

Subárea: 2.08.05 - Bioquímica/Enzimologia e 2.08.02 - Bioquímica/Bioquímica de Microrganismos.

## **CARACTERIZAÇÃO DE ATIVIDADES ENZIMÁTICAS EXTRACELULARES DE BACTÉRIAS ISOLADAS DO MOLUSCO *Aplysia dactylomela* E PROPOSTA DE UM MÉTODO PARA DETECÇÃO DE ATIVIDADE PROTEOLÍTICA EXTRACELULAR**

Gabriella Silva Campos Carelli<sup>1</sup>, Guiuliana Damasceno Castillo<sup>2</sup>, Anderson Felipe Jácome de França<sup>3</sup>, Yago Queiroz dos Santos<sup>4</sup>, Elizeu Antunes dos Santos<sup>5</sup>.

1. Mestranda do programa de pós-graduação em Bioquímica (PPGBIOQ) –de medicina Tropical (IMT) da universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN).
2. Graduada em ciências biológicas da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN) – Laboratório de Química e Função de Proteínas Bioativas (LQFPB).
3. Professor doutor da Universidade Federal de Mossoró (UFESA) - Laboratório de Química e Função de Proteínas Bioativas (LQFPB).
4. Professor mestre do Instituto Federal do Ceará (IFCE)-Instituto de medicina Tropical (IMT) da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN).
5. Professor/Orientador Titular do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN) - Laboratório de Química e Função de Proteínas Bioativas (LQFPB).

### **Resumo**

Enzimas são catalisadores biológicos que aceleram as reações químicas, o seu uso vem sendo uma tendência crescente em diversos ramos da indústria no mundo. Por isso, a busca por novas enzimas, requerendo um aprimoramento de metodologias favoráveis às indústrias e ao meio ambiente.

Este trabalho teve como objetivo isolar linhagens bacterianas do molusco *Aplysia dactylomela*, caracterizá-las quanto a capacidade de produzir enzimas e propor um método alternativo para detecção de proteases extracelulares. Foram isoladas 10 linhagens, que foram classificadas morfofisiologicamente. Foram observadas atividades proteolítica, celulolítica e amilolítica. Como um método alternativo de detecção da atividade proteolítica, as placas foram coradas com Commassie G-250 ou R-250 e comparadas com o método de Frazier. Revelou-se que as bactérias de origem marinha constituem uma fonte potencial de enzimas de interesse tecnológico.

**Palavras-chave:** catalisadores biológicos; proteases; Commassie R-250.

**Apoio Financeiro:** Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

### **Introdução**

Enzimas são catalisadores biológicos, a maioria de origem proteica, que aceleram reações químicas. O uso de catalisadores enzimáticos vem sendo muito utilizado nas indústrias (MUSSATO et al., 2007). Além disso, utilizar enzimas para processos industriais é menos agressivo ao meio ambiente. As amilases degradam amido, essenciais para processos de sacarificação, produção de cerveja e queijos (Suriya et al. 2016). As celulasas degradam celulose, utilizadas para produção de sucos de fruta, café e vinho. A produção de etanol de segunda geração a partir de biomassa lignocelulósica, tem sido bem explorada ultimamente (Rodrigues et al. 2019). As proteases clivam proteínas, servem como moléculas de sinalização, agentes terapêuticos e encontram amplas aplicações em biotecnologia e indústria farmacêutica (Banik, Biswas and Karmakar, 2018).

As enzimas isoladas a partir de fungos e bactérias têm dominado as aplicações no setor industrial. (PANDEY et al. 2000). Pesquisadores e indústrias, estão interessados em encontrar novos microrganismos como fontes de moléculas, e especificamente enzimas. Sobre as origens de extração dos microrganismos, sabe-se que é nas fontes menos exploradas, assim como os ambientes marinhos, que se espera encontrar uma nova diversidade química (CLARDY; WALSH; 2004).

Para detecção de proteases extracelulares a metodologia mais utilizada é a descrita por SMIBERT, KRIEG (1994) onde o Reativo de Frazier, composto por cloreto de mercúrio diluído em ácido clorídrico, precipita as proteínas que não foram degradadas. A problemática é a alta toxicidade dos compostos, colocando em risco as pessoas que o manuseiam. Reagentes como Coomassie Brilliant Blue G-250 e R-250, devido ao baixo custo, utilizado na detecção e quantificação proteica, em eletroforese e dosagem pelo método de Bradford, também pode ser empregado para detecção de proteases extracelulares.

