

Manual prático para análise de produção enzimática por microrganismos (Teste de triagem em placas)

*Ronney Fernandes Chagas
Patrícia Thieme Onofri Saiki*

*Coordenação de Biologia
Departamento II
IFG – Câmpus Goiânia*

SUMÁRIO

1- Referencial teórico

1.1 - Produção de enzimas e bioprodutos por microrganismos.....3

1.2 Análise qualitativa da produção enzimática em placas3

2- Triagem de produção enzimática em placa

2.1 - Materiais5

2.2 - Procedimentos6

3- Referências bibliográficas8

1- REFERENCIAL TEÓRICO

1.1 – Produção de enzimas e bioprodutos por microrganismos

Os microrganismos possuem uma importância fundamental para os processos biotecnológicos devido à sua pluralidade metabólica, o que permite inúmeras aplicações em escala industrial (MADIGAN *et al.*, 2018).

Além de serem utilizados diretamente em bioprocessos para a síntese de produtos de grande valor, como fármacos, combustíveis e alimentos, a diversidade metabólica microbiana contribui significativamente para o setor ambiental e industrial com a produção de enzimas, vitaminas, solventes e outros compostos de interesse (MADIGAN *et al.*, 2018).

As enzimas são moléculas orgânicas que atuam como catalisadores biológicos altamente especializados. Geralmente de natureza proteica, elas aumentam drasticamente a velocidade das reações biológicas ao reduzirem a energia de ativação necessária para que a reação ocorra (NELSON E COX, 2021).

A alta especificidade da enzima em relação ao seu substrato permite o desenvolvimento de processos industriais mais eficientes e rentáveis. Consequentemente, a demanda por enzimas com propriedades específicas e elevada estabilidade é crescente, especialmente aquelas que resistem às condições operacionais rigorosas, como variações extremas de temperatura, pH e osmolaridade (BATHIA E HONG, 2017).

Neste contexto, a triagem e a seleção de microrganismos produtores destes bioprodutos demonstram ser ferramentas essenciais para a descoberta de novas moléculas com potencial industrial. Isso se deve ao fato de que os microrganismos apresentam uma vasta gama de estratégias catabólicas, permitindo o acesso e a utilização de diversos nutrientes e, consequentemente, a síntese de uma grande variedade de enzimas, que apresentam imenso potencial de aplicação em diversos processos biotecnológicos e industriais (LAMEIRA, 2020).

1.2 – Análise qualitativa da produção enzimática em placas

A triagem qualitativa de microrganismos produtores de enzimas de interesse industrial é a etapa inicial e crucial na bioprospecção. Este método utiliza técnicas simples e de alto rendimento baseadas na semeadura dos microrganismos em meios de cultura

sólidos em placas de Petri contendo o substrato específico da enzima a ser detectada. A produção e a secreção da enzima pelo microrganismo são evidenciadas pela sua atividade sobre o substrato no meio. Por exemplo, para detectar amilases (enzimas que quebram amido), o meio contém amido. Após a incubação, a adição de um agente revelador (como o iodo, que reage com amido não quebrado) permite visualizar uma zona de clareamento (halo) ao redor da colônia microbiana. A presença e o tamanho desse halo são indicadores da capacidade e da intensidade da produção enzimática do isolado (MADIGAN *et al.*, 2018).

O sucesso da análise qualitativa depende da escolha adequada do meio de cultura e do agente revelador. O meio deve fornecer todos os nutrientes essenciais para o crescimento do microrganismo, além de conter uma concentração ideal do substrato da enzima alvo (LAMEIRA *et al.*, 2020). Essa técnica não só confirma se o microrganismo é capaz de produzir a enzima, mas também permite selecionar rapidamente, dentre centenas de isolados, aqueles que exibem a maior atividade inicial (identificada pelo maior diâmetro do halo). Isso direciona o foco para os candidatos mais promissores, que seguirão para a etapa de triagem quantitativa (DEMAIN e DAVIES, 2010).

Assim, a metodologia explora a especificidade e a capacidade de secreção das enzimas microbianas diretamente na matriz do meio. Esse processo permite a rápida diferenciação entre linhagens produtoras e não produtoras, sendo um passo fundamental para a exploração industrial, que busca enzimas com características como termostabilidade e atividade em pH extremos. A identificação desses isolados é a base para o desenvolvimento de bioprocessos mais eficientes e sustentáveis em áreas como produção de alimentos, detergentes e biocombustíveis (MADIGAN *et al.*, 2018; LAMEIRA *et al.*, 2020).

Neste contexto, o objetivo do presente material é estabelecer um protocolo padronizado de triagem e identificação de microrganismos produtores de enzimas de relevante interesse.

2- TRIAGEM DE PRODUÇÃO ENZIMÁTICA EM PLACA

2.1 – Materiais

- ✓ Suspensão de microrganismos padronizadas a 10^8 UFC.mL⁻¹;
- ✓ Pipeta automática e ponteiros;
- ✓ Pinça estéril;
- ✓ Canudos esterilizados e cortados (aproximadamente 1 cm);
- ✓ Régua ou paquímetro;
- ✓ Placas contendo os meios específicos para cada teste enzimático.

Meio para atividade de amilase:

- Composição do meio:
Peptona (5 g/L);
Extrato de levedura (3 g/L);
Amido solúvel (1 g/L)
Ágar (15 g/L).
- Para revelação do halo após período de incubação: tratamento com solução de lugol (iodo-iodeto de potássio 2%) por cerca de 30 minutos.

