

ESTUDO DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS (DNASES, LIPASES, AMILASES E PROTEASES) PRODUZIDAS POR MICRORGANISMOS DO SOLO COM ÊNFASE EM DNASE, VISANDO A PREPARAÇÃO DE UM DETERGENTE

Daniel Casartelli de Santa Inez (IC) e Maria Beatriz Riveron Acosta (Orientadora)

Apoio: PIBIC Mackenzie

Resumo

Este trabalho teve como intenção a produção de um detergente enzimático a partir de enzimas produzidas por microrganismos extraídos do solo. As enzimas selecionadas para serem usadas neste detergente foram DNase, lipase, amilase e protease. O intuito de produzir este detergente foi para uso laboratorial, principalmente em microbiologia, para que se pudesse limpar itens descartáveis, como Eppendorfs e ponteiros, evitando a necessidade de gastos com estes aparatos, que se tornam reutilizáveis após a lavagem. Além disso, podendo-se reutilizar estes materiais, a poluição por descarte seria reduzida, evitando que materiais resistentes como os Eppendorfs sejam jogados no lixo. Os estudos e a produção do detergente foram desenvolvidos na Universidade Presbiteriana Mackenzie, no laboratório de Microbiologia e Virologia molecular, sendo que a identificação no nível molecular dos microrganismos isolados foi feita no laboratório de Fisiologia de microrganismos, no ICB II, na Universidade de São Paulo. Foram selecionados ao final dois microrganismos para identificação, uma bactéria e um fungo. A bactéria se apresentou produtora de amilase, e o fungo produtor de DNase, protease e lipase. Os resultados obtidos foram positivos, sendo primeiro produzido um mix com as quatro enzimas selecionadas, e em seguida um detergente com as quatro enzimas, tendo ambos o efeito desejado, mostrando-se eficazes para a degradação dos quatro substratos específicos, DNA, lipídio (azeite), amido e proteína (caseína).

Palavras-chave: Detergente. Enzimas. Microrganismos.

Abstract

This work was intended to produce an enzymatic detergent from enzymes produced by microorganisms extracted from the soil. The enzymes selected for use in this detergent were DNase, lipase, amylase and protease. The purpose of producing this detergent was for laboratory use, mainly in microbiology, so that disposable items such as Eppendorfs and tips could be cleaned, avoiding the need for expenses with these devices, which become reusable after washing. In addition, if these materials can be reused, waste pollution would be reduced, preventing resistant materials such as Eppendorfs from being dumped in the

trash. The studies and the production of the detergent were developed at the Universidade Presbiteriana Mackenzie, in the laboratory of Microbiology and Molecular Virology, and the identification at the molecular level of the isolated microorganisms was done in the laboratory of Physiology of microorganisms, ICB II, at the University of São Paulo. Two microorganisms were selected for identification, a bacterium and a fungus. The bacteria presented amylase production, and the fungus DNase, protease and lipase. The results obtained were positive. A mixture was first produced with the four enzymes selected, and then a detergent with the four enzymes, both having the desired effect, proving effective for the degradation of the four specific substrates, DNA, lipid (olive oil), starch and protein (casein).

Keywords: Detergent. Enzymes. Microorganisms

1. Introdução

Este projeto, intitulado “*Estudo de Enzimas Hidrolíticas (DNAse, Lipases, Amilases e Proteases) Produzidas Por Microrganismos Do Solo Com Ênfase em DNAse, Visando A Preparação De Um Detergente*”, teve como intuito desenvolver um detergente enzimático capaz de limpar materiais laboratoriais da área de microbiologia e biologia molecular, como microtubos Eppendorfs, ponteiras (“tips”) e vidrarias.

Na área de pesquisa laboratorial o descarte de materiais é muito recorrente por conta da contaminação dos próprios reagentes, havendo sempre a necessidade de se comprar novos utensílios. Frente a isso o detergente tem a capacidade de limpar os materiais de laboratório para minimizar os custos de compra, permitindo o reuso, e também minimizar os impactos ambientais que o excessivo descarte de matérias de difícil degradação causam.

O projeto foi desenvolvido entre fevereiro de 2016 e junho de 2017. Entre agosto de 2016 e janeiro de 2017 foi aprovado no Programa PIVIC (Programa Institucional Voluntário de Iniciação Científica) da Universidade Presbiteriana Mackenzie e no último período foi aprovado no PIBIC (Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica) do CNPq com financiamento deste órgão e em seguida do Mackenzie. Desta forma o trabalho realizado totaliza 1 ano e meio, tendo tido partes desenvolvidas no laboratório da Universidade Presbiteriana Mackenzie e no ICB II (Instituto de Ciências Biológicas II) da Universidade de São Paulo, com o acompanhamento da Dra. Emy Tiyo Mano no laboratório de Fisiologia de microrganismos coordenado pela Dra. Luiziana Ferreira da Silva.

Os resultados buscados pelo estudo apresentado foram positivos, tendo sido confirmada a capacidade de detergência da formulação do mix com as enzimas testadas.

2. Referencial Teórico

De acordo com a IUBMB (*International Union of Biochemistry and Molecular Biology*) há seis classes principais de enzimas segundo o tipo de reação que catalisam: 1. Oxidoredutases; 2. Transferases; 3. Hidrolases; 4. Liases; 5. Isomerases; 6. Ligases (CHAMPE *et al*, 2007).

