

## PESQUISA DE HIDROLASES BACTERIANAS ASSOCIADAS AO TRATO DIGESTÓRIO DE ISÓPTEROS DA SERRA DE BATURITÉ - CEARÁ

Bruno Roberto da Silva Queiroz <sup>1</sup>  
Márcia Barbosa de Sousa <sup>2</sup>  
Eveline de Abreu Meneses <sup>3</sup>  
Vanessa Lúcia Rodrigues Nogueira <sup>4</sup>

### INTRODUÇÃO

A maioria dos processos biotecnológicos de interesse industrial envolvem enzimas dos mais variados tipos e funções, e as bactérias são amplamente utilizadas no processo de produção dessas enzimas, seja por expressão heteróloga, ou por cultivo de cepas que naturalmente produzem as enzimas de interesse. A Biotecnologia contemporânea tem investido esforços na produção dessas enzimas, especialmente nas hidrolases, haja visto que são compostos de alto valor comercial devido as suas funções em diversos bioprocessos. Os micro-organismos têm sido os principais produtores de hidrolases industriais devido a sua plasticidade metabólica, e sua capacidade quase ilimitada de sintetizar diversos compostos bioativos. Estudos de bioprospecção de enzimas e compostos bioativos tem sido o enfoque da biotecnologia de recursos naturais na busca por essas moléculas, no entanto, ainda há uma grande diversidade a ser explorada. A região do Maciço de Baturité, no estado do Ceará, abriga uma pequena área de Mata Atlântica cujos recursos naturais ainda são pouco estudados. Não há na literatura trabalhos descritivos ou investigativos acerca da diversidade microbiana para essa área, e, a região se mostra como uma área que potencialmente abriga grande diversidade genética ainda inexplorada e que pode render resultados animadores para a pesquisa em tecnologia enzimática e na aplicação biotecnológica dos achados. Este trabalho buscou isolar a microbiota de bactérias do trato digestório de isópteros (cupins), tendo em vista a extensa literatura descrevendo micro-organismos associados a esses animais, auxiliando na digestão de diversos compostos da sua dieta, e que são de interesse em bioprocessos. Para tanto, os animais foram coletados, e destes

---

<sup>1</sup> Graduando do Curso de Ciências Biológicas da Universidade da Ineграção Intenacional da Lusofonia AfroBrasileira - UNILAB, [bruno2011roberto@gmail.com](mailto:bruno2011roberto@gmail.com);

<sup>2</sup> Doutora em Biotecnologia de Recursos Aquáticos (UFC), Professora do Instituto de Ciências Exatas e da Natureza da Universidade da Ineграção Intenacional da Lusofonia AfroBrasileira - UNILAB, [marcia\\_bsousa@unilab.edu.br](mailto:marcia_bsousa@unilab.edu.br);

<sup>3</sup> Doutora em Química Analítica, Professora do Instituto de Ciências Exatas e da Natureza da Universidade da Ineграção Intenacional da Lusofonia AfroBrasileira - UNILAB, [eveline@unilab.edu.br](mailto:eveline@unilab.edu.br);

<sup>4</sup> Professor orientador: Doutora em Biotecnologia (UFC), Professora do Instituto de Ciências Exatas e da Natureza - UNILAB, [vanessa.nogueira@unilab.edu.br](mailto:vanessa.nogueira@unilab.edu.br).

isolados 20 cepas bacterianas. Até o momento, os isolados foram testados quanto a capacidade de produção de três tipos de hidrolases, amilases, celulasas e proteases. Foram obtidos resultados positivos de 40% para atividade amilolítica, 55% para atividade proteolítica e 25% para atividade celulolítica. Testes estão sendo realizados para lipases e esterases além da caracterização fisiológica dos isolados. As cepas promissoras serão submetidas a identificação molecular.