Meio para atividade de pectinase:

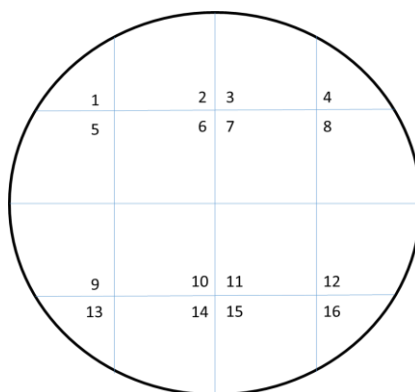
- Composição do meio:
Peptona (5 g/L);
Extrato de levedura (3 g/L);
Pectina (5 g/L);
Ágar (15 g/L).
- Para revelação do halo após período de incubação: tratamento com solução de álcool etílico (95%) ou solução de HCl (1N) por cerca de 30 minutos.

Meio para atividade de proteases:

- Composição do meio (ágar gelatina):
Gelatina incolor (1 g/L);
Ágar (15 g/L);
Tampão citrato-fosfato (0,1M) pH 5,0
- Composição do meio (ágar caseína):
Leite desnatado (1 g/L);
Ágar (15 g/L);
Tampão citrato-fosfato (0,1M) pH 5,0
- Possível visualização dos halos de produção enzimática sem necessidade de solução de revelação.

2.1.2 – Procedimentos

- ✓ Preparar os meios conforme protocolo acima.
- ✓ Antes de adicionar os meios nas placas, delimitar as áreas onde serão inoculados os microrganismos (em casos de análises múltiplas).
- ✓ Para facilitar, identifique as cepas e as respectivas localizações como esquematizado no exemplo abaixo para teste com 16 microrganismos.



- ✓ Com o meio ainda parcialmente solidificado, adicionar os canudos no centro da área demarcada com auxílio de uma pinça estéril, posicionando-os na vertical para formação da área de inoculação (Figura 1).

Obs: Antes de adicionar o canudo, certifique se este, estando posicionado na vertical, não impede o fechamento da placa. Caso os canudos estejam impedindo o fechamento, ajuste o tamanho ao cortá-los.

- ✓ Adicione a suspensão de microrganismos no interior do canudo após completa solidificação do meio (Figura 1).
- ✓ Incubar as placas a 30°C e acompanhar o crescimento das colônias por 3 dias para leveduras e bactérias ou 7 dias para fungos filamentosos.
- ✓ Após incubação, avaliar a formação dos halos de produção, seja pela visualização direta das zonas de ação enzimática (proteases) ou pelo tratamento com as soluções de revelação (amilase e pectinase).
- ✓ Medir os halos com auxílio de um paquímetro ou régua (Figura 1).

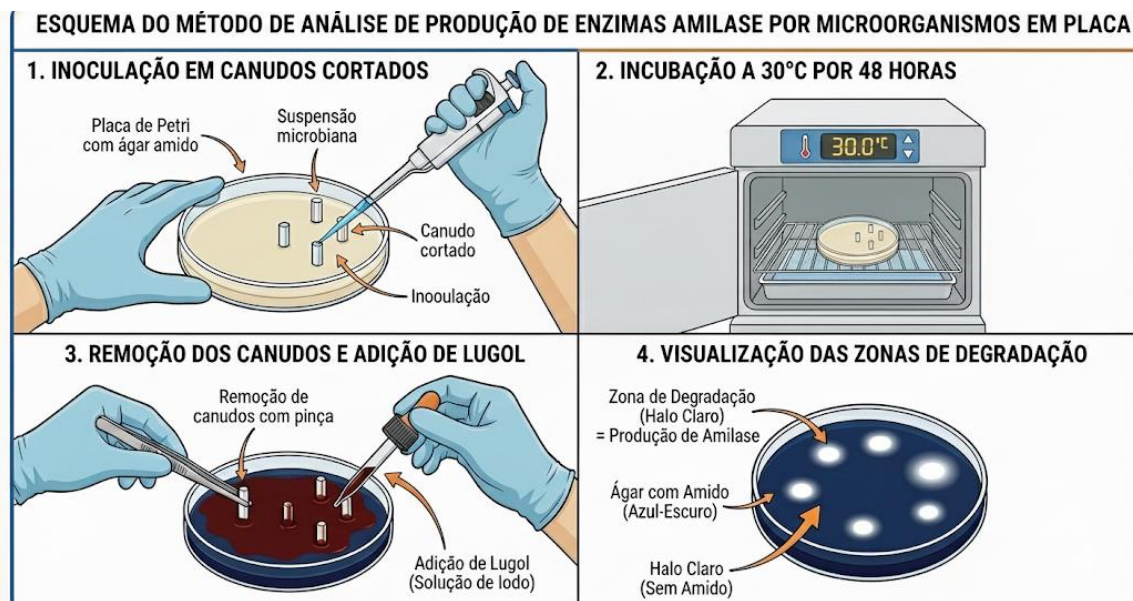


Figura 1: Esquema das etapas de triagem de microrganismos produtores de amilase por metodologia em placa. Os procedimentos para análise de produção das demais enzimas seguem as mesmas etapas, ressalvadas as diferenças de meios e o modo de revelação dos halos. Fonte: imagem gerada por inteligência artificial (<https://gemini.google.com/app>).

3-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

DEMAIN, A. L., DAVIES, J. **Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology**. 3. ed. Washington, D.C.: ASM Press, 2010

LAMEIRA, C. *et al.* **Enzimologia Aplicada à Indústria**. Viçosa: UFV, 2020.

MADIGAN, M. T., MARTINKO, J. M., BUCKLEY, D. H., STAHL, D. A. **Brock: Biologia dos Microrganismos**. 15. ed. Porto Alegre: Artmed, 2018.

NELSON, D. L., COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 7. ed. Porto Alegre: Artmed, 2021.

ANOTAÇÕES