Este trabalho teve como foco e usou apenas enzimas do tipo hidrolases, ou hidrolíticas. Foram selecionados 4 tipos destas enzimas, conhecidas como lipases, proteases, amilases e DNases.

As lipases são capazes de catalisar a hidrólise de gorduras e fosfolipídeos liberando glicerol e ácidos graxos de cadeia longa. (Vaz & Choupina, 2012; KUMAR *et al*, 2016; VAQUERO *et al*, 2016; CARVALHO *et al*, 2015).

As proteases (proteínases, peptidases ou enzimas proteolíticas) quebram hidroliticamente ligações peptídicas entre resíduos de aminoácidos nas cadeias

polipeptídicas. Estas se dividem em endopeptidases e exopeptidases de acordo com a posição das ligações peptídicas a serem clivadas na cadeia polipeptídica. (APPOLAIRE *et al.*, 2016).

As amilases têm a capacidade de clivar ligações glicosídicas (α -1 \rightarrow 4 e α -1 \rightarrow 6) no polissacarídeo amido. (CARRASACO *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2016; HOMAEI *et al.*, 2016; HERRERA *et al.*, 20015; BARRERA *et al.*, 2015).

As DNases catalisam a clivagem hidrolítica de ligações fosfodiéster na cadeia polinucleotídica de DNA (ácido desoxirribonucleico). (LOHR *et al.*, 1977; KLOSTERMAN *et al.*, 2001; LANDRY *et al.*, 2014; FERNÁNDEZ & BIBB, 2014).

Exceto por um pequeno grupo de moléculas de RNA (ácido ribonucleico) catalíticos (ribozimas) todas as enzimas são proteínas. Esta informação foi essencial para que vários testes desenvolvidos ao longo do projeto fossem aplicados com resultados esperados (NELSON & COX, 2014).

A metodologia empregada neste trabalho foi baseada em protocolos descritos por Bollag *et al.* (1996); Bloom *et al.* (1996) e Madigan *et al.* (1997) modificados e adaptados às condições de trabalho disponíveis no laboratório de Microbiologia e Virologia molecular do CCBS da Universidade Presbiteriana Mackenzie.

3. Materiais e Métodos

No dia 25 de fevereiro de 2016 foi realizado o isolamento dos microrganismos de solo produtores de enzimas hidrolíticas. Este processo ocorreu por meio da coleta de terra de vasos de plantas comercializadas na cidade de São Paulo. A terra coletada foi extraída do solo do vaso a 10cm de profundidade da superfície, sendo que 1g de terra foi suspenso em 99mL de solução salina estéril (NaCl 10,85%) e com agitação por 20 minutos a 120 rpm. Esta suspensão foi então diluída em série, seguindo o padrão de 1mL da suspensão adicionado a 9mL de outra solução salina, até 10^{-5} . Foram inoculadas 4 placas com 100 μ L, 2 de diluição 10^{-4} e 2 de 10^{-5} , contendo meio LB (Luria Bertani) solidificado, composto por: Extrato de Levedura 0,5%; Triptona 1%; NaCl 1%; Ágar 1,5%, e esterilizado por autoclave (1atm e 121°C por 20 minutos). Ao fim desta etapa selecionamos apenas uma das placas de diluição 10^{-5} , onde 11 microrganismos foram escolhidos ao acaso e cultivados, no período de uma semana, em meios contendo os substratos apropriados para detecção de produção das enzimas pesquisadas.

Na figura 1 podemos ver a placa matriz, onde os 11 microrganismos foram cultivados. Outras placas como esta foram feitas para testes enzimáticos em conjunto, como

na figura 2, um teste para produção de amilase, na figura 3, um teste de produção de DNase, e na figura 4 um teste de produção de lipase.

Placa matriz

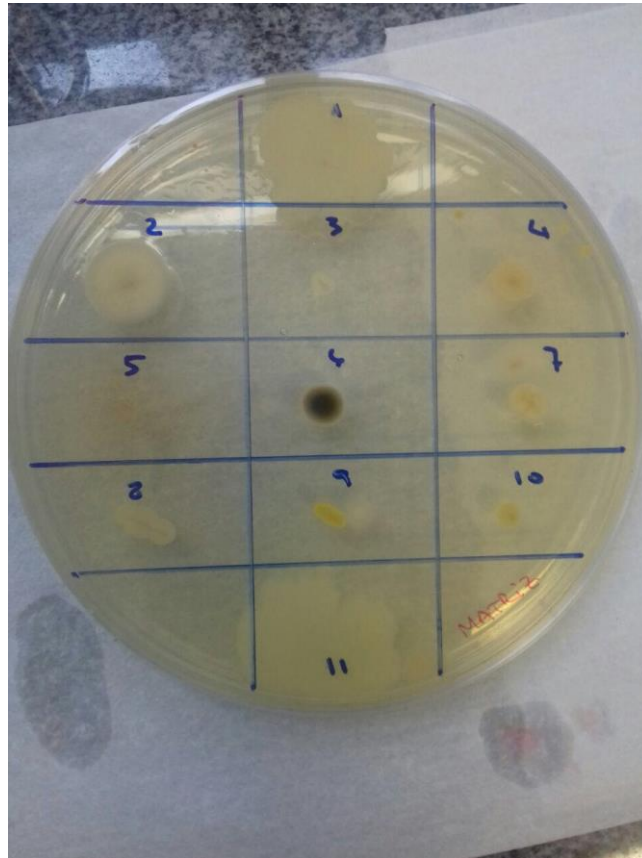


Figura 1 – Placa matriz onde foram cultivados os 11 microrganismos. Esta placa foi armazenada na geladeira após o crescimento dos organismos sendo usada como uma placa “estoque” para semear em outras placas.

