



UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADO
FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E
AMBIENTAIS

**Potencial Biotecnológico enzimático de Bactérias
Bioprospectadas de Solo do Cerrado**

Eduardo de Castro Almeida

Dourados

Mato Grosso do Sul

2024

Potencial Biotecnológico enzimático de Bactérias Bioprospectadas de Solo do Cerrado

Eduardo de Castro Almeida

Orientador: Profa. Dra. Maricy Raquel Lindenbah Bonfá

Trabalho de Conclusão de Curso
aprovado pela Banca Examinadora como
requisito parcial para obtenção do título
de Bacharel em Biotecnologia, da
Universidade Federal da Grande
Dourados.

Dourados

Mato Grosso do Sul

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

A447p Almeida, Eduardo De Castro
Potencial Biotecnológico enzimático de Bactérias Bioprospectadas de Solo do Cerrado
[recurso eletrônico] / Eduardo De Castro Almeida. -- 2024.
Arquivo em formato pdf.

Orientadora: Maricy Raquel Lindenbah Bonfá.
TCC (Graduação em Biotecnologia)-Universidade Federal da Grande Dourados, 2024.
Disponível no Repositório Institucional da UFGD em:
<https://portal.ufgd.edu.br/setor/biblioteca/repositorio>

1. Protease. 2. Amilase. 3. Xilanase. I. Bonfá, Maricy Raquel Lindenbah. II. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.

Potencial Biotecnológico enzimático de Bactérias Bioprospectadas de Solo do Cerrado

Por

Eduardo de Castro Almeida

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Aprovado em:

Documento assinado digitalmente
 **MARICY RAQUEL LINDENBAH BONFA**
Data: 19/03/2024 15:21:10-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof^ª. Dr. Maricy Raquel Lindenbah Bonfá
Orientador - UFGD/FCBA

Documento assinado digitalmente
 **FABIANA GOMES DA SILVA DANTAS**
Data: 19/03/2024 19:01:28-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr^ª. Fabiana Gomes da Silva Dantas
Membro da banca – UFGD/FCBA

Documento assinado digitalmente
 **RODRIGO MATHEUS PEREIRA**
Data: 19/03/2024 20:33:33-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Rodrigo Matheus Pereira
Membro da banca – UFGD/FCBA

Dedico aos meus pais,
Maria Helena e Sergio Luiz.

Agradecimentos

Agradeço à Universidade Federal da Grande Dourados, à Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais e a coordenação do curso de Biotecnologia.

Expresso agradecimento a todos os professores que tive ao longo da vida e aos conhecimentos que me passaram, em especial a minha orientadora professora doutora Maricy Raquel Lindenbah Bonfá.

À banca avaliadora deste trabalho, professora doutora Maricy Raquel Lindenbah Bonfá, doutora Fabiana Gomes da Silva Dantas e professor doutor Rodrigo Matheus Pereira.

Agradeço ao CNPq pelo apoio financeiro concedido durante a realização deste trabalho. Sua contribuição foi fundamental para o desenvolvimento desta pesquisa.

Agradeço aos meus pais, Vanessa Montalvão e tia Ninha, por todo apoio, dedicação e confiança que me deram. Sem vocês nada disso seria possível.

Agradeço também aos meus amigos Nathan Silva, João Ricardo, Henry Granado por toda amizade e apoio, a aos amigos que de alguma forma fizeram diferença na minha trajetória.

"As grades prendem homens, não ideias."

Djonga

"A ciência progride quando as observações nos forçam a mudar as nossas ideias preconcebidas."

Vera Rubin

"Nunca seja limitado pela imaginação limitada de outras pessoas."

Dr. Mae Jemison

"A educação é um ato político."

Paulo Freire

Resumo

Potencial Biotecnológico enzimático de Bactérias Bioprospectadas de Solo do Cerrado

Este estudo explora a riqueza biológica do Cerrado, o segundo maior bioma do Brasil, conhecido por sua biodiversidade. A pesquisa destaca a necessidade de conservação e exploração biotecnológica deste ecossistema, ameaçado pela expansão humana e conversão em monoculturas. O potencial do Cerrado na produção de enzimas para otimizar processos industriais é enfatizado, com foco em proteases, amilases e xilanases. Estas enzimas desempenham funções essenciais na degradação de substâncias tóxicas, tratamento de efluentes e biorremediação ambiental, encontrando aplicações em várias indústrias. O objetivo do estudo foi a bioprospecção de bactérias do solo do Cerrado com potencial biotecnológico. Amostras de solo foram coletadas em Alto Garças (MS) e submetidas a testes de cultivo para isolar bactérias produtoras dessas enzimas. A avaliação do potencial enzimático foi realizada através do Índice Enzimático (IE). Foram identificadas sete cepas produtoras de enzimas, todas com IE significativo, e as bactérias foram caracterizadas por meio de testes de coloração de Gram, KOH 3%, catalase e oxidase. Em conclusão, a bioprospecção das bactérias do solo do Cerrado destaca o potencial biotecnológico desse ecossistema, reforçando a necessidade de preservação e a importância de explorar as propriedades das enzimas para inovações industriais e ambientais.

Palavras-chave: Proteases, Amilases, Xilanases

Abstract

Enzymatic Biotechnological Potential of Bioprospected Bacteria from Cerrado Soil

This study explores the biological richness of the Cerrado, the second largest biome in Brazil, known for its biodiversity. The research highlights the need for conservation and biotechnological exploration of this ecosystem, threatened by human expansion and conversion into monocultures. The potential of the Cerrado in the production of enzymes to optimize industrial processes is emphasized, focusing on proteases, amylases, and xylanases. These enzymes perform essential functions in the degradation of toxic substances, effluent treatment, and environmental bioremediation, finding applications in various industries. The aim of the study was the bioprospecting of soil bacteria from the Cerrado with biotechnological potential. Soil samples were collected in Alto Garças (MS) and subjected to cultivation tests to isolate bacteria producing these enzymes. The evaluation of the enzymatic potential was carried out through the Enzymatic Index (EI). Seven enzyme-producing strains were identified, all with significant IE, and the bacteria were characterized by means of Gram staining, 3% KOH, catalase, and oxidase tests. In conclusion, the bioprospecting of bacteria from the Cerrado soil highlights the biotechnological potential of this ecosystem, reinforcing the need for preservation and the importance of exploring the properties of enzymes for industrial and environmental innovation.

Keywords: Proteases, Amylases, Xylanases

Sumário

1.	Introdução	11
2.	Revisão de literatura.....	12
2.1.	Bioprospecção.....	12
2.2.	Cerrado brasileiro	14
2.3.	Enzimas de interesse comercial.....	17
2.4.	Proteases	21
2.5.	Amilases.....	23
2.6.	Xilanases.....	25
3.	Objetivo geral.....	27
3.1.	Objetivos específicos	27
4.	Material e métodos	28
4.1.	Resumo gráfico	28
4.2.	Amostragem do solo	29
4.3.	Isolamento de bactérias com potencial enzimático.....	29
5.	Resultado	31
5.1.	Bactérias Isoladas	31
5.2.	Determinação do potencial enzimático	32
6.	Discussão.....	34
7.	Conclusão	35
8.	Referências.....	36

1. Introdução

A sociedade contemporânea, marcada pelo paradigma capitalista, enfrenta desafios ambientais significativos decorrentes do consumo exacerbado de recursos e da produção crescente de resíduos, ameaçando a sustentabilidade do planeta e a rica diversidade biológica. Nesse contexto desafiador, a “Química Verde” emerge como uma resposta inovadora, concentrando-se na prevenção da emissão de resíduos tóxicos e na otimização do uso de recursos, oferecendo soluções promissoras para os dilemas ambientais.

Este trabalho se propõe a explorar a interseção entre a “Química Verde” e a biotecnologia, destacando a relevância dessa convergência na busca por práticas industriais mais sustentáveis. O cenário atual da indústria, adaptando-se às legislações ambientais, evidencia uma transição crucial na abordagem de produção, que não apenas visa à eficiência econômica, mas também à responsabilidade ambiental.

No âmbito da biotecnologia, como ferramenta essencial nesta transição, há um interesse particular na bioprospecção de bactérias isoladas do solo do Cerrado brasileiro. Este bioma, o segundo maior do país, apresenta uma biodiversidade única e é crucial para nossa pesquisa, uma vez que desejamos avaliar o potencial biotecnológico desses microrganismos no contexto da produção de enzimas de interesse industrial.