## METODOLOGIA

Para o isolamento das cepas bacterianas do trato digestório dos isópteros, as colônias foram manualmente coletadas e conduzidas ao laboratório de Microbiologia da UNILAB e feito uma triagem dos indivíduos dos restos de solo, folhas e madeira. Os espécimes foram dissecados para a coleta do trato digestório. Utilizando uma seringa descartável com agulha de 1 mL foi feita uma incisão no abdome e sugado o conteúdo interno, o intestino foi separado do resto dos órgãos internos. Os intestinos de dez indivíduos de cada amostra estudada, foram transferidos para um microtubo contendo 900  $\mu\text{L}$  de solução salina estéril. O inóculo foi macerado e agitado por 1 min em *vórtex* e posteriormente diluído até  $10^{-5}$  da concentração inicial do extrato. Em seguida, alíquotas de 50  $\mu\text{L}$  foram plaqueadas em diferentes meios de cultura tradicionais, ágar nutriente; *plate count agar* (PCA); TSB, e incubadas a temperatura ambiente até o surgimento de colônias. As colônias foram inicialmente isoladas de acordo com aspectos morfológicos (cor, formato, textura e tamanho). E, os isolados submetidos à capacidade de produção das enzimas celulasas, amilases, e proteases pela realização do método de difusão em Ágar. Para tanto, os isolados foram cultivados em placas de meio PCA contendo os devidos substratos, amido (0,1% p/v) conforme descrito por Coon *et al.* (1957), caseína (1% p/v) como descrito por Sousa *et al.*, (2008), e carboxi-metil-celulose (0,5% p/v) de acordo com WOOD *et al.*, (1982). No geral, a leitura dos resultados dos ensaios enzimáticos se deu pela detecção de zonas claras ao redor das colônias (Rodon *et al.*, 2000; Henne *et al.*, 2000; Lorenz *et al.*, 2002). Para a detecção de amilase e celulase foi necessário a adição de lugol ( $\text{I}_2$  1%/KI 2%) e vermelho congo 0,5% respectivamente (Theater; Wood, 1981). As atividades hidrolíticas das enzimas amilase, celulase, e protease foram estimadas através do cálculo do índice enzimático (IE), utilizando-se a seguinte equação:  $\text{IE} = \text{Dh}/\text{Dc}$ , sendo Dh o diâmetro em mm do halo de hidrólise e Dc o diâmetro em mm das colônias dos isolados (Stamford *et al.*, 1998; Silva *et al.*, 2015). A avaliação dos índices enzimáticos (IE) considerou valores  $\geq 2,0$  como indicativo de atividade enzimática em meio sólido (Lealem; Gashe, 1994; Stamford; Araújo,

1998; Oliveira *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2010). Todos os testes foram realizados em triplicatas, e os resultados foram analisados pelo teste ANOVA e Tukey, a 5% de probabilidade, por meio do programa PAST (Paleontological Statistic, version 2.1).

## DESENVOLVIMENTO

Os micro-organismos figuram atualmente entre as principais fontes de produção de enzimas de interesse industrial, devido a algumas características interessantes para produção destas, como a grande quantidade de produto gerado em tempo relativamente curto, a não dependência de condições ambientais e geográficas apropriadas e gasto reduzido no uso de matérias primas (Zimmer *et al.*, 2009). As enzimas de origem microbiana estão, atualmente entre os principais produtos naturais de interesse biotecnológico. Utilizando-se de manipulação genética de micro-organismos é possível a produção de qualquer enzima, com isso a tendência no futuro é que todas as enzimas utilizadas industrialmente sejam de origem microbiana (Mussatto; Fernandes; Milagres, 2007). As enzimas são catalisadores biológicos extraordinários, ou seja, aumentam a velocidade de reações químicas sem interferir no processo, pois não são consumidas na reação e não alteram o equilíbrio químico da mesma, sendo, portanto, preferenciais em relação aos catalisadores químicos clássicos, pois são muito eficientes e ambientalmente compatíveis, apresentam elevada especificidade, estabilidade reacional e algumas funcionam independentes de cofatores (Lorenz; Schleper, 2002). No entanto, apesar do desempenho promissor em laboratório, a aplicação dessas enzimas em escala industrial ainda tem sido limitada (Beloqui *et al.*, 2008). Esta limitação deve-se principalmente à falta de moléculas disponíveis que possam realizar reações químicas desejáveis, principalmente pelo número de enzimas microbianas disponíveis ainda limitado, devido à maioria dos micro-organismos não ser cultivável em laboratório (Vieites *et al.*, 2009). As enzimas hidrolíticas tem sido alvo de grande interesse por parte de diversos setores da indústria especialmente o setor energético devido ao esforços para produção de biocombustíveis e a diminuição das emissões de gases do efeito estufa.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A metodologia utilizada para o isolamento das bactérias do trato digestório de isópteros (cupins), já descrita anteriormente, possibilitou o isolamento de vinte cepas bacterianas sendo denominadas IS04, IS05, IS06, IS08, IS09, IS15, IS16, IS17, IS19, IS20, IS21, IS23, IS24, IS25, IS27, IS28, IS32, IS34, IS37 e IS38. Dentro os isolados apenas IS19 apresentou todas as