O meio utilizado para verificação da produção de enzimas pelos microrganismos selecionados foi uma solução de sais contendo sulfato de amônia, fosfato biácido de potássio, fosfato monoácido de potássio, citrato de sódio, sulfato de magnésio e como fonte de carbono, apenas os substratos: DNA, azeite de oliva, amido e caseína. Os organismos teriam de produzir as enzimas específicas para hidrolisar o substrato presente no meio e assim desenvolverem colônias, cujo revelado foi mediante ausência de precipitação com HCl 1 M (indicando DNA degradado); titulação com NaOH 50 mM (produção de ácidos graxos livres por atividade lipolítica); ausência de cor azul intensa frente ao reagente Lugol (indicando quebra de amido) e halo claro em torno das colônias demonstrando hidrólise de caseína. Ao fim desta etapa, dentre os 11 microrganismos escolhidos e estudados, 8 mostraram produzir enzimas e foram denominados pelos de números 1, 2, 3, 6, 7, 8, 9 e 11.

Placa de testes de amilase

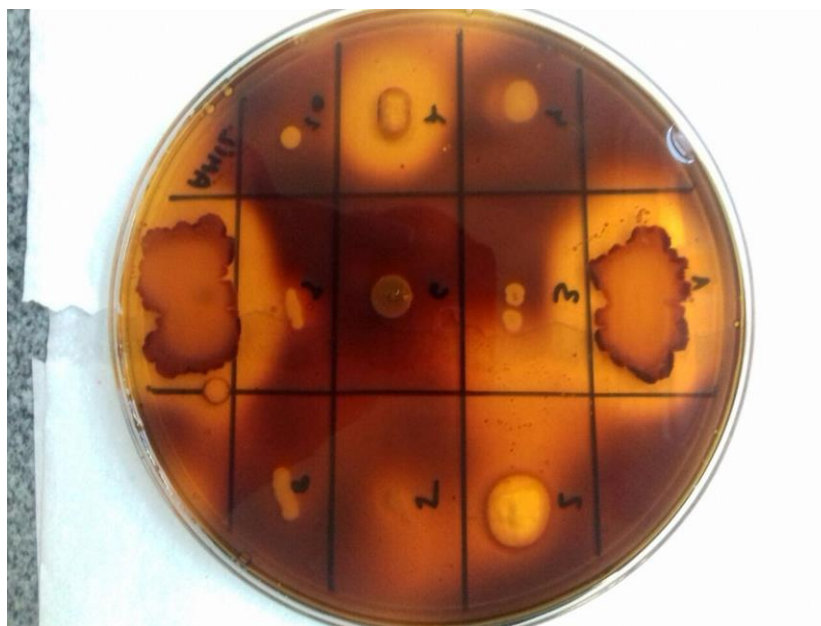


Figura 2 – Placa similar a matriz para teste de amilase dos microrganismos. Onde há halos mais claros houve a quebra do amido, assim os halos se formam em volta das culturas produtoras de amilase.

Placa de testes de DNase

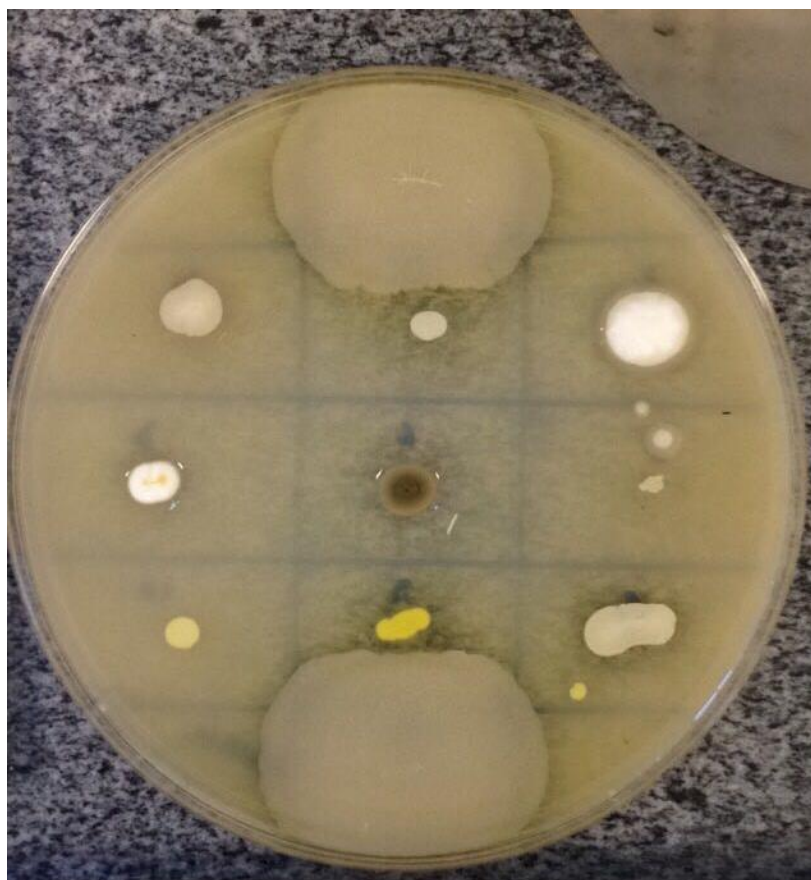


Figura 3 – Placa similar a matriz para testes de DNase dos microrganismos. Onde há halos mais claros houve a quebra do DNA, assim os halos se formam em volta das culturas produtoras de DNase.