O foco central deste estudo recai sobre a avaliação do índice enzimático das bactérias isoladas, compreendendo sua capacidade de produzir enzimas com aplicações práticas na indústria. Este aspecto visa não apenas aprofundar a compreensão da diversidade microbiana do Cerrado, mas também a identificar bactérias que possam vir a ser recursos valiosos para a produção de enzimas.

Ao abordar a aplicação pragmática das enzimas em processos industriais, ressaltamos a imperatividade da bioprospecção em ambientes caracterizados por condições adversas de temperatura, pH, salinidade e disponibilidade de nutrientes. Esta ênfase se justifica pela significativa vantagem que a utilização de enzimas naturalmente adaptadas a essas condições pode conferir aos

processos industriais, promovendo maior eficiência operacional e otimização econômica.

Ademais, este estudo também reconhece a oportunidade estratégica que o Brasil possui no mercado global de enzimas. Ao explorar o potencial biotecnológico do solo do Cerrado, almejamos não apenas contribuir para o conhecimento científico, mas também acentuar a capacidade distintiva do país de se tornar líder na produção enzimática em escala internacional.

Apresentar uma base sólida para futuras pesquisas e estimular a implementação prática de abordagens sustentáveis na indústria brasileira são objetivos fundamentais deste trabalho. Por meio da bioprospecção bacteriana no solo do Cerrado, buscou-se oferecer uma contribuição significativa para a compreensão da diversidade microbiana do Cerrado e seu potencial para a produção de enzimas industriais.

2. Revisão de literatura

2.1. Bioprospecção

A bioprospecção configura-se como uma abordagem científica de elevado valor, orientada à pesquisa e exploração de microrganismos em ecossistemas complexos, dotados de características distintivas, visando oferecer soluções para desafios cotidianos. A totalidade da extensa comunidade microbiana ainda não foi exaustivamente examinada pela humanidade, destacando a crucial necessidade de investigar esses elementos para a compreensão de suas propriedades e potencialidades científicas (Bernal 2020; Procópio and Barreto 2021).

Desde tempos remotos, os seres humanos têm se utilizado da natureza circundante como fonte primordial de alimento, remédios, energia e outros recursos valiosos. Com o progresso científico, a biotecnologia emergiu como uma disciplina de alta complexidade tecnológica, incorporando a manipulação genética e o desenvolvimento de organismos dotados de novas formas e funções. Contudo, a pesquisa biotecnológica evoluiu para uma perspectiva mais ampla, desempenhando um papel significativo na conversão de recursos provenientes da biodiversidade em produtos e processos de valor industrial e comercial, beneficiando diversas áreas cruciais (Alves, 2018; Bernal, 2020).

No contexto delineado, a bioprospecção alinha-se de maneira intrínseca com a biotecnologia, abrangendo a exploração da biodiversidade em busca de novos recursos de relevância social e econômica. A diversidade dos microrganismos existentes assume a configuração de um reservatório de recursos, propiciando a identificação de espécies dotadas de características singulares e potencialidades distintas. Essa prática tem contribuído de maneira significativa para o progresso do conhecimento em diversas problemáticas biológicas contemporâneas (Alves, 2018; Bernal, 2020).

Os microrganismos desempenham uma função primordial na ciclagem de elementos no ecossistema terrestre, exercendo influência tanto em substratos orgânicos quanto minerais. Suas atividades metabólicas são cruciais para os processos biogeoquímicos, notadamente nos ciclos do carbono, nitrogênio e enxofre, desempenhando papéis significativos como produtores e decompositores nas cadeias alimentares. A biosfera depende intrinsecamente dessas atividades microbianas, embora muitas de suas funções ainda não tenham sido completamente compreendidas (Alves, 2018).

A compreensão dessa diversidade microbiana é de suma importância, uma vez que os microrganismos representam aproximadamente 60% da biomassa total do planeta. A notável riqueza observada entre os procariotos, os organismos mais antigos e abundantes, é o resultado de bilhões de anos de evolução, resultando em características fisiológicas heterogêneas e uma ampla gama de possibilidades (Alves, 2018; Bernal, 2020).

A bioprospecção, portanto, visa à prospecção de compostos bioativos provenientes de fontes biológicas, apresentando potencial econômico aplicável a diversos setores industriais, tais como farmacêutica, agricultura, aquicultura, biorremediação, bioenergia e nanotecnologia. Diferentes ambientes, como solos de florestas, ambientes marinhos, sedimentos na Antártida e solos vulcânicos, têm revelado microrganismos produtores de metabólitos de interesse biotecnológico (Alves, 2018; Bernal, 2020).

Com a instauração da Convenção sobre a Diversidade Biológica (CDB) em 1993, os recursos biológicos passaram a ser considerados patrimônio dos países signatários, incluindo o Brasil. Neste contexto, o Brasil, reconhecido por

sua extraordinária biodiversidade, detém um vasto potencial a ser explorado, com a bioprospecção ganhando crescente destaque. No entanto, os recursos naturais brasileiros ainda carecem de uma exploração mais abrangente (Alves, 2018).

Dentre os compostos bioativos identificados por meio da bioprospecção, as enzimas destacam-se, devido à sua significativa importância e versatilidade de aplicação em diversos setores industriais. O papel fundamental das enzimas em processos biotecnológicos possibilita a produção de uma variedade de produtos contribuindo para o bem-estar da sociedade (Alves, 2018; Procópio e Barreto, 2021).

Em resumo, a bioprospecção de microrganismos emerge como uma área essencial no âmbito da biotecnologia, voltada para a exploração da biodiversidade com o propósito de identificar recursos de elevado valor. Os microrganismos, enquanto agentes preponderantes na ciclagem de elementos na Terra, ostentam um vasto potencial metabólico, e a exploração criteriosa desses organismos pode conduzir ao desenvolvimento de produtos e processos inovadores, com impactos positivos significativos na vida, saúde e bem-estar da humanidade. O Brasil, dotado de uma biodiversidade exuberante, apresenta perspectivas promissoras nesse domínio, e a pesquisa e desenvolvimento de enzimas representam uma das aplicações mais destacadas dessa abordagem biotecnológica (Alves 2018; Bernal 2020).

2.2. Cerrado brasileiro

O Cerrado, reconhecido como as savanas brasileiras, representa o segundo maior bioma do Brasil, abarcando uma extensão aproximada de 2 milhões de km², ficando apenas atrás da Amazônia. Este bioma, que ocupa um quarto do território brasileiro, alberga uma das mais expressivas biodiversidades do planeta (Procópio e Barreto, 2021; Santos, 2019; Vale et al., 2004).

A vegetação do Cerrado se caracteriza por uma variedade de formações, que vão desde campos até formações florestais, exibindo diferentes níveis de espécies caducifólias. As formações mais notáveis englobam os "campos limpos" e "campos sujos", prados com arbustos de pequeno porte e árvores dispersas, o "Cerrado stricto sensu", uma savana típica, e o "cerradão" ou

"Cerrado denso", uma floresta decídua. Adicionalmente, matas de galeria são encontradas esporadicamente ao longo de córregos, abrangendo cerca de 5% da área total do bioma (De Donato et al., 2019; Procópio e Barreto, 2021; Santos, 2019).

Os solos do Cerrado geralmente são caracterizados como ácidos e carentes em nutrientes, apresentando elevados teores de alumínio e baixas quantidades de cátions trocáveis, como cálcio, magnésio e potássio. A marcante sazonalidade das chuvas, caracterizada por um período chuvoso seguido por uma estação seca prolongada, contribui para o intenso intemperismo do solo, tornando a disponibilidade de nutrientes, como carbono, nitrogênio e fósforo, a principal limitação para o crescimento vegetal (De Donato et al., 2019; Procópio e Barreto, 2021; Santos, 2019).

As plantas do Cerrado desenvolveram mecanismos eficazes para minimizar a perda de nutrientes, resultando na produção de serapilheira com elevadas relações C:N e C:P, e baixas taxas de decomposição (Procópio e Barreto, 2021).

O Cerrado é composto por três tipos essenciais de vegetações: florestais, campestres e savanas, sendo estas últimas as mais prevalentes. A vegetação desse bioma detém considerável interesse econômico, especialmente no setor agrícola, onde vastas áreas de terra apresentam potencial para cultivo de grãos (Procópio e Barreto, 2021; Santos, 2019).

Contudo, a expansão das atividades humanas, incluindo a conversão de áreas naturais para monoculturas e pastagens, tem representado uma ameaça à preservação desse bioma significativo. A substituição da vegetação nativa por extensas plantações de grãos tem ocasionado alterações ambientais marcantes e impactado a ocorrência e o comportamento das comunidades microbianas originais (Procópio e Barreto, 2021; Santos, 2019).

