

## Isolamento e seleção de microrganismos produtores de enzimas celulolíticas

### Isolation and selection of cellulolytic enzyme-producing microorganisms

DOI:10.34117/bjdv8n4-386

Recebimento dos originais: 21/02/2022

Aceitação para publicação: 31/03/2022

#### **Keilla Santos Cerqueira**

Doutoranda em Engenharia Química

Instituição: Universidade Federal da Bahia

Endereço: R. Prof. Aristίδes Novis, 2 - Federação, Salvador - BA, CEP: 40210-630  
Brasil

E-mail: keilla.santos@ufba.br

#### **Karollyna Menezes Silva**

Graduanda em Química Industrial

Instituição: Universidade Federal de Sergipe

Endereço: Avenida Marechal Rondon Jardim s/n - Rosa Elze, São Cristóvão - SE  
CEP: 49100-000, Brasil

E-mail: karollynams@hotmail.com

#### **Graziella do Nascimento Silva**

Graduanda em Engenharia Química

Instituição: Universidade Federal de Sergipe

Endereço: Avenida Marechal Rondon Jardim s/n - Rosa Elze, São Cristóvão - SE  
CEP: 49100-000, Brasil

E-mail: graziellanas.silva@gmail.com

#### **Jacqueline Rego da Silva Rodrigues**

Doutora em Engenharia Química

Instituição: Universidade Federal de Sergipe

Endereço: Avenida Marechal Rondon Jardim s/n - Rosa Elze, São Cristóvão - SE  
CEP: 49100-000, Brasil

E-mail: jregrodrigues@gmail.com

#### **Ana Katerine de Carvalho Lima Lobato**

Doutora em Engenharia Química

Instituição: Universidade Federal da Bahia

Endereço: R. Prof. Aristίδes Novis, 2 - Federação, Salvador-BA, CEP: 40210-630 -  
Brasil

E-mail: Ana.lobato@unifacs.br

**Roberto Rodrigues de Souza**

Doutor em Engenharia Química

Instituição: Universidade Federal de Sergipe

Endereço: Avenida Marechal Rondon Jardim s/n - Rosa Elze, São Cristóvão – SE

CEP: 49100-000, Brasil

E-mail: rrsouza@ufs.br

**RESUMO**

As enzimas celulolíticas apresentam um vasto campo de aplicação, sendo consideradas de grande importância biotecnológica. As enzimas podem ser de origem animal, vegetal e microbiana, sendo esta a obtenção mais vantajosa. O objetivo do trabalho foi selecionar e caracterizar microrganismos potenciais produtores de enzimas celulolíticas, utilizando a casca do coco, abacaxi podre, amostras de solo e troncos de árvores como fonte de isolamento. O isolamento foi realizado através da técnica de sementeira por esgotamento em placas de PDA e NA. Os isolados foram caracterizados macro e microscopicamente, e também avaliado quanto à capacidade de apresentar atividade celulolítica. A técnica de isolamento apresentou seis cepas com capacidade de excretar enzimas celulolíticas, com destaque para os isolados 5 e 12 que obtiveram valor de índice enzimático de 12 e 9,3, respectivamente, contribuindo positivamente para uma necessidade atual do mercado em buscar novos microrganismos produtores com alta atividade enzimática.

**Palavras-chave:** enzimas, celulasas, isolamento microrganismo.

**ABSTRACT**

The cellulolytic enzymes present a vast field of application, being considered of great biotechnological importance. The enzymes can be of animal, vegetal and microbial origin, the latter being the most advantageous. The objective of this work was to select and characterize potential microorganisms that produce cellulolytic enzymes, using coconut shell, rotten pineapple, soil samples and tree trunks as isolation source. Isolation was performed using the depletion seeding technique on PDA and NA plates. The isolates were characterized macro and microscopically, and also evaluated for the ability to exhibit cellulolytic activity. The isolation technique presented six strains with capacity to excrete cellulolytic enzymes, with highlight to isolates 5 and 12 that obtained enzymatic index values of 12 and 9.3, respectively, contributing positively to a current market need to search for new producing microorganisms with high enzymatic activity.