Placa de testes de lipase

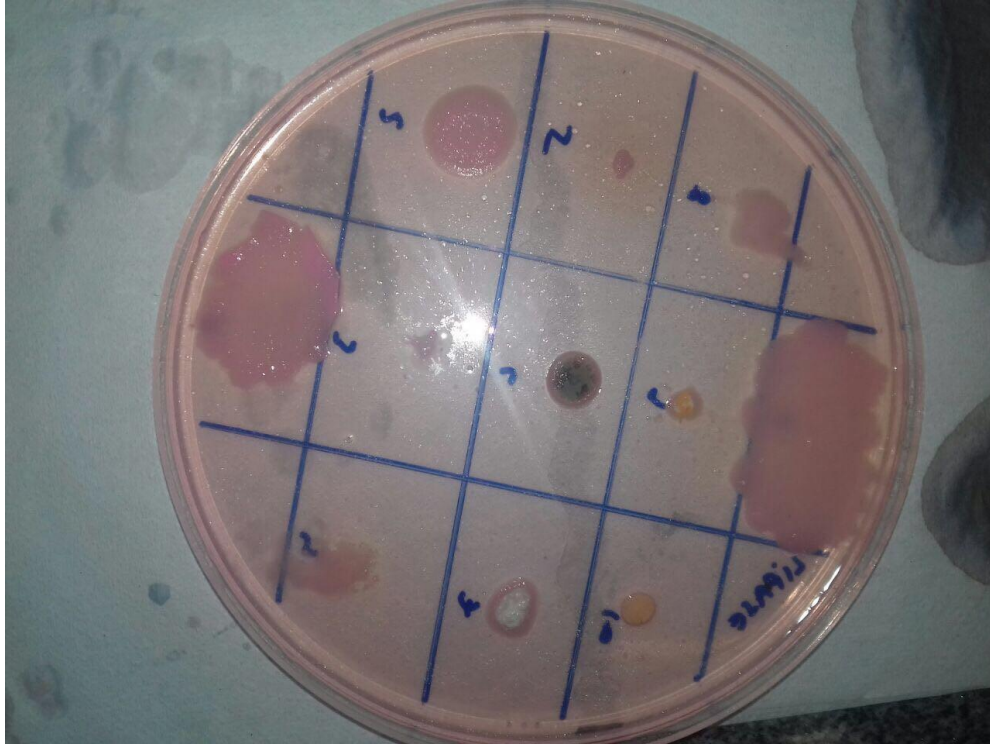


Figura 4 – Placa similar a matriz para testes de lipase dos microrganismos.

O microrganismo “6” se mostrou produtor de DNase, lipase e protease, e o microrganismo “1” de amilase.

Mediante análise morfológica à microscopia de luz, (coloração com azul de metileno e coloração de Gram) o microrganismo 6 mostrou ser um fungo filamentososo, e o organismo 1, uma bactéria, bacilo Gram positiva contendo endosporos. Por esse motivo decidimos amplificar e sequenciar a região ITS do organismo 6 e o gene 16s do organismo 1.

A fase seguinte, de identificação molecular dos organismos, foi realizada no ICB II da USP, no Laboratório coordenado pela Dra. Luiziana Ferreira da Silva, com a supervisão da Dra. Emy Tiyo Mano. Apenas os organismos 1 e 6 foram selecionados para a identificação. No dia 07 de abril de 2017 estes dois microrganismos foram armazenados em placas no ICB II, para no dia 11 de abril serem inseminados nos meios Potato Dextrose e LB, para fungo e bactéria, respectivamente.

Para a identificação molecular realizamos o isolamento do DNA dos microrganismos, a PCR e então o sequenciamento, para as regiões amplificadas e sequenciadas serem usadas no programa Blast, do NCBI, que compara as seqüências com uma base de dados. Optamos pela região ITS do organismo 6 e o gene 16s do organismo 1, pois estas regiões possuem partes altamente conservadas, o que permite o uso de Primers universais, e partes diferenciadas, o que permite a análise com base na similaridade em nível de gênero e espécie.

No dia 12 de abril houve a extração do DNA do microrganismo 1 com o Kit Promega, seguindo o manual “Wizard® Genomic DNA Purification Kit Technical Manual”, tendo sido

feita em seguida uma PCR (Reação de Polimerase em Cadeia). Os reagentes utilizados foram: 1µL (5pM) de Primer F; 1µL (5pM) de Primer R; 0,5µL de DMSO 100%; 0,5µL de Água Milliq; 6µL de GoTaq® Green Master Mix (2X: GoTaq® DNA Polymerase, Reaction Buffer (pH 8.5), 400µM dATP, 400µM dGTP, 400µM dCTP, 400µM dTTP and 3mM MgCl₂); 1µL de Amostra. Foram 35 ciclos no termociclador nas temperaturas e tempos: 5 minutos a 95°C; 30 segundos a 95°C; 30 segundos a 61,5°C; 1 minuto a 72°C; 10 minutos a 72°C.