Dada sua elevada biodiversidade, riqueza biológica e alto grau de endemismo, o Cerrado é reconhecido como uma área prioritária para a conservação da biodiversidade. A manutenção desse bioma é essencial para assegurar a preservação de seus ecossistemas singulares, contribuindo para a

sustentabilidade ambiental e o bem-estar da sociedade (Procópio e Barreto, 2021; Santos, 2019).

A biodiversidade dos microrganismos no solo do Cerrado brasileiro desempenha papel crucial nas principais funções ambientais desse ecossistema. Os microrganismos exercem funções essenciais nos ciclos biogeoquímicos, na fertilidade do solo, na saúde das plantas e na remediação da poluição antropogênica. Representando um terço da biomassa da Terra, sua relevância na manutenção da vida no planeta é incontestável (Inkotte et al., 2019; Procópio e Barreto, 2021; Santos, 2019).

Esses microrganismos demonstram notável plasticidade genética e fisiológica, permitindo-lhes adaptar-se às diversas condições ambientais do Cerrado. No entanto, apesar de sua resiliência inata, o microbioma do solo é influenciado por vários fatores físico-químicos, como pH, textura, matéria orgânica e disponibilidade de nutrientes, além de condições ambientais, como sazonalidade das chuvas, tipo de vegetação e temperatura. Esses fatores moldam as comunidades microbianas presentes no solo, impactando suas funções e atividades (Procópio e Barreto, 2021; Santos, 2019).

Nos últimos anos, uma série de estudos tem revelado a diversidade microbiana presente no Cerrado, especialmente por meio de técnicas metagenômicas e sequenciamento genético. A análise dos grupos taxonômicos tem proporcionado insights sobre a participação desses microrganismos nos ciclos de carbono, nitrogênio e fósforo, assim como sua resiliência diante das alterações decorrentes do uso do solo e da perda de cobertura vegetal (Procópio e Barreto, 2021; Santos, 2019; Vale et al., 2004).

A presença de Acidobacteria, Actinobacteria, Proteobacteria e Verrucomicrobia tem sido amplamente identificada nos solos de savanas do Cerrado. Notavelmente, membros dos gêneros *Bradyrhizobium*, *Azospirillum* e *Rhizobium* têm sido associados tanto a ambientes nativos quanto a áreas impactadas pelo uso da terra. Esses microrganismos desempenham papéis fundamentais na fixação de nitrogênio no solo e na promoção do crescimento das plantas (Napolitano et al., 2016; Procópio e Barreto, 2021; Santos, 2019).

Essa rica diversidade microbiana do solo do Cerrado está intimamente relacionada à variedade de espécies vegetais presentes nesse bioma. Os microrganismos contribuem para a liberação gradativa de matéria orgânica e nutrientes, fundamentais para a saúde e desenvolvimento das plantas. Em contrapartida, a cobertura vegetal e as características do solo influenciam a atividade e a ocorrência desses microrganismos (Procópio e Barreto, 2021; Santos, 2019).

A imensa riqueza de microrganismos do solo do Cerrado oferece uma oportunidade promissora para a bioprospecção. Essa prática envolve o isolamento e armazenamento de microrganismos de interesse através de métodos de cultivo específicos. A bioprospecção dessas amostras do solo do Cerrado pode levar a descobertas valiosas para a ciência, contribuindo para o aprofundamento do conhecimento sobre suas relações com o ambiente, fauna e flora. Além disso, a bioprospecção tem grande potencial biotecnológico, permitindo a obtenção de bens e produtos com aplicações industriais e médicas (Napolitano et al., 2016; Procópio e Barreto, 2021; Santos, 2019).

Em suma, a biodiversidade microbiana do solo do Cerrado brasileiro desempenha um papel vital na sustentabilidade ecológica desse importante bioma. Suas características únicas e potencial biotecnológico tornam esses microrganismos alvos essenciais de estudos científicos e aplicações práticas, visando a conservação e aproveitamento sustentável desse ecossistema exuberante (Procópio e Barreto, 2021; Santos, 2019).

2.3. Enzimas de interesse comercial

A busca por práticas industriais sustentáveis é uma tendência em ascensão em escala global. O avanço na área da enzimologia tem destacado, nos últimos anos, o papel das enzimas como catalisadoras de reações bioquímicas específicas. Enzimas, macromoléculas biológicas presentes em animais, plantas e microrganismos, desempenham um papel crucial na orquestração e aceleração de reações metabólicas essenciais (Campos e Oliveira, 2020; Espinola, 2020).

A propriedade mais distintiva das enzimas é sua capacidade de catalisar reações químicas. Elas agem diminuindo a energia de ativação necessária para

que uma reação ocorra, acelerando assim a conversão do substrato em produto. A ação catalítica das enzimas é indispensável, pois muitas reações vitais para o metabolismo celular seriam tão lentas a ponto de comprometer a sobrevivência dos organismos vivos. É importante observar que, embora nem todas as reações dependam das enzimas para ocorrer, a presença delas é crucial para a eficiência dos processos bioquímicos (Alves, 2018; Bernal, 2020; Campos e Oliveira, 2020).

As enzimas são predominantemente de natureza proteica. O sítio ativo da enzima é a região que contém o resíduo catalítico, responsável por se ligar ao substrato e facilitar a reação química. Essa região é influenciada pela estrutura tridimensional dos aminoácidos que compõem a cadeia e pela conformação do substrato. Essa especificidade estrutural é o que confere a cada enzima alta seletividade para um único tipo de substrato (Alves, 2018; Bernal, 2020; Campos e Oliveira, 2020).

A adaptação dos organismos a mudanças ambientais desempenha um papel crucial na diversidade enzimática. Variações nas condições químicas do ambiente conduzem à inovação, troca ou transferência de funções enzimáticas, ampliando assim a diversidade de reações que podem ser catalisadas pelos organismos (Alves, 2018).

Desde os primórdios da história humana, as enzimas desempenharam um papel crucial em diversos processos de manufatura de alimentos e na indústria têxtil. A tecnologia de fermentação, desenvolvida progressivamente, possibilitou a caracterização e produção em larga escala dessas enzimas, provenientes de microrganismos criteriosamente selecionados (Alves, 2018; Campos e Oliveira, 2020).

No âmbito biotecnológico, os catalisadores biológicos têm conquistado espaço em relação aos catalisadores químicos nas reações de conversão química. Esses catalisadores reduzem a energia de ativação necessária para as reações e aumentam sua velocidade. Ademais, apresentam diversas vantagens, tais como a operação em condições mais suaves, a compatibilidade com substratos sintéticos, a capacidade de catalisar tanto reações de síntese quanto

de degradação, além de exibirem alta seletividade para certos tipos de reações e substratos (Alves, 2018; Bernal, 2020; Campos e Oliveira, 2020).

No cenário industrial, as enzimas produzidas por bactérias termotolerantes e termofilias ganham relevância na prospecção biotecnológica. Essas enzimas apresentam adaptações em sua conformação e composição que conferem maior resistência a temperaturas elevadas, evitando a desnaturação em tais condições e, por conseguinte, mantendo sua atividade catalítica. Essa característica é particularmente vantajosa, considerando que muitos processos industriais e biotecnológicos ocorrem em condições de temperaturas ou pH extremos. A utilização de enzimas naturalmente adaptadas a essas condições torna os processos mais econômicos e eficientes (Alves, 2018; Campos e Oliveira, 2020; Espínola, 2020).

A aplicação dessas enzimas assegura eficiência comparável aos processos naturais, além de reduzir ou eliminar os riscos ambientais associados a dejetos ou efluentes gerados na produção industrial. Adicionalmente, elas desempenham funções cruciais, como a biodegradação de compostos tóxicos, o tratamento de efluentes e a biorremediação ambiental (Alves, 2018; Campos e Oliveira, 2020; Espínola, 2020).

Neste contexto, a acessibilidade da produção em larga escala, a habilidade de exocitose, o custo reduzido em curto prazo, a resistência em ambientes adversos e a capacidade de expressão e síntese de enzimas recombinantes em organismos hospedeiros conferem um elevado apelo a essas enzimas para uma gama diversificada de usos industriais (Alves, 2018; Bernal, 2020).