O Objetivo do presente trabalho foi caracterizar as atividades enzimáticas extracelulares de bactérias associadas ao molusco *Aplysia dactylomela* e propor um método alternativo para detecção da atividade proteolítica.

## Materiais e Métodos

Um espécime de *Aplysia dactylomela* foi coletado na praia de Santa Rita, no estado do Rio Grande do Norte, em dezembro de 2014. O molusco foi armazenado em água marinha do mesmo local de forma estéril, acondicionado em gelo e transportado ao laboratório, onde foi congelado a  $-4^{\circ}\text{C}$ . Em uma cabine de fluxo laminar, a amostra foi lavada com solução salina, moída com ajuda de almofariz e pistilo, 2 mL do homogenato foram pipetados em três placas de petri contendo meio Luria Bertani (LB). Após 24 horas de incubação a  $37^{\circ}\text{C}$ , houve crescimento de um conjunto de colônias e, em seguida, fez-se repique de cada uma para novas placas contendo meio LB, repetindo este processo a cada 24 horas até a obtenção de linhagens isoladas. Para a confirmação do isolamento, foi realizada coloração de Gram segundo metodologia de Huecker, com modificações. Os isolados foram nomeados com "Ap" + diferentes numerações. Cada uma das linhagens foi semeada em meios ricos nos polímeros alvo: gelatina, celulose e amido; para a detecção de protease, celulase e amilase, respectivamente. As linhagens que apresentaram halos de degradação, foram consideradas positivas para produção de enzima.

Para a detecção de proteases e amilases, foi utilizada a metodologia descrita por SMIBERT; KRIEG (1994), nas proteases as linhagens foram inoculadas em meio com 20 g de gelatina; 0,5 g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,25 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,16 g de  $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  e 15 g de ágar por litro, pH 7,5; Para detectar as amilases: as linhagens foram incubadas em meio contendo 2 g de amido; 0,5 g de  $\text{NaNO}_3$ ; 1 g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; 0,5 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,01 g de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 1 g de extrato de levedura e 15 g de ágar por litro, pH 7,5, a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 48 horas. Após esse tempo cada placa foi corada com 20 mL de corante contendo 0,66 g de  $\text{I}_2$  e 1,22 g de KI por litro de água destilada com modificações. Após 48 horas de incubação foram adicionados 20 mL de reativo de Frazier por placa (12 g de  $\text{HgCl}_2$  e 16 mL de HCl concentrado para cada 80 mL de água destilada). Para a detecção de celulase, segundo a metodologia descrita por KASANA (2008) as linhagens foram incubadas em meio com 1 g de carboximetilcelulose (CMC); 0,5 g de  $\text{NaNO}_3$ ; 1 g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; 0,5 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,01 g de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 1 g de extrato de levedura e 15 g de ágar por litro, pH 7,5. Após 48 horas as placas foram coradas com 20 mL de corante contendo 0,66 g de  $\text{I}_2$  e 1,22 g de KI por litro de água destilada.

Para testar uma técnica alternativa de detecção de proteases em meio sólido, as linhagens foram incubadas em meio LB durante 24 horas, a  $37^{\circ}\text{C}$ ; em seguida foram incubadas em meio com 5 g de gelatina; 0,5 g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,25 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,16 g de  $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  e 15 g de ágar por litro, pH 7,5. Cada linhagem foi plaqueada em três placas diferentes, após o tempo de incubação, uma das placas foi corada com reativo de Frazier, outra com Coomassie R-250 e a terceira com Coomassie G-250.

## Resultados e Discussão

Dez linhagens foram isoladas e caracterizadas a partir do molusco *Aplysia dactylomela*. Onde 100% dos isolados foram Gram +. Sendo 50% bacilos sem arranjo, 20% diplobacilos e 30% de estreptobacilos. Mesmo tendo sido isoladas várias bactérias Gram positivas a partir do ambiente marinho, é relativamente pouco conhecida a diversidade e distribuição das mesmas (GONTANG; FENICAL; JENSEN, 2007). Mostrando o quanto estes desempenham um papel importante no ambiente marinho. Pabel e colaboradores (2003) relatam em diferentes trabalhos que o gênero *Bacillus* tem espécies marinhas que são normalmente isoladas de sedimentos e invertebrados marinhos, e nesse ambiente, são uns dos maiores produtores de metabólitos secundários.