Em seguida foi realizada a eletroforese dos produtos da PCR, usando gel de agarose 0,8% (0,4g) e completando com Tampão TAE até 50g (49,6g). A mistura foi colocada em forno micro-ondas para fusão, tendo então sido adicionado Sybr, que consiste em um intercalante inespecífico de DNA fluorescente (que permite visualização de bandas em luz UV), além de ter sido também adicionado loading buffer. A corrida no gel foi de 80V por 40 minutos.

A PCR foi então refeita, por ter apresentado resultados inesperados na eletroforese. Nesta segunda PCR o tempo de extensão do annealing foi aumentado para 2 minutos, tendo sido feitos 6 tubos com gradientes de temperatura também de annealing. As temperaturas foram: A = 50,9°C; B = 52,9°C; C = 55,6°C; D = 59,5°C; E = 61,5°C; Controle negativo = 55,6°C.

Realizamos então a extração de DNA do microrganismo 6 com o Kit Promega, realizando algumas modificações no protocolo: Inicialmente removemos as colônias de placas e adicionamos nitrogênio líquido às colônias em um cadinho para macerar com o pistilo até virar um pó (lise física). Então transferimos o macerado para 3 eppendorfs, tendo sido depositada a quantidade de 75mg em cada Eppendorf. Foram adicionados 600µL de solução 50mM de lise nuclear. Após este procedimento os Eppendorfs foram levados ao vortex para homogeneização. Em seguida foram aquecidos por 15 minutos a 65°C e adicionados 3µL de RNase, invertendo-se o tubo para homogeneização. Em seguida foram novamente aquecidos por 15 minutos a 37°C e aguardado o resfriamento em temperatura ambiente. Foram então adicionados 200µL de Solução de precipitação de proteína (ácido) e levados ao vortex por 20 segundos. O procedimento seguinte consistiu em depositar os Eppendorfs no gelo por 5 minutos, e em seguida centrifugando-se por 3 minutos a 16.000xg, até formar um precipitado. O sobrenadante foi então transferido para outro Eppendorf, para ser descartado, mantendo-se apenas o precipitado. Nos 3 Eppendorfs com precipitado foram adicionados 600µL de isopropanol, para precipitar o DNA, vertendo-se para ajudar a movimentação do DNA e seguida por centrifugação por 1 minuto. Após este procedimento foram adicionados 600µL de Etanol 70%, para manter o DNA em suspensão, seguindo-se nova centrifugação por 1 minuto. As 3 amostras foram secas e nomeadas separadamente como A, B e C.

Prosseguimos a realizar a PCR do organismo 6, tendo sido inicialmente diluídos os primers de 100µM para 5pM. Foram levados 10 tubos ao termociclador (9 com amostra e 1 controle branco), tendo sido utilizados os 3 DNAs extraídos previamente no dia anterior, dos 3 Eppendorfs, conforme informado acima (separados em amostras A, B e C). Cada amostra foi submetida a 3 temperaturas diferentes (51°C; 56,1°C; 60°C).

Para realização da PCR usamos um Eppendorf geral onde foi colocado: 10 µL de Primer F (5pM); 10µL de Primer R (5pM); 5µL de DMSO 100%; 5µL de Água Milliq; 60µL de GoTaq Green Master Mix. Do total de 90µL desta mistura, foram separados 9µL para 10 Eppendorfs, e adicionado 1µL de amostra em cada Eppendorf (excluído o de controle). A PCR foi programada para 35 ciclos, tendo seus tempos e temperaturas sido: 5 minutos a 95°C; 1 minuto a 95°C; 30 segundos ao gradiente de temperatura (51°C; 56,1°C; 60°C); 1 minuto e 30 segundos a 72°C; 10 minutos a 72°C.

Em seguida foi realizada a eletroforese dos produtos das PCRs de ambos os microrganismos. Considerando-se que o resultado desta PCR mostrou-se insatisfatório (as bandas mostraram-se relativamente apagadas), optou-se, para uma melhor visualização das bandas, por realizar novamente a PCR de ambos os microrganismos.

PCR do organismo 6: 5µL de Primer F (5pM); 5µL de Primer R (5pM); 2,5µL de DMSO 100%; 2,5µL de Água Milliq; 30µL de GoTaq Green Master Mix; 5µL de Amostra (previamente extraída no dia 18 de abril).

PCR do organismo 1 (com DMSO 100%): 10µL de Primer F (5pM); 10µL de Primer R (5pM); 5µL de DMSO 100%; 10µL de Água Milliq; 60µL de GoTaq Green Master Mix; 5µL de Amostra. Esta quantidade de 100µL foi então dividida em 2 Eppendorfs (com 50µL em cada).

PCR do organismo 1 (sem DMSO 100%): 10µL de Primer F (5pM); 10µL de Primer R (5pM); 15µL de Água Milliq; 60µL de GoTaq Green Master Mix; 5µL de Amostra. Esta quantidade de 100µL foi também dividida em 2 Eppendorfs (50µL em cada).

Os tempos e temperaturas dos 35 ciclos de PCR de ambos os organismos foram: 5 minutos a 95°C; 1 minuto a 95°C; 30 segundos a 56°C; 2 minutos a 72°C; 10 minutos a 72°C.

Realizamos então a eletroforese dos produtos da PCR e, com base nos resultados, não foi mais necessário repetir o processo. No dia 24 de abril enviamos as amostras para sequenciamento no Centro de Pesquisa sobre o Genoma Humano e Células Tronco da USP.