O contínuo avanço na pesquisa e desenvolvimento de enzimas promete transformar ainda mais a indústria, impulsionando a busca por soluções mais sustentáveis, eficientes e seguras. A utilização de enzimas como catalisadores biológicos representa um caminho promissor para promover a sustentabilidade nos processos industriais, garantindo um futuro mais equilibrado entre a atividade humana e a preservação do meio ambiente. A adoção crescente dessas proteínas na indústria constitui um passo significativo rumo a um futuro mais responsável e harmonioso com a natureza (Alves, 2018; Bernal, 2020).

O Brasil, com sua vasta diversidade biológica e variados ecossistemas, possui um enorme potencial biotecnológico para explorar o mercado enzimático. O cenário mundial é extremamente favorável para lucrar neste mercado, como evidenciado por Papadaki et al. (2020), que indicou um valor expressivo de US\$ 7,1 bilhões em 2017 para o mercado global de enzimas, com previsões sugerindo que o mercado atingirá US\$ 10,5 bilhões até 2024.

A Europa desempenhou um papel significativo, representando aproximadamente um terço da produção global de enzimas em 2017, com cerca de 70% dessa participação de mercado proveniente de microrganismos. Zhang, Rui, and Simpson (2021) também destacaram o potencial de crescimento do setor, com a indústria mundial de enzimas alimentares avaliada em cerca de US\$ 2,4 bilhões em 2019, com perspectivas indicando uma estimativa em torno de 3,2 bilhões até 2025.

No entanto, apesar deste cenário promissor, o Brasil ainda não está explorando plenamente seu potencial. Em conformidade com o site Observatory of Economic Complexity (2023), em 2021, o país ocupou a sexta posição entre os países que mais importaram enzimas, resultando em um gasto de US\$ 227 milhões, enquanto exportou apenas US\$ 52,2 milhões em enzimas no mesmo ano, gerando um déficit comercial de \$174,8 milhões no mercado enzimático.

Dentro desse amplo espectro de enzimas, destacam-se as proteases, amilases e xilanases devido às suas propriedades distintas. As proteases, por exemplo, são responsáveis por quebrar ligações peptídicas, encontrando aplicações relevantes nas indústrias alimentícia e de detergentes. Já as amilases têm a capacidade de hidrolisar amido, sendo utilizadas em diversos setores como alimentos, bebidas, biocombustíveis e na indústria têxtil. Por sua vez, as xilanases atuam na quebra de xilanas, desempenhando um papel essencial na indústria de papel e celulose, além de serem aplicadas na produção de ração animal (Alves, 2018; Bernal, 2020; Campos e Oliveira, 2020; Espínola, 2020).

A aplicação dessas enzimas na indústria contribui significativamente para a adoção de práticas mais sustentáveis. Seu emprego em processos industriais ecológicos propicia a redução de impactos ambientais adversos, uma vez que catalisam reações com elevada especificidade e eficiência, permitindo a

fabricação de alimentos, produtos têxteis e papéis com menor produção de resíduos e efluentes poluentes. Além disso, essas enzimas possuem o potencial de contribuir para a biodegradação de compostos tóxicos, o tratamento de efluentes e a biorremediação ambiental (Alves, 2018; Campos e Oliveira, 2020).

2.4. Proteases

As proteases, eminentes pela sua especialização, desempenham um papel central na hidrólise de ligações peptídicas em substratos proteicos, culminando na fragmentação de proteínas em aminoácidos e peptídeos menores. Essas enzimas estão amplamente disseminadas na natureza, exercendo funções cruciais em diversos processos biológicos. Podem ser categorizadas em dois grupos predominantes: as endopeptidases, que atuam internamente nas ligações peptídicas, subdividindo-se em quatro grupos principais com base no mecanismo de ação - serina protease, cisteína protease, aspártica protease e metaloprotease. Cada grupo possui um resíduo de aminoácido específico na região ativa do sítio catalítico, interagindo com o substrato proteico durante a reação de hidrólise (Alves, 2018; Bernal, 2020; Campos e Oliveira, 2020; Espínola, 2020).

Por sua vez, as exopeptidases, que atuam nas extremidades da cadeia polipeptídica, subdividem-se em aminopeptidase e carboxipeptidase, dependendo do sítio de ação na cadeia peptídica. A especificidade dessas exopeptidases é determinada pela presença de diferentes grupos funcionais nos resíduos de aminoácidos nas extremidades das proteínas (Alves, 2018; Bernal, 2020).

A produção de proteases é observada em diversos organismos, incluindo animais, plantas e microrganismos, sendo estes últimos destacados na indústria devido à sua facilidade de manipulação, altas taxas de produção e liberação para o meio extracelular. Entre os microrganismos produtores de proteases, as bactérias desempenham um papel proeminente. Gêneros bacterianos como *Bacillus*, *Alcaligenes*, *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Halomonas*, *Arthrobacter* e *Serratia* apresentam relevância na produção industrial dessas enzimas, cada um produzindo proteases com características específicas para atuarem em condições físico-químicas particulares, como tolerância a solventes orgânicos,

atuação em meio básico ou em ambientes salinos, como no caso das proteases halofílicas (Alves, 2018; Bernal, 2020; Campos e Oliveira, 2020).

As aplicações biotecnológicas das proteases são vastas e diversificadas. Na indústria de detergentes, as proteases microbianas têm destaque, sendo incorporadas como aditivos para aumentar a eficácia na remoção de manchas de proteínas presentes em roupas. Essas enzimas possuem a capacidade de quebrar manchas resistentes de alimentos, suor e outras fontes proteicas, tornando os detergentes mais eficientes em lavagens a baixas temperaturas (Alves, 2018; Campos e Oliveira, 2020; Espínola, 2020).

Outra aplicação industrial relevante ocorre na produção de queijos e na fabricação de pães, onde as proteases são empregadas na coagulação do leite para a produção de queijo e na melhoria da textura e maciez das massas de pães. Adicionalmente, essas enzimas desempenham papel crucial na fabricação de cerveja, contribuindo para a clarificação de cereais durante o processo de fermentação (Alves, 2018).

Na esfera da biotecnologia, as proteases desempenham um papel significativo na formulação de biofármacos, destinados a facilitar o processamento e a maturação de proteínas terapêuticas. Sua atividade específica é crucial para assegurar o correto processamento das proteínas, resultando na conformação funcional desejada (Santos, 2009).

A indústria têxtil, por sua vez, se beneficia amplamente das proteases, especialmente no processo de curtimento de couro animal. Estas enzimas são empregadas para remover material colagenoso residual das peles, aprimorando a maciez e a qualidade do couro produzido. Além disso, as proteases têm sido utilizadas no bioprocessamento de filmes de raio-X, possibilitando a recuperação do metal Prata. No tratamento de efluentes industriais, essas enzimas desempenham um papel crucial na degradação de resíduos orgânicos complexos (Alves, 2018; Espinola, 2020; Santos, 2009).

A crescente demanda por proteases na indústria tem impulsionado a busca por enzimas mais específicas, capazes de atuar em determinados substratos sem interferir em outros, e com características bem definidas para as aplicações desejadas. Dentro desse contexto, as proteases bacterianas têm se

destacado em relação às proteases de outras origens, como leveduras, fungos, plantas e animais. Sua facilidade de produção em larga escala, termoestabilidade e ampla faixa de pH de atuação conferem vantagens significativas (Alves, 2018; Bernal, 2020).

No que concerne à produção de proteases bacterianas, essas enzimas podem ser intracelulares, desempenhando funções em processos metabólicos como diferenciação celular, esporulação e maturação enzimática, ou extracelulares, catalisando a hidrólise de proteínas presentes no meio e sendo, posteriormente, absorvidas e utilizadas pelas próprias células bacterianas (Alves, 2018; Bernal, 2020).

Em resumo, as proteases constituem uma classe versátil de enzimas com uma ampla gama de aplicações nas esferas industrial e biotecnológica. A produção destas a partir de bactérias tem se mostrado particularmente relevante, dada a facilidade de obtenção, termoestabilidade e adaptabilidade a diversas condições físico-químicas. O contínuo progresso na pesquisa biotecnológica sugere que novas proteases, com propriedades específicas e aplicáveis em diversos setores industriais, continuarão a ser descobertas e desenvolvidas (Alves, 2018; Bernal, 2020).

2.5. Amilases

As amilases desempenham um papel crucial na hidrólise das ligações α -1,4 e α -1,6 presentes no amido, glicogênio e sacarídeos derivados. Podem ser derivadas de fontes vegetais, animais ou microbianas, sendo as amilases microbianas especialmente destacadas na indústria devido à sua fácil manipulação em laboratório, alta capacidade de produção em larga escala e maior estabilidade. Com aplicações multifacetadas, essas enzimas desempenham uma função fundamental na fabricação de produtos derivados de fermentação, na produção de detergentes e insumos têxteis (Campos e Oliveira, 2020).