atividades testadas, 07 (sete) isolados foram positivos para duas atividades enzimáticas, 06 (seis) foram positivos para pelo menos uma das atividades testadas, e 06 (seis) isolados não apresentaram nenhuma atividade enzimática testada.

Somente 08 (oito) isolados foram capazes de degradar o amido, o isolado IS08 apresentou o índice enzimático igual 4,05, o maior encontrado. A análise de variância dos dados demonstrou um valor de  $p = 0,00067$  ( $p < 0,05$ ) indicando variação estatisticamente significativa entre os valores de índice enzimático de amilases. As amilases têm uma gama imensa de aplicações industriais, tais como fabricação de ração animal, indústria de papel, indústria têxtil, indústria de alimentos e energia renovável (Sun *et al.*, 2010).

A protease foi encontrada em 11 (onze) dos isolados, o maior índice enzimático encontrado foi igual a 4,64 no isolado IS37. A análise de variância dos dados demonstrou um valor de  $p = 0,01182$  ( $p < 0,05$ ) indicando variação estatisticamente significativa entre os valores de índice enzimático de proteases. As proteases são utilizadas na indústria farmacêutica há tempos para a preparação de medicamentos, como pomadas para o tratamento de feridas (Bhosales *et al.*, 1995), além de indústria de bebidas, alimentos (Whitaker; Law, 2001; Mussatto; Fernandes; Milagres, 2007).

A atividade celulolítica foi detectada em 05 (cinco) dos vinte isolados, sendo 2,89 o maior valor de I.E, encontrado em IS27. A análise de variância demonstrou um valor de  $p = 0,00000640$  ( $p < 0,05$ ) indicando variação estatisticamente significativa entre os valores de índice enzimático de celulase. As celulases foram as que apresentaram o menor percentual de isolados positivos. Esses resultados podem ser explicados pelo fato de que micro-organismos em cultura pura regularmente demonstram atividades lignocelulósicas insatisfatórias (Kim *et al.*, 2006), muitas vezes precisando de enzimas auxiliares para otimizar a atividade (Franco Cairo *et al.*, 2016). Cupins têm sido fontes de várias enzimas microbianas, especialmente celulases com objetivo de degradação de material lignocelulósico para produção de biocombustíveis (Okuma, 2003; Scharf; Boucias, 2010; Franco Cairo *et al.*, 2016; Aparicio; Freitas, 2017).

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Os micro-organismos estudados se mostraram capazes de degradar celulose, amido e proteínas, demonstrando potencial de aplicação em diversos bioprocessos industriais e biotecnológicos. No entanto são necessários estudos mais aprofundados sobre as características físico-químicas e bioquímicas dessas enzimas, como também a identificação molecular dos isolados, a purificação e caracterização das enzimas. A identificação e clonagem dos genes responsáveis pela via biossintética das enzimas também mostra-se necessário afim de

possibilitar estudos mais aprofundados da viabilidade de aplicação dessas enzimas em escala industrial.