Das 10 linhagens testadas para as atividades celulolítica e amilásica extracelular, sete apresentaram resultado positivo. Alguns microrganismos foram capazes de secretar tanto celulases como amilases, as quais degradaram o meio em diferentes proporções. Os autores SINGH e HAYASHI (1995) descreveram o gênero *Cellulomonas* como produtores aeróbios de celulases, com espécies de bacilos, assim como *Bacillus subtilis*, *Bacillus polymyxa*, *Bacillus brevis*, *Bacillus cereus* e *Bacillus licheniformis*; e inúmeras espécies de bacilos são bem descritos como produtores tanto de amilases como de celulases, principalmente microrganismos obtidos de amostras de solo (DERCOVA et al., 1992).

As espécies do gênero *Bacillus* são os preferidos na indústria, já que são os mais produtivos (NIAZI et al., 2010). Nos processos industriais, as amilases utilizadas devem ser capazes de agir em condições de alta temperatura, pois o amido solúvel é um substrato que as amilases podem hidrolisar mais eficientemente do que o amido insolúvel, e a sua gelatinização só ocorre acima de  $70^{\circ}\text{C}$ , mais o processo ocorre a  $100^{\circ}\text{C}$ . A linhagem *B. licheniformis* consegue produzir amilases com alta eficiência nessas condições, com seu pico de produção enzimática em  $90^{\circ}$ , por isso é atualmente a mais explorada nesse processo (RICHARDSON; TAN; FREY et al., 2002; ADAMS, 1993). Apesar de não ter sido testadas em altas temperaturas, as enzimas detectadas neste trabalho, segundo o habitat da sua fonte, entre marés, supõem-se que suportam altas temperaturas. Todas as linhagens apresentaram atividade proteolítica em diferentes quantidades. Há um interesse adicional nas próteses de origem microbiana, pois estas são, em geral, mais estáveis que as homólogas de plantas e animais e o seu processo de produção é mais fácil (WISEMAN, 1991).

As linhagens com maiores valores da relação ao tamanho do diâmetro halo/colônia foram Ap 9, com 8,19; seguida das linhagens Ap 10, Ap1, Ap7; com valores de 5,40; 4,88 e 4,78; respectivamente. De todas as linhagens estudadas, destacam-se primeiramente Ap10, seguida de Ap9, pela sua versatilidade, pois mostraram serem capazes de metabolizarem diferentes substratos com grande eficácia. Há um destaque da linhagem Ap10:

seus resultados para atividade celulolítica foram uma relação halo/colônia de 7,33, praticamente o dobro das linhagens Ap1, Ap6, Ap9 ou Ap11; e, para atividade amilolítica, relação de 6,60, seguida em ordem decrescente pelas linhagens Ap9, Ap2, Ap8 e Ap6, com valores de 5,06; 3,5; 2,92 e 2,49, respectivamente; e o restante das linhagens com valores abaixo de 2. Para a linhagem Ap8, que mostrou dois halos com diferentes intensidades de coloração no teste de atividade celulolítica, ou seja, diferentes intensidades de degradação da celulose, o único halo considerado foi o mais externo.

As placas coradas com o Coomassie Brilliant Blue R-250 apresentaram halos de degradação enzimática muito evidentes, permitindo distinguir facilmente entre linhagens proteolíticas e não-proteolíticas. utilizar o Coomassie em metodologias como detecção e dosagem de proteínas, parece ser útil na coloração das placas ricas em proteína, formando um complexo corante-proteína que aparece com uma coloração azul intensa no meio com gelatina não degradada, e uma cor mais clara que reflete a ausência ou menor quantidade de proteínas. Algumas linhagens como Ap1, Ap2 ou Ap7, por exemplo, apresentaram resultados muito parecidos com os dois métodos. (4,88 de Ap1; 4,40 de Ap2 e 4,78 de Ap7, para Frazier e 5,1 de Ap1; 4,28 de Ap2 e 5,34 de Ap7, para Coomassie). Porém, outras como Ap4 ou Ap8 tiveram uma discrepância, com um valor da relação de 4,40 com Frazier e 2,28 com Coomassie, para a linhagem Ap4; e 2,38 com Frazier frente aos 4,00 com Coomassie, para Ap8. Estas diferenças nos valores não permitem observar exatamente mais eficácia de um método frente ao outro, e é necessário levar em conta que há diferenças entre cada repique realizado com cada linhagem, podendo haver diferenças decorrentes do modo de crescimento de cada uma, que pode resultar em diferenças de experimento para experimento. Em qualquer caso, foi comprovada a eficácia do Coomassie R-250.