Do ponto de vista bioquímico, o amido é um polissacarídeo composto por dois polímeros principais: amilose e amilopectina. A amilose, um polímero linear, é composta por mais de 6000 unidades de glicose, unidas por ligações α -1,4-glicosídicas. Por outro lado, a amilopectina consiste em cadeias lineares de 10-

60 unidades de glicose, conectadas por ligações α -1,4, e cadeias ramificadas de 15-20 unidades de glicose, unidas por ligações α -1,6 (Alves, 2018).

As amilases podem ser categorizadas em quatro grupos distintos com base em seu mecanismo de ação. O primeiro grupo inclui as endo-hidrolases, como a α -amilase, que realiza a hidrólise das ligações α -1,4-glicosídicas internas do amido, resultando na formação de glicose e maltose. O segundo grupo abrange as exo-hidrolases, que atuam nas extremidades não-redutoras da cadeia polissacarídica. Esse grupo engloba enzimas como a β -amilase, α -glicosidase e amiloglicosidase/glicoamilase, cada uma gerando produtos distintos durante a hidrólise do amido (Alves, 2018; Espínola, 2020).

O terceiro grupo de amilases é composto pelas desramificases, que incluem as isoamilases e pululanases, responsáveis pela remoção das ramificações do amido ao quebrar as ligações α -1,6 glicosídicas. Por fim, o último grupo corresponde às transferases, que clivam ligações α -1,4 glicosídicas e transferem parte dessa molécula para um aceptor, originando uma nova ligação glicosídica, como ocorre no caso das ciclo dextrinas (Alves, 2018).

A produção de amilases por microrganismos exibe considerável variação entre diferentes espécies, linhagens e condições de cultivo. Fatores como pH, temperatura, fonte de carbono e nitrogênio exercem influência sobre o processo fermentativo de produção de amilases. Bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus*, como *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. stearothermophilus* e *B. amyloliquefaciens*, têm sido objeto de extenso estudo e utilização devido à sua capacidade de produzir amilases termoestáveis na indústria (Alves, 2018).

Além de sua habilidade em operar em temperaturas elevadas, essas enzimas também demonstram eficácia na presença de sais, conferindo vantagens para diversas aplicações industriais. As amilases halofílicas, provenientes de bactérias isoladas de ambientes marinhos, como *Marinobacter* sp. e *Rhodothermus marinus*, têm sido alvo de investigações para aplicações específicas (Alves, 2018).

As amilases desempenham um papel essencial em diversos setores industriais. Em particular, sua contribuição é crucial na produção de glicose e frutose por meio da conversão do amido. A indústria de papel também se

beneficia da atuação dessas enzimas, especialmente na modificação e produção de amido de baixo peso molecular e baixa viscosidade (Alves, 2018; Espínola, 2020).

Adicionalmente, as amilases têm uma presença marcante na indústria de alimentos processados, onde são incorporadas durante o processo de cozimento para a produção de bolos, suco de fruta e xarope de amido. Na indústria têxtil, essas enzimas desempenham um papel crucial na remoção do amido, facilitando os processos de tingimento e acabamento têxtil (Alves, 2018; Espínola, 2020).

Outra aplicação significativa das amilases é na produção de etanol a partir do amido, que se destaca como um substrato excelente devido ao baixo custo e fácil disponibilidade. Com o contínuo avanço da biotecnologia e a descoberta de novas fontes de amilases, espera-se que a utilização dessas enzimas nas indústrias continue a crescer para atender à crescente demanda nos setores manufatureiros (Alves, 2018; Espínola, 2020).

2.6. Xilanases

A xilana é o segundo polissacarídeo mais prevalente na natureza, encontrando-se em madeiras duras e plantas anuais. Representando cerca de um terço das fontes orgânicas renováveis de carbono no planeta, sua abundância é equiparável à celulose. A estrutura da xilana é notavelmente variável entre as plantas, consistindo em cadeias homopoliméricas compostas por subunidades de β -(1,4)-D-xilose, frequentemente ornamentadas com cadeias laterais de α -L-arabinosil e α -D-glucuronosil (Alokika and Singh, 2019; Chakdar et al., 2016).

Com base na composição e nas diferentes ligações presentes, as xilanas podem ser agrupadas em quatro famílias principais:

- a) Arabinoxilanos (AX): Apresentam cadeias laterais compostas por subunidades de α -L-arabinofuranosil;
- b) Glucuronoxilanos (GX): Contêm ácido α -D-glucurônico e seu derivado éter metílico na posição 4;
- c) Glucuroarabinoxilanos (GAX): Compostos por unidades de α -L-arabinose e ácido α -D-glucurônico;

- d) Galactoglucuronarabinoxilanos (GGAX): Exibem resíduos de β -D-galactopiranosose em cadeias laterais complexas de oligossacarídeos.

Devido à heterogeneidade e complexidade da xilana, a hidrólise completa desse polissacarídeo requer uma variedade de enzimas que atuam de maneira cooperativa, sendo denominadas xilanases (Chakdar et al., 2016).

As xilanases desempenham um papel crucial na degradação da xilana. Essas enzimas apresentam ampla distribuição na natureza e têm sido extensivamente estudadas em diversos campos devido à sua importância em processos industriais, biotecnológicos e na degradação da biomassa (Chakdar et al., 2016; Kumar, Yaashikaa, and Saravanan, 2018).

Essas proteínas possuem uma ampla gama de aplicações industriais e biotecnológicas e estão amplamente distribuídas pela natureza. Desempenhando um papel crucial na indústria, tendo sua exploração comercial bem documentada em setores como alimentício, de ração, papel e celulose. Sendo amplamente utilizadas para degradar resíduos de plantas lignocelulósicas, como palha, a fim de produzir bioetanol e outros biocombustíveis de forma mais eficiente. Além disso, a aplicação de xilanases também se estende à recuperação de açúcares a partir de resíduos agrícolas, tornando a produção de biocombustíveis mais sustentável e econômica (Kumar et al. 2018).

Sua combinação com outras enzimas como glucanase, amilase, celulose e pectinase abrem caminho para diversas aplicações na produção de alimentos de padaria, biscoitos e bolachas. O entusiasmo em relação à xilanase é evidente, seja como suplemento na alimentação animal, na fabricação de alimentos e bebidas, na produção de materiais, no branqueamento de celulose ou na produção de xilitol (Burlacu, Israel-Roming, and Cornea 2016; Kumar et al. 2018).

Ao utilizar xilanases, é possível aprimorar significativamente a economia geral do processamento de materiais lignocelulósicos, gerando combustíveis líquidos e produtos químicos de forma mais sustentável e ecologicamente responsável. Isso mostra que a aplicação dessas enzimas é fundamental para

impulsionar a indústria rumo a um futuro mais verde e eficiente (Burlacu et al. 2016; Kumar et al. 2018).

Diversos organismos, como fungos, bactérias, leveduras, algas marinhas, protozoários, caramujos, crustáceos, insetos e sementes, foram identificados como produtores de xilanases. Na esfera industrial, os fungos filamentosos se destacam, devido à sua eficiente produção e secreção de grandes quantidades dessa enzima no meio de cultivo, superando leveduras e bactérias nesse aspecto. No entanto, recentemente, surgiu uma crescente demanda por novas enzimas provenientes de bactérias, visando ampliar as opções e aplicações industriais dessa relevante classe de enzimas (Alves 2018; Chakdar et al., 2016).

Bactérias, como *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp. e *Streptomyces* sp., têm se destacado como fontes promissoras de xilanases devido às suas características vantajosas. Essas enzimas bacterianas demonstram eficiência em uma ampla faixa de pH (5 a 9) e alcançam sua temperatura ótima entre 35°C e 60°C. Pesquisas com *Bacillus* spp. revelaram maior atividade em pH alcalino e altas temperaturas, tornando-as atrativas para aplicações industriais devido à alcaloestabilidade e termoestabilidade (Alves 2018; Burlacu et al., 2016; Chakdar et al., 2016).

Enquanto as xilanases fúngicas preferem meios ácidos, as bacterianas apresentam um pH ótimo neutro ou alcalino, eliminando a necessidade de etapas adicionais durante o processo de downstream. Além disso, as bactérias têm a capacidade de produzir exclusivamente xilanases, ao contrário dos fungos que produzem simultaneamente xilanases e celulases, o que acarreta em custos adicionais de purificação (Alves 2018; Burlacu et al., 2016; Chakdar et al., 2016).