**Keywords:** enzymes, cellulases, microorganism isolation.

**1 INTRODUÇÃO**

As enzimas são um grupo de proteínas que desempenham funções essenciais no metabolismo atuando como catalisadoras de processos bioquímicos (Queiroz and de Sousa 2020). Cada enzima tem um caráter bastante específico, atuando em um determinado substrato para produzir um determinado produto. O uso das enzimas abrange diversas áreas, principalmente ao que se diz respeito em processos industriais, uso este atribuído à propriedade de reconhecimento específico do substrato pela enzima. As

reações químicas envolvidas nestes processos são geralmente mediadas por catalisadores químicos, onde as enzimas possuem vantagens frente a eles por seu baixo impacto ambiental, além de ser economicamente mais viável, pelo baixo consumo energético e por possuir um bom retorno financeiro. (Beli, Mageste et al. 2020)

As celulasas são enzimas responsáveis pela degradação da celulose, principal composto presente no tecido vegetal. Atualmente, essas enzimas são empregadas principalmente na produção de detergente, na indústria têxtil produzindo a aparência “lavada” do jeans e tornando os tecidos mais lisos e macios, na indústria de papel e celulose para branqueamento da polpa de celulose e na indústria de alimentos (Singhal, Meshram et al. 2018; Imran, Bano et al. 2019; Patel, Pandey et al. 2019).

As enzimas mais estudadas são aquelas de origem animal ou vegetal, contudo as de origem microbiana apresentam grande potencial para a aplicação industrial, já que podem ser facilmente produzidas em larga escala, via fermentação. Fungos filamentosos, leveduras e bactérias são os principais microrganismos envolvidos em processos fermentativos na produção de enzimas devido à versatilidade genética e metabólica que eles podem apresentar (Rêgo, Cunha et al. 2019)

Nos últimos anos, intensificaram-se as investigações para identificação e isolamento de microrganismo capaz de produzir celulasas. A maioria dos estudos tem sido sobre o sistema de celulase de fungos filamentosos como *Trichoderma*, *Penicillium*, *Aspergillus* e *Fusarium* (di Cologna, Gómez-Mendoza et al. 2018; Steudler, Werner et al. 2019). A melhoria no processo de produção e aplicação de celulasas vem sendo geradas no intuito ao isolamento de microrganismo produtores de celulasas, a clonagem e expressão de genes para o aumento da expressão microbiana de celulasas, a purificação e caracterização de componentes deste complexo enzimático, ao entendimento sobre os mecanismos de ataque a celulose, a determinação de estruturas tridimensionais das celulasas e a demonstração do potencial industrial dessas enzimas (Patel, Singhanian et al. 2019; Singh, Patel et al. 2019).

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Biotecnologia do Departamento de Engenharia Química (DEQ) da Universidade Federal de Sergipe (UFS). As amostras do coco e abacaxi foram coletadas na Central de Abastecimento de Sergipe (Ceasa) em Aracaju e as amostras de solo e tronco de árvore foram obtidos nas localidades do Laboratório de Biotecnologia da Universidade Federal de Sergipe em São Cristóvão.

## 2.1 ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS

Foi transferida cerca de 2g das amostras para um erlenmeyer de 125mL contendo um caldo de enriquecimento, composto de extrato de levedura 1,5 g/L, extrato de carne 1,5 g/L e cloreto de sódio 5 g/L. O meio inoculado foi incubado em estufa a 30°C por 24 horas. Após incubação, uma alçada do material foi utilizada para a semeadura por esgotamento em placas de Petri contendo meios de cultura ágar batata dextrose (PDA) e ágar nutriente (NA). As placas com meio NA foram incubadas a 30°C durante 24 horas, e as placas com PDA foram incubadas sob mesma temperatura por 48 horas. As cepas obtidas no processo de isolamento foram caracterizadas quanto à morfologia macro e microscópica.

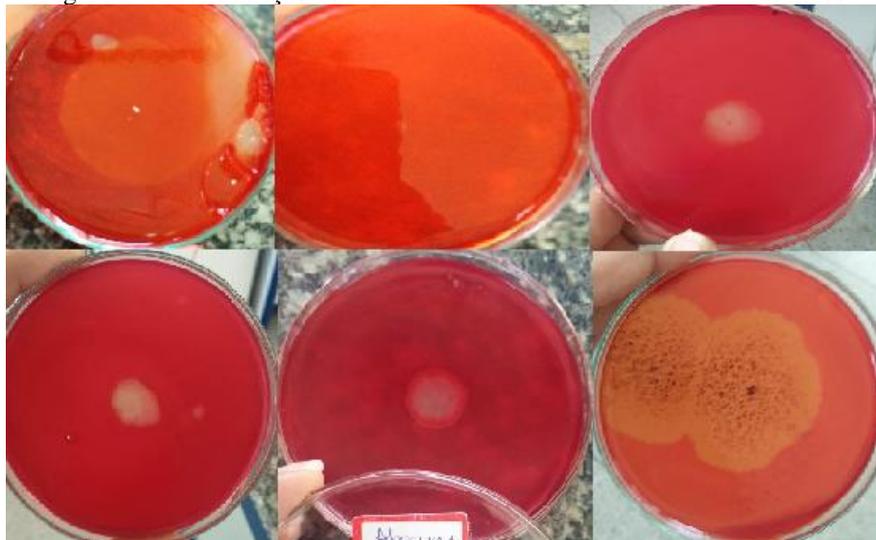
## 2.2 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS ISOLADOS