## Conclusões

Com este trabalho foi possível isolar e caracterizar morfológicamente 10 linhagens associadas à um molusco, *Aplysia dactylomela*, todas as colônias isoladas e caracterizadas segundo coloração de Gram, se mostraram bacilos Gram positivos. Foram determinadas as atividades proteolíticas, amilolíticas e celulolíticas, de enzimas com potencial interesse biotecnológico. Foi comprovado que o corante azul de Coomassie oferece uma metodologia alternativa ao Frazier, com um menor custo econômico, menor impacto ambiental e com maior sensibilidade, capaz de detectar proteases extracelulares em meio com de 1 g de gelatina.

## Referências Bibliográficas

- ADAMS, M.W. Enzymes and proteins from organisms that grow near and above 100 degrees C. *Annu Rev Microbiol* 1993 Oct;47: 627e58.
- BANIK, R.M.; PRAKAS, M. Laundry detergent compatibility of the alkaline protease from *Bacillus cereus*. *Microbiol. Res.* 159, 135–140, 2004.
- CLARDY, J.; WALSH, C. T. *Nature*, 432, 829, 2004.
- DERCOBA, K.; AUGUSTIN, J.,; KRAJCOVA, D. Cell growth and  $\alpha$ -amylase production characteristics of *Bacillus subtilis*. *Folia Microbiol* 1992;37:17?/23.
- GONTANG, E. A.; FENICAL, W.; JENSEN, P. R. Phylogenetic Diversity of Gram-Positive Bacteria Cultured from Marine Sediments □ †. v. 73, n. 10, p. 3272–3282, 2007.
- KASANA, R. C. et al. A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using Gram's iodine. *Current Microbiology*, v. 57, n. 5, p. 503–507, 2008. MUSSATTO, S. I.; FERNANDES, M.; MILAGRES, A. M. M. Enzimas: Poderosa ferramenta na indústria. *Ciência Hoje*, São Paulo, v. 41 (242), p. 28-33, 2007.
- NAZI, M.; TEHREEMA, I.; ROMANA, T.; MUHAMMAD, J.S.; HUMAIRA, S.; SYED, Q.A.; IKRAM, H.  $\alpha$ -amylase Production by *Bacillus licheniformis* under Solid State Fermentation Conditions and its Cross Linking with Metalosalts to Confer Thermostability. *Int. J. Agric. Biol.*, 12: 793–795, 2010.
- PABEL, C.T.; VATER, J.; WILDE, C.; FRANKE, P.; HOFEMEISTER, J.; ADLER, B.; BRINGMANN, G.; HACKER, J. & HENTSCHEL, U. Antimicrobial activities and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of *Bacillus* isolates from the marine sponge *Aplysina aerophoba*. *Mar. Biotechnol.*, 5, 424-434, 2003.
- PANDEY, A.; NIGAM, P.; SOCCOL, C.; SOCCOL, V. T.; SINGH, D.; MOHAN, R. Advances in microbial amylases. *Biotechnol Appl Biochem*, 2000.
- RICHARDSON, T.H.; TAN, X.; FREY, G.; et al. A novel, high performance enzyme for

- starch liquefaction. Discovery and optimization of a low pH, thermostable alpha-amylase. *J Biol Chem* 2002 Jul; 277(29):26501e7
11. RODRIGUES, JULIANA GISELE CORRÊA, RAIANA SILVEIRA GURGEL, RAFAEL LOPES E OLIVEIRA, PATRÍCIA MELCHIONNA ALBUQUERQUE, AND SERGIO DUVOISIN JUNIOR. 2019. "Produção de Celulases Por Actinobactérias Cultivadas Em Diferentes Substratos." *Brazilian Journal of Development* 5 (7): 10636–46. <https://doi.org/10.34117/bjdv5n7-206>.
  12. SINGH, S.; MOHOLKAR, V. S.; GOYAL, A. Isolation, Identification, and Characterization of a Cellulolytic *Bacillus amyloliquefaciens* Strain SS35 from Rhinoceros Dung. *ISRN microbiology*, v. 2013, p. 728134, 2013.
  13. SURIYA, J., S. BHARATHIRAJA, M. KRISHNAN, P. MANIVASAGAN, AND S. K. KIM. 2016. *Marine Microbial Amylases: Properties and Applications. Advances in Food and Nutrition Research*. 1st ed. Vol. 79. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2016.07.001>.
  14. SMIBERT, R. M., KRIEG, N. R. Caracterização fenotípica. Em: GERHARDT, P., MURRAY, R. G., WOOD, W. A., KRIEG, N. R., (Editores). *Métodos para bacteriologia geral e molecular*. Sociedade Americana de microbiologia, Washington, D. C, pp. 607-654, 1994.
  15. WISEMAN, A. *Manual de biotecnologia de las enzimas*. Zaragoza: Acribia, 1991.