**Palavras-chave:** hidrolases bacterianas, isópteros, Maciço de Baturité

## REFERÊNCIAS

- APARÍCIO, J. F.; FREITAS, A.D.G. Atividade enzimática de microrganismos associados aos cupins *Nasutitermes* sp. no município de Coari, Amazonas. **Scientia Amazonia**, v. 6, n.3, 31-37, 2017.
- BELOQUI, A.; DE MARIA, P. D.; GOLYSHIN, P. N.; FERRER, M. Recent trends in industrial microbiology. *Current Opinion Microbiology*, v. 11, p. 240-248, 2008.
- FRANCO CAIRO, J. P. L.; CARAZZOLLE, M. F.; LEONARDO, F. C.; ET AL. Expanding the Knowledge on Lignocellulolytic and Redox Enzymes of Worker and Soldier Castes from the Lower Termite *Coptotermes gestroi*. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 2016.
- COON, H. J.; JENNISON, M. W.; WEEK, O. B. Routine tests for the identification of bacteria. In: SOCIETY OF AMERICAN BACTERIOLOGISTS. *Manual of microbiological methods*. New York: McGraw-Hall, 1957. p. 239-262.
- HENNE, A.; SCHMITZ, R. A.; BOMEKE, M.; GOTTSCHALK, G.; DANIEL, R. Screening of environmental DNA libraries for the presence of genes conferring lipolytic activity on *Escherichia coli*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 66, p. 3113-3116, 2000.
- LORENZ, P.; SCHLEPER, C. Metagenome – a challenging source of enzyme discovery. **Journal of molecular catalysis B: Enzymatic**, v. 19-20, p. 13-19, 2002.
- LORENZ, P.; LIEBETON, K.; NIEHAUS, F.; ECK, J. Screening for novel enzymes for biocatalytic processes: accessing the metagenome as a resource of novel functional sequence space. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 13, p. 572–577, 2002.
- MUSSATTO, S. I.; FERNANDES, M.; MILAGRES, A. M. F. Enzimas: poderosa ferramenta na indústria. **Ciência Hoje**, v. 41, n. 242, p. 28-33, 2007.
- OHKUMA, M. Termite symbiotic systems: efficient bio-recycling of lignocellulose. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, n.61, p.1–9, 2003.
- RONDON, M. R.; AUGUST, P. R.; BETTERMANN, A. D.; BRADY, S. F.; GROSSMAN, T. H.; LILES, M. R.; ET AL. Cloning the soil metagenome, a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 66, p. 2541-2547, 2000.
- SCHARF, M.E.; TARTAR, A. Termite digestomes as sources for novel lignocellulases. **Biofuels, Bioproducts & Biorefining**, v.6, n.2, p.540- 552, 2008.
- SOUSA, O.V.; MACRAE, A.; MENEZES, F.G.R.; GOMES, N.C.M.; VIEIRA, R.H.S.F. ; MENDONÇA-HAGLER, L.C.S. The impact of shrimp farming effluent on bacterial

communities in mangrove waters, Ceará, Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, v. 52, p. 1725–1734, 2006.

SUN, H; ZHAO, P; GE, X. Recent advances in microbial raw starch degrading enzymes. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, China, v. 160, p. 988–1003, 2010.

ZIMMER, K.R.; BORRÉ, G.L.; TRENTIN, D.S.; JÚNIOR, C.W.; FRASSON, A.P.; GRAEFF, A.A.; *et al.* Enzimas microbianas de uso terapêutico e diagnóstico clínico. **Revista Liberato**, v.10, n.14, p. 123-137, jul/dez. 2009.

VIEITES, J. M.; GUAZZARONI, M. E.; BELOQUI, A.; GOLYSHIN, P. N.; FERRER, M. Metagenomics approaches in systems microbiology. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 33, p. 236-255, 2009.

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