Após a etapa de isolamento, foi realizada uma análise macroscópica (análise textural e estrutural) usando os microrganismos obtidos em placas. As culturas puras foram analisadas por microscopia ótica, através da técnica de coloração simples, para a identificação das formas e arranjos das células microbianas, determinando a qual grupo os isolados pertencem.

## 2.3 DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A produção de celulase foi verificada em meio contendo 4 g/L de carboximetilcelulose (CMC), 10 g/L de extrato de levedura, 20 g/L de peptona, e 20 g/L de agar. Após incubação, as placas foram coradas durante 30 minutos com solução de vermelho congo (0,3 g/L) em tampão Tris-HCl 1 mol/L, pH 7,0 e em seguida lavadas 2 vezes com NaCl 1 mol/L. Os diâmetros das colônias e dos halos produzidos foram medidos com paquímetro de acordo com a Figura 1.

Figura 1 – Determinação do índice enzimático através da medida dos halos.



### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

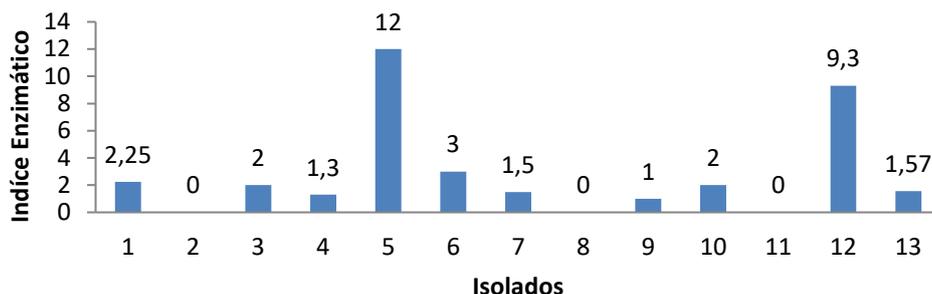
Utilizou-se a técnica de semeadura por esgotamento para isolamento dos microrganismos, obtendo 13 isolados, sendo 4 oriundos do abacaxi, 3 do coco, 3 da árvore e 3 da terra. Os isolados foram analisados e caracterizados morfológicamente, conforme apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Caracterização morfológica e análise dos isolados.

Isolados	Fonte	Análise macroscópica	Análise microscópica
01	Abacaxi	Branca, fosca, seca, borda definida.	Bactéria – vibriões
02	Abacaxi	Laranja, fosca, cremosa.	Bactéria – cocos
03	Abacaxi	Branca, aveludada, filamentosos.	Fungo – filamentosos
04	Abacaxi	Branca, cremosa, bordas regulares.	Bactéria – Bastões
05	Coco	Amarelada, fosca, cremosa, borda definida.	Bactéria – estafilococos
06	Coco	Bege, seca, crescimento puntiforme.	Bactéria – cocos
07	Coco	Transparente, cremosa, crescimento pontual.	Fungo – filamentosos
08	Árvore	Laranja, transparente, cremoso, borda definida.	Bactéria – cocos
09	Árvore	Amarelada, fosca, cremosa, borda definida.	Bactéria – diplococos
10	Árvore	Transparente, seca, ondulada.	Bactéria – cocos
11	Terra	Vermelha, seca, bordas regulares.	Bactéria – cocos
12	Terra	Branco, aveludado, crescimento irregular.	Fungo – levedura ovoide
13	Terra	Preto, filamentosos.	Fungo – filamentosos

A análise da atividade enzimática foi determinada através da medida dos halos para determinação do índice enzimático (IE). Segundo Lealem and Gashe (1994) os microrganismos que apresentarem índices enzimáticos (IE) superiores ou igual a 2,0 são considerados como grandes produtores de enzimas extracelulares em meio sólido. A partir da análise da Figura 2 pode-se observar os índices enzimáticos observados nos isolados.