3. Objetivo geral

O presente estudo teve como objetivo a bioprospecção de bactérias na amostra de solo do Cerrado provenientes de Alto Garças-MT, a fim de avaliar o potencial biotecnológico das bactérias isoladas neste ambiente.

3.1. Objetivos específicos

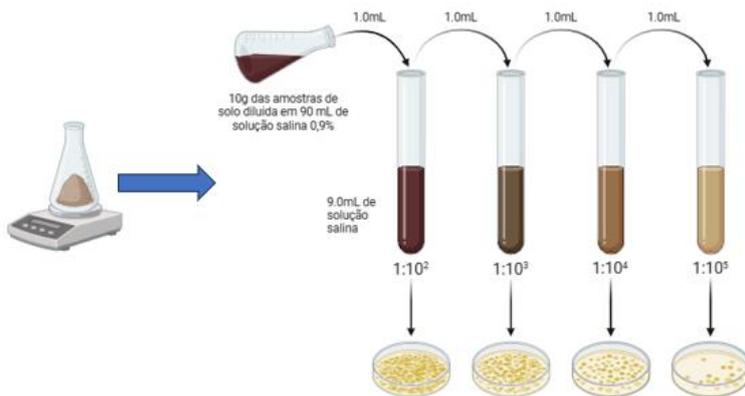
- Isolar bactérias potencialmente produtoras de proteases;
- Isolar bactérias potencialmente produtoras de amilases;

- Isolar bactérias potencialmente produtoras de xilanas;
- Realizar análise morfotintorial dos isolados.

4. Material e métodos

4.1. Resumo gráfico

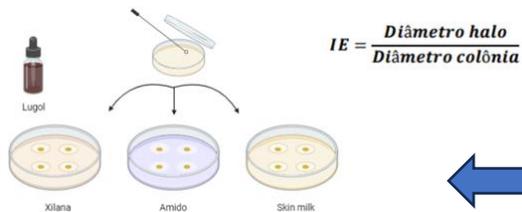
Pesagem da amostra e diluição seriada.



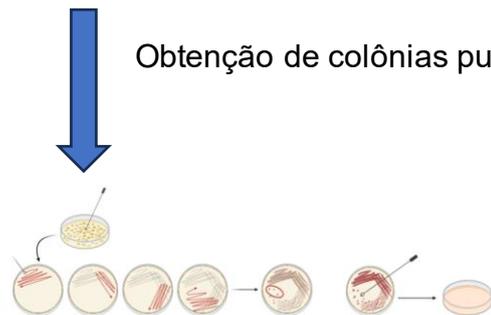
Meios de cultura utilizados.



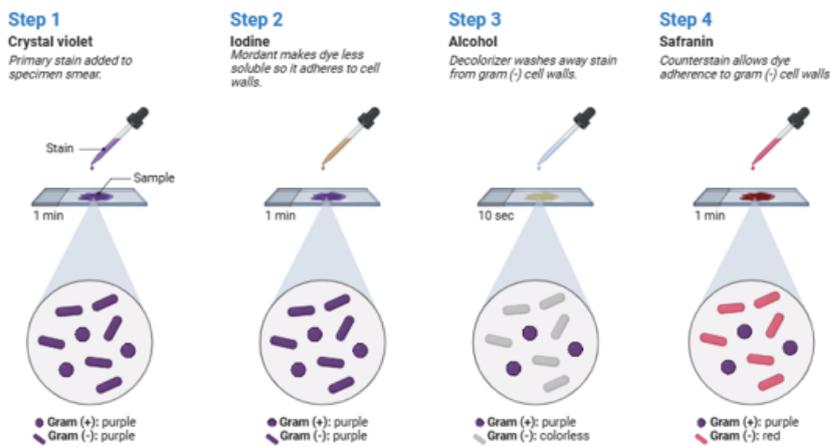
Obtenção dos halos de degradação e cálculo do IE.



Obtenção de colônias puras.



Coloração de Gram e outros testes bioquímicos realizados.



Outros testes bioquímicos realizados:

- KOH 3%;
- Catalase;
- Oxidase;

4.2. Amostragem do solo

As amostras de solo foram coletadas em 22/01/2022 em Alto Garças (MT) que apresenta coordenadas (16°52'23.1"S, 53°24'09.7"W; 16°52'20.8"S, 53°24'14.8"W; 16°51'57.3S, 53°24'00.2"W; 16°52'01.7"S, 53°24'00.9"W).

4.3. Isolamento de bactérias com potencial enzimático

A partir dessas amostras, pesou-se 3,33 g de cada amostra e realizou-se a diluição de 10 g em 90 ml de solução salina 0,9%. Subsequentemente, foram realizadas diluições seriadas da amostra de solo, inoculando 100 µL das diluições 10^{-4} e 10^{-5} pelo método de espalhamento em superfície em placas de Petri contendo meio mínimo de sais contendo 2 g de xilana por litro de meio como fonte de carbono. Para evitar o crescimento de fungos, 3 ml de solução fluconazol 0,01 g.ml⁻¹ foram adicionados a cada litro de meio seletivo.

O meio mínimo de sais, para 1l, é composto de 0,5 g de extrato de levedura, 0,25 g de nitrato de amônio (NH₄NO₃), 1,0 g de KH₂PO₄, 0,01 g de FeSO₄, 15 g de ágar bacteriológico, 3 ml de fluconazol (após a autoclavagem do meio e com uma temperatura em volta de 50 °C) e uma fonte de carbono (skim milk, amido solúvel ou xilana).

O procedimento foi replicado utilizando o mesmo meio, mas variando a fonte de carbono para *Skim milk* produzido pela Acumedia Manufacturers® (20 g por litro), visando isolar bactérias produtoras de proteases, e amido solúvel (6,6 g por litro), para isolar bactérias produtoras de amilases.

As placas foram incubadas por 24 horas ou até a formação das colônias em uma incubadora BOD a 30 °C, após o crescimento, as colônias foram estriadas por esgotamento para obtenção de colônias isoladas e puras.

4.4. Avaliação do Potencial Enzimático

Para avaliar o potencial enzimático das bactérias encontradas, cada placa de Petri foi dividida em quatro partes, e cada bactéria previamente isolada foi cultivada em quatro repetições em meio mínimo com adição de xilana, *skim milk* e amido. As culturas foram incubadas em BOD a 30 °C por 24 e 48 horas. Após cada período, as placas contendo amido solúvel e xilana como fontes de carbono foram cobertas com solução de lugol por 10 segundos para evidenciar halos de

degradação em volta das colônias. No caso das placas contendo *skim milk*, não foi necessário adicionar à solução de lugol, pois os halos eram visíveis sem essa etapa.

A determinação do potencial enzimático baseou-se no cálculo do Índice Enzimático (IE), que representa o quociente entre o diâmetro médio do halo de degradação e o diâmetro médio da colônia. De acordo com o estudo conduzido por Ribeiro et al. (2018), cepas que apresentaram $IE \geq 2,0$ Cm foram consideradas boas produtoras de proteases. Para as cepas produtoras de xilanas e amilases, conforme Alves e Paiva (2018), foram consideradas boas produtoras aquelas que apresentaram $IE \geq 1,0$ Cm e $IE \geq 1,5$ Cm, respectivamente.

$$IE = \frac{\text{Diâmetro halo}}{\text{Diâmetro colônia}}$$

4.5. Classificação Morfotintorial das Bactérias Isoladas

A classificação morfotintorial das bactérias isoladas foi realizada por meio da técnica de coloração de Gram, que permite distinguir entre Gram-positivas e Gram-negativas. Inicialmente, foi realizado um esfregaço com o material biológico, seguido pela fixação da lâmina pelo calor. Em seguida, aplicou-se cristal violeta por 60 segundos, seguido por enxágue com água destilada. Posteriormente, a lâmina foi exposta à solução de iodo (lugol) por 60 segundos, seguido por novo enxágue. Subsequentemente, a lâmina foi tratada com um agente descolorante (etanol:acetona 1:1 v/v) por aproximadamente 15 segundos, seguido por nova lavagem com água destilada. Depois dessa etapa, a lâmina recebeu 0,1 a 0,2% de fucsina básica (ou Safranina) por 30 segundos, seguido por outra rodada de enxágue.