Seguindo os protocolos disponibilizados no site do CP acima informado, foram ajustadas as concentrações dos produtos da PCR: 2ng/µL para o organismo 6 e 40ng/µL para o organismo 1. A quantidade de amostra usada foi de 0,7µL para o ITS (organismo 6) e 0,5µL para os 16s (organismo 1). Para garantir a eficiência do sequenciamento as

quantidades foram arredondadas para cima. Foram enviadas 3 amostras: uma primeira, denominada EM1, onde a região ITS era a desejada para sequenciamento com quantidade total de amostra de 1µL no Eppendorf, contendo o primer ITS1; uma segunda amostra, denominada EM2, onde o gene 16s era o desejado para sequenciamento e a quantidade de amostra total no Eppendorf foi de 0,8µL, contendo o primer P027 (*Forward*); e uma terceira amostra, denominada EM3, onde o gene 16s era o desejado para sequenciamento, com uma quantidade de amostra total de 0,8µL no Eppendorf, contendo o primer P1387 (*Reverse*). Foram completados até 5µL e adicionados 2,5µL dos respectivos primers nas amostras desejadas (ITS1 na EM1, P027 na EM2 e P1387 na EM3).

Foram então realizados testes enzimáticos para quantificar a eficiência da detergência do produto final. O detergente foi desenvolvido a partir dos compostos: Solvente orgânico (álcool); Emulsificante não iônico; Tampão fosfato; Glicerol; Extrato enzimático.

O teste foi realizado com um mix de reação para cada substrato específico. Teste de amilase: 500µL de detergente; 100µL de tampão fosfato; 70µL de amido; quantidade suficiente para 1mL de água potável. Teste de protease: 500µL de detergente; 100µL de tampão fosfato; 200µL de caseína; quantidade suficiente para 1mL de água potável. Teste de lipase: 500µL de detergente; 100µL de azeite; 3 gotas de Tween; 100µL de tampão fosfato; quantidade suficiente para 1mL de água potável. Teste de DNase: 500µL de detergente; 100µL de tampão fosfato; 200µL de caldo de DNA; quantidade suficiente para 1mL de água potável.

Todos os mix foram incubados a 30°C durante 3 horas. Após este período foram coletados os resultados da capacidade de detergência.

4. Resultados e Discussão

Nos testes de produção enzimática, com meios de cultura específicos, o organismo 1 se desenvolvia no meio com amido, sendo, portanto, um produtor de amilase. Já o organismo 6 se desenvolvia nos meios com proteína (caseína), lipídio (azeite) e DNA (esperma de salmão), sendo, portanto, um produtor de protease, lipase e DNase.

A eletroforese do dia 13 de abril da PCR do organismo 1 não obteve resultados satisfatórios, uma vez que nenhuma banda apareceu. Por esse motivo foi realizada outra PCR, porém desta vez também com o organismo 6. A eletroforese desta segunda PCR ocorreu no dia 20 de abril, onde verificou-se que o microrganismo 6 teve temperatura ótima com bandas claras a 56°C e a 60°C, e que o microrganismo 1 teve temperatura ótima com bandas aparentes (porém ainda fracas) a 52,9°C e a 55,6°C.

Tendo em consideração estes resultados, foi feita uma terceira PCR de ambos os organismos, tendo sido feita a eletroforese no dia 21 de abril. Os resultados foram todos positivos, com bandas fortes e visíveis.

Como resultados do sequenciamento dos microrganismos obtivemos as sequências, GGATGTTTCATAACCCTTTGTTGTCCGACTCTGTTGCCTCCGGGGCGACCCTGCCTTCGG GCGGGGGCTCCGGGTGGACACTTCAAACCTTTGCGTAACTTTGCAGTCTGAGTAACTT AATTAATAAATTAAACTTTTAACAACGGATCTCTTGTTCTGGCATCGATGAAGAACGC AGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACG CACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCACTACT CAAGCCTCGCTTGGTATTGGGCAACGCGGTCCGCCGCGTGCCTCAAATCGACCGGCTG GGTCTTCTGTCCCCTAAGCGTTGTGGAACTATTCGCTAAAGGGTGTTCGGGAGGCTAC GCCGTAAAACAACCCCATTTCTAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAA CTTAAGCATA, para o fungo, e para a bactéria obtivemos a sequência *forward* AGTCGAGCGAATGGATTAAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTA ACACGTGGGTAACCTGCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACC GGATAAYATTTTGAACYGCATGGTTCRAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACCTTATG GATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATG CGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTC CTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACG CCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAACCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTG CTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGT GCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAA GCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGG TCAT e reverse GTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGAAGTTAACGCA TTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGG GGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACC AGGTCTTGACATCCTCTGAAAACCCTAGAGATAGGGCTTCTCCTTCGGGAGCAGAGTGA CAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAA CGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCC GGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTG GGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAAAGAGCTGCAAGACCGCGAGGTGGAGCT AATCTCATAAAACCGTTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCT.

Essas sequências foram utilizadas no programa Blast, do NCBI, que comparou as sequências com seu banco de dados e identificou uma similaridade de 100% com os microrganismos das espécies *Bacillus cereus* e *Cladosporium cladosporioides*, para os organismos 1 e 6, respectivamente.

Podemos ver na figura 5 o microrganismo 1, a bactéria *Bacillus cereus*, em cultura em placa, e na figura 6 podemos ver o microrganismo 6, o fungo *Cladosporium cladosporioides*, também em placa.

Microrganismo 1 em placa



Figura 5 – Bactéria *Bacillus cereus*, microrganismo 1, cultivado em placa.