Figura 2 – Gráfico comparativo para os valores de Índices Enzimáticos (IE) dos isolados.



Dos isolados os que apresentaram potencial segundo Lealem and Gashe (1994) estão os microrganismos 1,3,5,6,10 e 12. Com destaque para os isolados 5 e 12. Os demais isolados apesar de se desenvolverem no meio com CMC como única fonte de carbono, não mostraram nenhum indício de atividade celulolítica além dos limites da colônia, sendo considerados negativos para o teste de índice enzimático. Segundo Paludo, de Abreu-Lima et al. (2019) o halo para ser visualizado depende de diversos fatores: além dos parâmetros físicos e químicos há a interferência da presença de outras substâncias presentes no meio.

#### 4 CONCLUSÃO

A técnica de isolamento e o uso de resíduos como fonte produtora de microrganismos apresentaram resultados positivos, de forma que foram encontrados seis microrganismos excretores de enzimas celulolíticas, com destaque para os isolados 5 e 12 que obtiveram valor de índice enzimático de 12 e 9,3, respectivamente. Assim, o estudo mais detalhado dos isolados selecionados, incluindo a identificação taxonômica, é necessário para um maior aperfeiçoamento do estudo da produção enzimática. O presente trabalho contribuiu positivamente para uma necessidade atual do mercado em buscar novas cepas de microrganismos com alta atividade enzimática e que produzam moléculas com distintas propriedades e especificidades, visando à redução dos custos e contribuindo com o processo de agregação de valor econômico aos subprodutos da agroindústria.

## REFERÊNCIAS

- Beli, C. M., J. M. Mageste, et al. (2020). "BIOPROSPECÇÃO DE ENZIMAS PARA COSMÉTICA: SEU IMPACTO NA BIOTECNOLOGIA." Revista Ensaios Pioneiros **3**(2): 10-24.
- di Cologna, N. d. M., D. P. Gómez-Mendoza, et al. (2018). "Exploring Trichoderma and Aspergillus secretomes: proteomics approaches for the identification of enzymes of biotechnological interest." Enzyme and microbial technology **109**: 1-10.
- Imran, M., S. Bano, et al. (2019). "Cellulases Production and Application of Cellulases and Accessory Enzymes in Pulp and Paper Industry: A Review." PSM Biological Research **4**(1): 29-39.
- Lealem, F. and B. Gashe (1994). "Amylase production by a Gram-positive bacterium isolated from fermenting tef (Eragrostis tef)." Journal of Applied bacteriology **77**(3): 348-352.
- Paludo, G. B., T. L. de Abreu-Lima, et al. (2019). "Potencial enzimático de leveduras isoladas de folhas em decomposição." Acta Tecnológica **13**(2): 65-77.
- Patel, A. K., A. Pandey, et al. (2019). Production of Cellulolytic Enzymes for Lignocellulosic Biomass Hydrolysis. Biofuels: Alternative Feedstocks and Conversion Processes for the Production of Liquid and Gaseous Biofuels, Elsevier: 401-426.
- Patel, A. K., R. R. Singhanian, et al. (2019). "Thermostable cellulases: review and perspectives." Bioresource technology.
- Queiroz, C. and A. C. B. de Sousa (2020). "Produção de enzimas hidrolíticas por fungos filamentosos em diferentes substratos sólidos." Brazilian Journal of Development **6**(7): 51849-51860.
- Rêgo, A. P. B., J. R. B. Cunha, et al. (2019). "Produção de enzimas CMCCase e pectinase por processo fermentativo utilizando casca de café suplementada com manipueira como substrato." Revista Brasileira de Energias Renováveis **8**(1).
- Singh, G., A. K. Patel, et al. (2019). Current Advancements in Recombinant Technology for Industrial Production of Cellulases: Part-II. Approaches to Enhance Industrial Production of Fungal Cellulases, Springer: 177-201.
- Singhal, G., A. Meshram, et al. (2018). Technology Prospecting on Microbial Enzymes: Engineering and Application in Food Industry. Enzymes in Food Technology, Springer: 213-241.
- Stuedler, S., A. Werner, et al. (2019). "It Is the Mix that Matters: Substrate-Specific Enzyme Production from Filamentous Fungi and Bacteria Through Solid-State Fermentation."