Após a completa secagem da lâmina, uma gota de óleo de imersão foi aplicada, e a análise microscópica foi realizada usando um microscópio óptico em aumento de 1000 vezes. Células com coloração avermelhada foram identificadas como Gram-negativas, enquanto aquelas com tom azulado foram classificadas como Gram-positivas.

Quando necessário, para confirmação da coloração de Gram foi aplicado o teste de KOH, aplicando-se uma amostra da colônia isolada em uma lâmina de microscopia por meio de uma alça de platina. Duas gotas de solução de KOH a 3% foram adicionadas, e o material foi misturado por cerca de 30 segundos através de movimentos circulares. Durante a agitação, observou-se os movimentos de elevação da amostra com a alça para determinar a presença de viscosidade. No caso de uma bactéria Gram-negativa, o KOH quebraria a parede celular, expondo o DNA e resultando em viscosidade visível. Se a classificação da bactéria como Gram-negativa estiver incorreta, a viscosidade não seria observada, indicando uma classificação correta como bactéria Gram-positiva, cuja parede celular não é afetada pela solução de KOH a 3%.

Para o teste de catalase utilizou-se uma alça de platina, foi coletada uma quantidade substancial da bactéria alvo, seguida pela criação de um esfregaço em uma lâmina. Uma gota de peróxido de hidrogênio a 3% foi então aplicada sobre as bactérias na lâmina. O surgimento imediato de bolhas indicando efervescência foi considerado como um resultado positivo, demonstrando a conversão do H₂O₂ em água e oxigênio gasoso. Por outro lado, a ausência de atividade, como a formação de bolhas ou efervescência, foi interpretada como um resultado negativo. Vale destacar que este teste foi conduzido exclusivamente nas bactérias previamente identificadas como Gram-positivas.

Já o ensaio de oxidase foi conduzido exclusivamente em isolados previamente classificados como Gram-negativos. Utilizaram-se fitas NEWPROV para determinação de oxidase, seguindo os protocolos recomendados pelo fabricante. Utilizando uma alça de platina, uma pequena amostra bacteriana foi diretamente aplicada da placa para a área designada na fita. As amostras que exibiram uma mudança de cor para um tom roxo quase azulado na extremidade da fita onde o esfregaço foi realizado foram consideradas como positivas para o teste de oxidase. As amostras que não manifestaram nenhuma alteração foram classificadas como negativas para oxidase.

5. Resultado

5.1. Bactérias Isoladas

Foram isoladas sete bactérias do solo investigado, distribuídos entre

quatro cepas produtoras de proteases, dois de xilanases e uma de amilase. Todos os isolados foram categorizados como bactérias, e sua morfologia bacteriana foi confirmada por meio da coloração de Gram. A caracterização adicional revelou que os isolados se distribuíram entre Gram-negativos e Gram-positivos, sendo o teste de KOH confirmatório, consolidando os resultados relacionados à morfologia dos microrganismos.

Posteriormente, realizaram-se o teste de oxidase para os isolados Gram-negativos e o teste de catalase para os Gram-positivos, cujos resultados estão apresentados de forma detalhada na Tabela 01.

Tabela 01. Identificação morfotintorial dos isolados do solo

Identificação da cepa	Morfologia	Gram	Catalase	Oxidase	KOH
Prote A	Bastonete curto	-	NR	-	+
Prote B	Bastonete curto	-	NR	-	+
Prote C	Bastonetes	+	+	NR	-
Prote E	Bastonetes	+	+	NR	-
Xila A	Bastonetes	+	+	NR	-
Xila B	Bastonetes	+	+	NR	-
Ami	Bastonetes	+	+	NR	-

(+): positivo; (-): negativo; NR: não realizado

5.2. Determinação do potencial enzimático

A determinação do potencial enzimático de cada cepa foi realizada através do Índice Enzimático (IE), considerando valores significantes para cepas possíveis produtoras de protease com $IE \geq 2,0$, xilanases com $IE \geq 1,0$ Cm e amilases com $IE \geq 1,5$ Cm. Os resultados dos cálculos dos IE estão apresentados na Tabela 02.

Tabela 02. Media dos índices enzimáticos (IE) das colônias isoladas do solo em 24 e 48 horas

Identificação da cepa	Media IE 24 h	Media IE 48 h	Desvio padrão 24 h	Desvio padrão 48 h
Prote A	2,04 Cm	2,30 Cm	0,674 Cm	0,275 Cm
Prote B	1,96 Cm	2,24 Cm	0,319 Cm	0,570 Cm
Prote C	2,43 Cm	2,55 Cm	0,529 Cm	0,229 Cm
Prote E	2,64 Cm	2,64 Cm	0,227 Cm	0,227 Cm
Xila A	1,94 Cm	1,84 Cm	0,323 Cm	0,095 Cm
Xila B	1,78 Cm	1,74 Cm	0,273 Cm	0,204 Cm
Ami	-	1,66 Cm	-	0,242 Cm

(A cepa Prote E não apresentou diferenças nos IE de 24 e 48 horas, já a cepa Ami apresentou halos somente em 48h)

A partir das técnicas de isolamento e triagem, foram identificadas sete cepas bacterianas capazes de produzir enzimas de interesse industrial, com índices enzimáticos bons para dar sequência aos estudos. Destas, quatro apresentaram potencial para a produção de proteases, duas para xilanases e uma para amilases (figura 1).



Figura 1 – A foto A, B e C mostram, respectivamente, exemplos de colônias que apresentaram halos de degradação de proteases, amilases e xilanases.

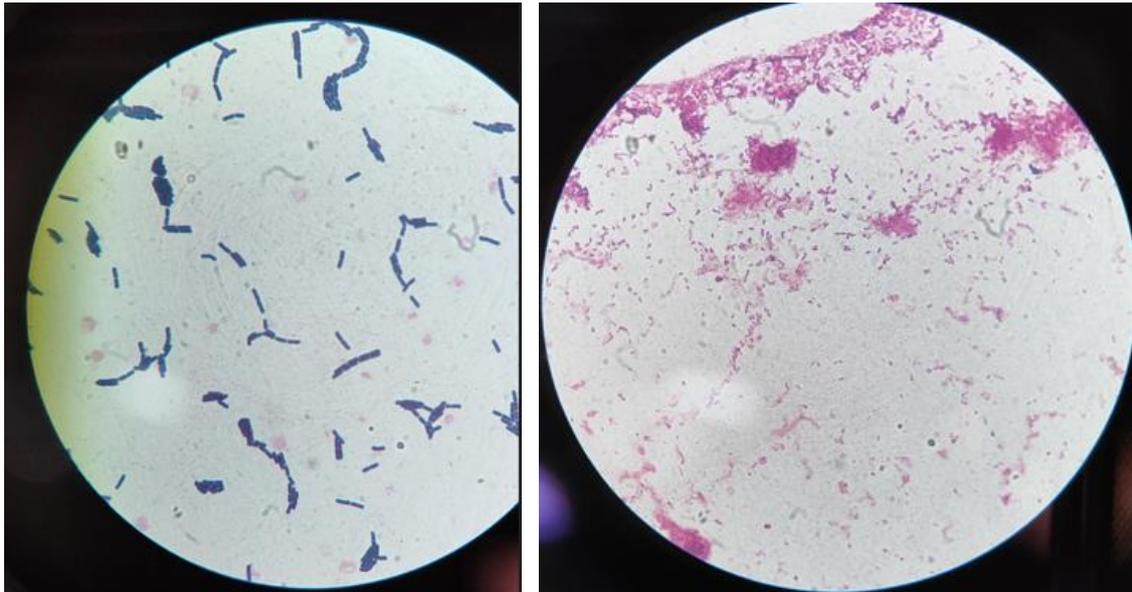


Figura 2 – Microscopias de bastonetes Gram-positivo e bastonetes curtos Gram-negativo respectivamente.

6. Discussão

A pesquisa revelou resultados positivos ao isolar cepas produtoras de proteases, amilases e xilanases no solo do Cerrado. Seguindo os parâmetros adotados por Ribeiro et al. (2018) as cepas Prote A, Prote C e Prote E possivelmente são boas produtoras de proteases tanto em 24 quanto em 48 horas pois apresentaram $IE \geq 2,0$, a cepa Prote B apresentou esse resultado somente com 48 horas. A cepa Prote E não apresentou diferença nos índices enzimáticos de 24 e 48 horas pois, provavelmente após o primeiro período pararam de apresentar crescimento.