Microrganismo 6 em placa



Figura 6 – Fungo *Cladosporium cladosporioides*, microrganismo 6, cultivado em placa

Na figura 7 podem ser verificados os resultados do teste de detergência. Na coluna A tem-se os substratos nos quais foram aplicados o detergente, e na coluna B tem-se o controle negativo (apenas com substrato, mas sem o detergente).

Na fileira 1 foi testada a capacidade de detergência da amilase, colocando-se amido como substrato. O teste foi revelado colocando-se lugol, que contém iodo (I_2) que cora o amido, fazendo com que o meio fique azul escuro. Como pode ser observado, o controle negativo ficou corado, porém a coluna A não escureceu, demonstrando que houve quebra do amido por ação da amilase.

Na fileira 2 foi testada a capacidade de detergência da protease, colocando-se caseína (proteína) como substrato. O teste foi revelado adicionando-se ácido acético, que precipita proteína, deixando o meio levemente opaco. Na coluna B é possível observar que o meio está mais opaco do que na coluna A, por não ter havido quebra da proteína, como na coluna A, por ação do detergente.

Na fileira 3 foi testada a capacidade de detergência da lipase, colocando-se azeite de oliva (lipídio) como substrato. O teste foi revelado realizando-se uma titulação com NaOH 50mM e fenolftaleína. A fenolftaleína, por ser um indicador ácido base, torna a solução em cor rosa na presença de uma base. Foi adicionada em ambas as colunas, e contadas quantas gotas de NaOH foram necessárias para corar o meio. No controle negativo (coluna B) foram adicionadas 7 gotas até ficar rosa, e no controle positivo (coluna A) foram adicionadas 46 gotas. Foi necessário adicionar mais gotas de NaOH na coluna A (com detergente) do que na coluna B, pois este estava mais ácido, por causa da quebra dos lipídios, que libera ácido graxo. Como mais gotas foram necessárias no controle positivo, pode-se admitir que o meio estava menos alcalino, o que demonstra atividade do detergente.

Na fileira 4 foi testada a capacidade hidrolítica da DNase, utilizando-se DNA como substrato. O DNA usado foi extraído de meio DNase comercial (esperma de salmão). Foi adicionado HCl 1M, que precipita DNA, em ambas as colunas, observando-se que na coluna B formou-se uma camada de precipitado levemente opaco, o que denota a presença de DNA. Na coluna A não houve formação do precipitado, o que demonstra a ausência de DNA, por haver quebra pela enzima.

Foi realizada dosagem de proteína total no mix liofilizado e no detergente, obtendo-se 6,2mg/mL e 1,74 mg/mL respectivamente. Foi utilizado o método do BCA (Ácido bicinicionínico Pierce®), com leituras em comprimento de onda de 530nm.

É importante destacar que o detergente foi testado sobre DNAs extraído de *Sacharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli* e de folhas *Saintpaulia* sp.

Os resultados obtidos foram os esperados, já que ao final do projeto foi produzido um detergente com as enzimas planejadas. Após os testes, foi observada a eficiência do

detergente, no qual todas as enzimas contidas no mesmo mostraram atividade degradativa (hidrolítica) dos substratos correspondentes.

Teste enzimático de verificação de detergência

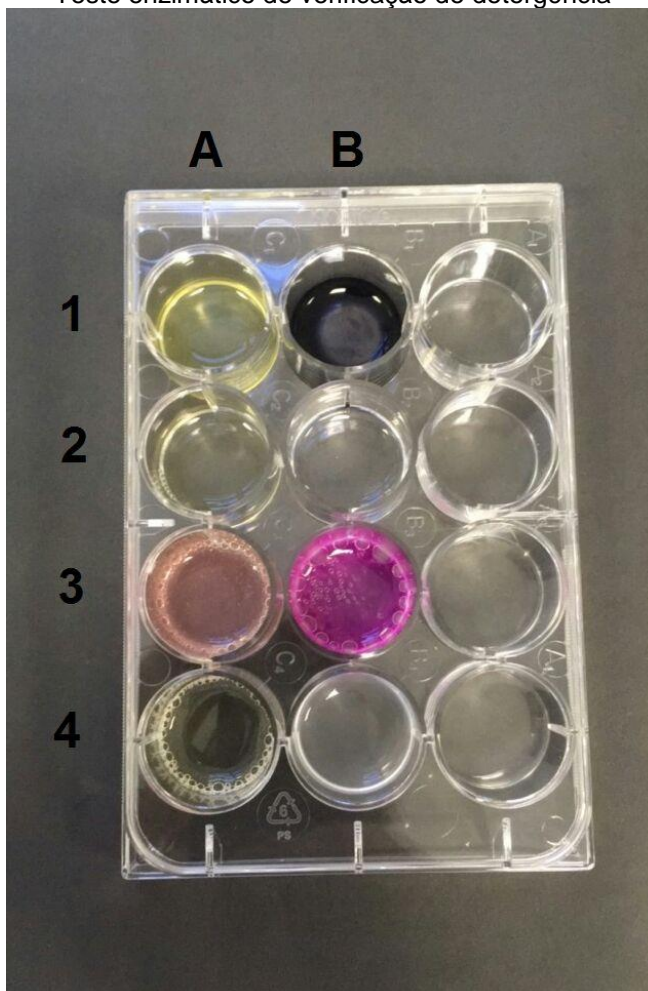


Figura 7 – Teste realizado para verificar a capacidade hidrolítica das enzimas em estudo contidas no detergente desenvolvido, com os substratos: 1 amido; 2 proteína; 3 lipídio; 4 DNA. Fila A: teste; fila B: controle negativo

5. Considerações Finais

Como discutido no item acima, os resultados obtidos foram positivos. As enzimas foram extraídas com sucesso, não tendo sua atividade perdida ao serem misturadas no mix, o detergente foi desenvolvido e testado com sucesso e os microrganismos foram identificados.

