2011.

DAVIS, K. E. R.; JOSEPH, S. J.; JANSSEN, P. H. Effects of growth medium, inoculum size, and incubation time on culturability and isolation of soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 71, n. 2, p. 826–834, fev. 2005.

FAKIRRA DE OLIVEIRA NUNES, G. et al. Atividade enzimática de isolados de rizóbio obtidos de nódulos de leguminosas forrageiras. Florianópolis, 2013.

FRAGA, T.; THAIS, P.; MENDES, D. Guia prático para caracterização de enzimas. Brasília, (2021) Disponível em: < <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/967759>>.

GUPTA, R. et al. Microbial  $\alpha$ -amylases: A biotechnological perspective. Process Biochemistry, v. 38, n. 11, p. 1599–1616, 30 jun. 2003.

HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. L. The Use of Solid Media for Detection of Enzyme Production by Fungi. Mycologia, v. 67, n. 3, p. 597–607, maio 1975.

ISLAM, F. Isolation and Characterization of Cellulase-producing Bacteria from Sugar Industry Waste. American Journal of BioScience, v. 7, n. 1, p. 16, 2019.

MADHAV, K.; VERMA, S.; TANTA, R. Isolation of amylase producing Bacillus species, from soil sample of different regions in Dehradun and to check the effect of pH and Temperature on their amylase activity. Article in Journal of Pharmaceutical and Biomedical Sciences, Dehradun, v. 12, n. 3, 2011.

MONTEIRO, V. N.; SILVA, R. DO N. Aplicações Industriais da Biotecnologia Enzimática. Revista Processos Químicos, v. 3, n. 5, p. 9–23, 2 jan. 2009.

MOURA DE VASCONCELOS, N. et al. Embrapa Agroindústria Tropical Fortaleza, CE 2013 Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Embrapa Agroindústria Tropical Ministério da

Agricultura, Pecuária e Abastecimento Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 88  
Determinação de Açúcares Redutores pelo Ácido 3,5-Dinitrosalicílico: Histórico do  
Desenvolvimento do Método e Estabelecimento de um Protocolo para o Laboratório de  
Bioprocessos. 2013.

NGALIMAT, M. S. et al. A review on the association of bacteria with stingless bees. Sains  
Malaysiana Penerbit Universiti Kebangsaan Malaysia, p. 1853-1863, agosto 2020.

RAJAGOPALAN, G.; KRISHNAN, C.  $\alpha$ -Amylase production from catabolite derepressed  
Bacillus subtilis KCC103 utilizing sugarcane bagasse hydrolysate. Bioresource Technology, v.  
99, n. 8, p. 3044–3050, maio 2008.

RAWAT, R.; TEWARI, L. Purification and characterization of an acidothermophilic cellulase  
enzyme produced by Bacillus subtilis strain LFS3. Extremophiles, v. 16, n. 4, p. 637–644, jul.  
2012.

RENGASAMY, S.; THANGAPRAKASAM, U. ISOLATION, SCREENING AND  
DETERMINATION OF A-AMYLASE ACTIVITY FROM MARINE STREPTOMYCES  
SPECIES. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, v. 10, n. 4, p. 122,  
1 abr. 2018.

RIGO, D. et al. Produção Microbiológica de Enzimas uma Revisão. Brazilian Journal of  
Development, v. 7, n. 1, p. 9232–9254, 2021.

SANTOS, A. C. C. et al. Antimicrobial activity of supernatants produced by bacteria isolated from Brazilian stingless bee's larval food. *BMC Microbiology*, v. 22, n. 1, 1 dez. 2022.

SILVA, D. M. C. E.; ADIWARDANA, N. S. Wooden sticks for plaque streaking and microbiological inoculation might be more cost- effective, but is its large scale use feasible? Quality control methods and proof of concept. *Brazilian journal of biology*, v. 82, e239691, novembro 2021.

THAPA, S. et al. Biochemical Characteristics of Microbial Enzymes and Their Significance from Industrial Perspectives. *Molecular Biotechnology*, v. 61, p. 579-601, agosto 2019.