Comparando esses resultados com estudos semelhantes, como o realizado por Campos (2020), que utilizaram amostras de compostagem para isolar cepas produtoras de proteases, observamos uma faixa de IE que sugere um potencial capacidade superior nas cepas do Cerrado, uma vez que os IE encontrados por ele ficaram entre 1,74 Cm e 2,14 Cm e os IE desse trabalho foram entre 1,96 Cm e 2,64 Cm.

As cepas Xila A e Xila B tiveram um $IE \geq 1,0$, sendo assim, podem ser consideradas boas produtoras de xilanases em conformidade com Alves (2018) que também isolaram bactérias produtoras de xilanases e amilases a partir do solo do Cerrado de Uberaba (MG). De acordo com o mesmo trabalho, a cepa

Ami também apresentou um IE $\geq 1,5$. Entretanto, ambas as cepas possivelmente produtoras de xilanases tiveram um IE maior em 24 horas, isso possivelmente ocorreu, pois após esse período as colônias cresceram e o halo de degradação não.

As cepas com possível capacidade de produzir xilanases isoladas do Cerrado de Alto Garças apresentaram capacidade superior as isoladas do Cerrado de Uberaba, sendo a faixa de IE entre 1,74 Cm e 1,94 Cm, já as encontradas por Alves (2018) sendo entre 0,74 Cm e 1,0 Cm. Paralelamente, o presente estudo corrobora com as descobertas de Alves (2018), que também identificaram cepas produtoras de amilases cuja atividade só se manifestou plenamente após 48 horas, indicando uma semelhança no comportamento dessas cepas.

A eficácia do método de triagem baseado na formação de halos de degradação ao redor das colônias é evidenciada pela consistência dos resultados. Esses achados promissores indicam a presença de microrganismos nativos do Cerrado com potencial biotecnológico significativo. Contudo, para uma compreensão mais completa, seria interessante considerar uma análise de espectrometria que quantifique a produtividade de cada cepa, proporcionando uma validação adicional aos resultados obtidos.

Além do impacto na biodiversidade microbiana do Cerrado, os resultados deste estudo apontam para aplicações práticas, especialmente na indústria de alimentos, agricultura e tratamento de resíduos. O caminho para futuras investigações pode se concentrar na otimização dessas enzimas para atender demandas específicas desses setores. Novos estudos exploratórios, considerando variáveis ambientais e condições de cultivo, podem fornecer *insights* valiosos para a aplicação sustentável dessas enzimas em escala industrial.

7. Conclusão

Em resumo, os resultados deste estudo revelam a significativa diversidade e potencial biotecnológico das bactérias isoladas de amostras de solo do Cerrado, destacando-se quatro cepas com potencial para produção de proteases, distribuídas entre Gram-negativas e Gram-positivas, e duas cepas

potenciais produtoras de xilanase, predominantemente Gram-positivas. Adicionalmente, uma bactéria Gram-positiva com potencial produtor de amilase foi identificada.

As descobertas apontam para a riqueza biológica do solo do Cerrado como fonte de microrganismos com potencial enzimático, destacando a importância das cepas Gram-positivas em processos biotecnológicos. O estudo avança na compreensão e preservação desse ecossistema, ressaltando seu potencial biotecnológico. No entanto, ressalta-se a necessidade de estudos futuros que quantifiquem a capacidade de produção enzimática dessas cepas.

8. Referências

- Alokika, and Bijender Singh. 2019. "Production, Characteristics, and Biotechnological Applications of Microbial Xylanases." *Applied Microbiology and Biotechnology* 103(21–22):8763–84.
- Alves, Bianca Aguiar. 2018. "Bioprospecção de Bactérias Produtoras de Enzimas de Interesse Biotecnológico." Universidade Federal do Triângulo Mineiro Bianca.
- AGUIAR, L. M. de S. ..., and A. J. A. de (ed.). CAMARGO. 2004. *Cerrado: Ecologia e Caracterização*. 3ª. edited by L. M. de S. Aguiar and A. J. A. de Camargo. VALE, A. T. do et al. (ed.). Cerrado: ecologia e caracterização. 3º. ed. Brasília:
- Bernal, Suzan Prado Fernandes. 2020. "AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE BACTÉRIAS E FUNGOS ISOLADOS DE UMA ESTAÇÃO DE TRATAMENTO DE INDÚSTRIA TÊXTIL." *Dissertação de Mestrado Do Programa de Pós- Graduação Em Biociências – Universidade Federal Da Integração Latino-Americana* 124.
- Burlacu, Aglaia, Florentina Israel-Roming, and Calina Petruta Cornea. 2016. "Microbial Xylanase: A Review SEE PROFILE." *Scientific Bulletin. Series F. Biotechnologies* XX(July).
- Campos, Lara de Lima;, and João Carlos Maia Dornelas de Oliveira. 2020. "BIOPROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS PRODUTORAS DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS DE INTERESSE INDUSTRIAL A PARTIR DE AMOSTRAS

DE COMPOSTAGEM.” 1–18.

Chakdar, Hillol;, Murugan; Kumar, Kuppusamy; Pandiyan, Arjun; Singh, Karthikeyan; Nanjappan, Prem Lal; Kashyap, and Alok Kumar Srivastava. 2016. “Bacterial Xylanases: Biology to Biotechnology.” *3 Biotech* 6(2):1–15.

De Donato, Alexandre, Tatiana Faria Maia, Tiago de Conto, Marcos Gervasio Pereira, and Marcelo Elias Fraga. 2019. “Phytase Producing Mycobiota Isolated from Soil and Litter of Cerrado Biome.” *Ciencia Florestal* 29(3):1270–81.

Espinola, Maria Vanessa Pontes da Costa. 2020. “IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA DE BACTÉRIAS TERMOFÍLICAS E TERMOTOLERANTES ISOLADAS DO SOLO DA CAATINGA DO CARIRI PARAIBANO.” UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA CENTRO, João Pessoa.

Inkotte, Jonas, Rosana Carvalho Cristo Martins, Fernando Paiva Scardua, and Reginaldo Sérgio Pereira. 2019. “Métodos de Avaliação Da Ciclagem de Nutrientes No Bioma Cerrado: Uma Revisão Sistemática TT - Methods of Evaluation of Nutrient Cycling in the Cerrado Biome: A Systematic Review.” *Ciência Florestal* 29(2):988–1003.

Kumar, P. Senthil;, P. R. .. Yaashikaa, and A. Saravanan. 2018. “Isolation, Characterization and Purification of Xylanase Producing Bacteria from Sea Sediment.” *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 13(December 2017):299–303.

Napolitano, Hamilton Barbosa, Dulcinea Maria Barbosa Campos, Wesley Fonseca Vaz, and Francisco Leonardo Tejerina Garro. 2016. “Inovação e Biotecnologia Na Biodiversidade Do Cerrado.” *Fronteiras* 5(2):162–80.

Observatory of Economic Complexity. 2023. “Enzymes in Brazil.” Retrieved December 14, 2023 (<https://oec.world/en/profile/bilateral-product/enzymes/reporter/bra?subnationalTimeSelector=timeYear>).

Papadaki, Eugenia;, Konstantinos N. .. Kontogiannopoulos, Andreana N. .. Assimopoulou, and Fani Th. Mantzouridou. 2020. “Feasibility of Multi-Hydrolytic Enzymes Production from Optimized Grape Pomace Residues

and Wheat Bran Mixture Using *Aspergillus Niger* in an Integrated Citric Acid-Enzymes Production Process.” *Bioresource Technology*, August.

Procópio, Luciano, and Cristine Barreto. 2021. “The Soil Microbiomes of the Brazilian Cerrado.” *Journal of Soils and Sediments* 21(6):2327–42.

Santos, Januário Gama dos; 2009. “PROTEASES PRODUZIDAS POR BACTÉRIAS DA AMAZÔNIA COM POTENCIAL FIBRINOLÍTICO.” UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM.

Santos, Karla Dayani Reis dos. 2019. *BIOPROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS EM SOLO DO CERRADO COM POTENCIAL DE PRODUÇÃO DE POLIHIDROXIALCANOATOS (PHA)*. SANTOS, K. D. R. dos. *BIOPROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS EM SOLO DO CERRADO COM POTENCIAL DE PRODUÇÃO DE POLIHIDROXIALCANOATOS (PHA)*. 2019. 50 p. Monografia (Biotecnologia) — UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS.

Zhang, Yi;, Xin; Rui, and Benjamin K. Simpson. 2021. “Trends in Nanozymes Development versus Traditional Enzymes in Food Science.” *Food Science* 37:10–16.