Vale ressaltar que o microrganismo 6, o fungo, se demonstrou um produtor de DNase, sendo que na literatura e em pesquisas publicadas recentemente não há nenhum indício de um fungo produtor desta enzima.

6. Referências

- APPOLAIRE, A.; COLOMBO, M.; BASBOUS, H.; GABEL, F.; GIRARD, E.; FRANZETTI, B. TET peptidases: A family of tetrahedral complexes conserved in prokaryotes. *Biochimie*. v. 122, p. 188-96, 2016.
- BARRERA, G.N.; LEÓN, A.E.; RIBOTTA, P.D. Use of enzymes to minimize the rheological dough problems caused by high levels of damaged in starch-gluten systems. *J Sci Food Agric*. 2015.
- BLOOM, M.V.; FREYER, G.A.; MICKLOS, D.A. Laboratory DNA Science: an Introduction to Recombinant DNA Techniques and Methods of Genoma Analysis. Benjamin/Cummings Publishing company, Inc., Canada, 1996.
- BOLLAG, D.M.; ROSYCKI, M.D.; EDELSTEIN, S.J. Protein Methods. 2nd ed. Wiley-Liss, Inc., New York, 1996.
- CARRASCO, M.; VILLARREAL, P.; BARAHONA, S.; ALCAÍNO, J.; CIFUENTES, V.; BAEZA, M. Screening and characterization of amylase and cellulase activities in psychrotolerant yeasts. *BMC Microbiol*. v.6, n.1, p.21-25, 2016.
- CARVALHO, A.C.; FONSECA, T DE S.; MATTOS, M.C.; OLIVEIRA, C.M.; LEMOS, T.L.; MOLINARI, F.; ROMANO, D.; SERRA, I. Recent Advances in Lipase-Mediated Preparation of Pharmaceuticals and their Intermediates. *Int J Mol Sci*. v. 16, n. 12, p. 29682-716, 2015.
- CHAMPE, P.C.; HARVEY, R.A.; FERRIER, D.R. Bioquímica ilustrada. 2da. Ed. Artmed, São Paulo, 2007.
- FERNÁNDEZ, L.T.M.; BIBB, M.J. Use of the meganuclease I-SceI of *Saccharomyces cerevisiae* to select for gene deletions in actinomycetes. *Sci Rep*.v. 4, p:7100, 2014.
- HERRERA, B.L.; TOLEDO, M.F.J.; MIOSO, R. Enzymes and bioproducts by the ascomycete fungus *Paecilomyces variotii*. *J Appl Microbiol*. v. 119, n.6, p.1455-66, 2015.
- HOMAEI, A.; GHANBARZADEH, M.; MONSEF, F. Biochemical features and kinetic properties of α -amylases from marine organisms. *Int J Biol Macromol*. v. 83, p. 306-14, 2016.
- KLOSTERMAN, S.J.; CHEN, J.; CHOI, J.J.; CHINN, E.E. HADWIGER, L.A. Characterization of 20 kDa DNase elicitor from *Fusarium solani* f. sp. Phaseo and its expression at the onset of induced resistance in *Pisum sativum*. *Mol Plant Pathol*. v. 2, n. 3, p. 147-58, 2001.
- KUMAR, A.; DHAR, K.; KANWAR, S.S.; ARORA, P.K. Lipase catalysis in organic solvents: advantages and applications. *Biol Proced Online*. v. 18, n. 2, p. 12575-016, 2016.
- LANDRY, K.S.; VU, A.; LEVIN, R.E. Purification of an inducible DNase from a thermophilic fungus. *Int J Mol Sci*. v. 15, n. 1, p. 1300-14, 2014.
- LOHR, D.; KOVACIC, R.T.; VAN HOLDE, K.E. Quantitative analysis of the digestion of yeast chromatin by staphylococcal nuclease. *Biochemistry*. v.16, n. 3, p. 463-71, 1977.
- MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. Brock Biology of microorganisms. 8th ed. Prentice-Hall, Inc., New Jersey, 1997.
- NELSON, D.L.; COX, M.N. Princípios de Bioquímica de Lehninger. 6ta. ed. Artmed, São Paulo, 2014

VAQUERO, M.E.; BARRIUSO, J.; MARTÍNEZ, M.J.; PRIETO, A. Properties, structure, and applications of microbial sterol esterases. *Appl Microbiol Biotechnol.* v. 100, n. 5, p. 2047-61, 2016.

VAZ, M.; CHOUPINA, A. Lipases: Biocatalizadores da Hidrólise de triacilglicerois. *Revista Eletrônica de Biologia.* v. 5, n. 3, p. 42-58, 2012.

WANG, Y.; BARTH, D.; TAMMINEN, A.; WIEBE, M.G. Growth of marine fungi on polymeric substrates. *BMC Biotechnol.* v.16, n. 1, p. 3-9, 2016.

Contatos: danielcsi@hotmail.com e briveron@uol.com.br