

## CAPÍTULO 7

# BIOPROSPECÇÃO *IN SÍLICO* DE MICROORGANISMOS PRODUTORES DE $\beta$ -AMILASE NO SOLO

*Data de submissão: 06/04/2023*

*Data de aceite: 02/05/2023*

### **Diana Liz Jimenez Rolão**

Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, Universidade Federal da Grande Dourados  
Dourados - Mato Grosso do Sul  
<http://lattes.cnpq.br/8994898565098176>

### **João Vítor de Andrade dos Santos**

Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Grande Dourados  
Dourados - Mato Grosso do Sul  
<http://lattes.cnpq.br/2771209341375012>

### **Pamella Fukuda de Castilho**

Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Grande Dourados  
Dourados - Mato Grosso do Sul  
<http://lattes.cnpq.br/9028112104624552>

### **Fernanda Galvão**

Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Grande Dourados  
Dourados - Mato Grosso do Sul  
<http://lattes.cnpq.br/5467407206548408>

### **Stéfani de Oliveira Rosa**

Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Grande Dourados  
Dourados - Mato Grosso do Sul  
<http://lattes.cnpq.br/9275841012142167>

### **Maricy Raquel Lindenbah Bonfá**

Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, Universidade Federal da Grande Dourados  
Dourados - Mato Grosso do Sul  
<http://lattes.cnpq.br/5670504878145026>

### **Rodrigo Matheus Pereira**

Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, Universidade Federal da Grande Dourados  
Dourados - Mato Grosso do Sul  
<http://lattes.cnpq.br/8155952045293310>

**RESUMO:** Entre os diversos tipos de enzimas obtidas a partir de fontes microbianas, a  $\beta$ -amilase possui uma ampla aplicação em processos industriais, como na indústria têxtil, fermentação, alimentos, cervejarias e também com potencial atividade antioxidante. Em vista disso, a  $\beta$ -amilase é essencial e fundamental para a biotecnologia e atualmente, novas abordagens que incluem ferramentas de bioinformática para análises de dados e biologia molecular, viabilizam a bioprospecção *in-sílico* de informações, além da análise de microrganismos sem a necessidade de isolamento e cultivo em

laboratório, sendo possível obter as seqüências gênicas desejadas diretamente dos dados metagenômicos. O presente trabalho teve como objetivo identificar e quantificar os genes codificantes de  $\beta$ -amilase que estejam presentes no metagenoma da microbiota de duas amostras de solos, utilizando ferramentas de bioinformática para análise dos dados. Após determinar os genes responsáveis pela produção de  $\beta$ -amilase, os mesmos foram identificados quanto à origem taxonômica dos microrganismos. Os resultados obtidos demonstraram 2368 seqüências que apresentaram similaridade com a enzima  $\beta$ -amilase e sendo constatado 901 microrganismos. A bioprospecção desses microrganismos elucidou novas fontes produtoras de  $\beta$ -amilase sendo esta uma perspectiva de grande valia de alternativa no controle do estresse oxidativo.

**PALAVRAS-CHAVE:** Hidrolase, bioinformática, metagenômica.

## IN-SILICO BIO-PROSPECTING OF B-AMYLASE-PRODUCING MICROORGANISMS IN SOIL

**ABSTRACT:** Among the various types of enzymes obtained from microbial sources,  $\beta$ -amylase has a wide application in industrial processes, such as in the textile industry, fermentation, food, breweries, and also with potential antioxidant activity. In view of this,  $\beta$ -amylase is essential and fundamental to biotechnology and currently, new approaches that include bioinformatics tools for data analysis and molecular biology, enable in-silico bio-prospecting of information, besides the analysis of microorganisms without the need for isolation and cultivation in the laboratory, being possible to obtain the desired gene sequences directly from metagenomic data. The present work aimed to identify and quantify the genes encoding  $\beta$ -amylase that are present in the metagenome of the microbiota of two soil samples, using bioinformatics tools for data analysis. After determining the genes responsible for  $\beta$ -amylase production, they were identified as to the taxonomic origin of the microorganisms. The results obtained showed 2368 sequences that presented similarity with the enzyme  $\beta$ -amylase and 901 microorganisms were identified. The bioprospecting of these microorganisms elucidated new sources of  $\beta$ -amylase producers and this is a perspective of great value as an alternative in the control of oxidative stress.

**KEYWORDS:** Hydrolase, bioinformatics, metagenomics.

## 1 | INTRODUÇÃO

A procura por novos compostos com ação antioxidante é uma realidade cada vez mais frequente no cenário científico devido as problemáticas associadas ao estresse oxidativo que atua em diferentes complicações a saúde (LOBO *et al.*, 2010). As espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, conhecidas como radicais livres desempenham funcionalidades importantes para o organismo vivo, entretanto, quando encontradas em excesso podem causar impactos irreversíveis a saúde humana a longo prazo. O surgimento de câncer, doenças inflamatórias, isquêmicas e neurológicas podem estar associadas ao estresse oxidativo (LOBO *et al.*, 2010; PHANIENDRA; JESTADI; PERIYASAMY, 2014). O estresse oxidativo está associado também na danificação de inúmeras vias de sinalização

prejudicando diversos processos biológicos, seja por modificações de proteínas, provocando inflamações, induzindo apoptose, prejudicando a função mitocondrial e muitos outros mecanismos (FORMAN; ZHANG, 2021). Desencadeando assim, a progressão patológica e intensificando os sintomas das doenças

No cenário do estresse oxidativo, a enzima  $\beta$ -amilase apresentou de forma inédita um potencial antioxidante descrito por Das e Kayastha (2018), neste estudo foi evidenciado que essa enzima pode ser uma nova alternativa no controle do estresse oxidativo. Na literatura científica essa enzima está relacionada também com diferentes perspectivas industriais no cenário de ciência e tecnologia em alimentos, podendo ser utilizada na produção de cervejas, sucos, xaropes e pães (ZHANG; YIP; WITHERS, 2010). Portanto a  $\beta$ -amilase consiste em uma importante enzima industrial de interesse biotecnológico e que pode ser sintetizada por microrganismos como bactérias e fungos (ZHANG *et al.*, 2017).

Considerando que os métodos convencionais para prospectar enzimas são geralmente caros, demorados e com baixa taxa de sucesso, explorar os bancos de dados biológicos com auxílio de ferramentas computacionais pode otimizar o processo de descoberta, com menor consumo de recursos e maior taxa de sucesso (TAN *et al.*, 2016). Uma das maneiras de buscar novos microrganismos produtores de enzimas de interesse industrial e de saúde pública é por meio da técnica metagenômica que possibilita realizar a bioprospecção microbiana por meio do DNA total da microbiota em diferentes ambientes sem a necessidade de cultivo (ELEND *et al.*, 2007, FAROOQ *et al.*, 2021).

Em comparação com as origens vegetal e animal, a  $\beta$ -amilase microbiana é a fonte mais popular de  $\beta$ -amilase industrial. A maioria dessa importante enzima industrial é sintetizada por microrganismos como bactérias e fungos (ZHANG *et al.*, 2017). Vale ressaltar que o solo é um habitat extremamente rico em diversidade microbiana, a abundância média de vida comporta de  $10^7$  a  $10^9$  de células microbianas com cerca de 10 mil diferentes espécies por grama de solo (CARDOSO; ANDREOTE, 2016).

Abrangendo milhares de espécies de bactérias, fungos, vírus e archaeas, o solo é um ótimo candidato para realizar bioprospecção de novas enzimas com potencial de aplicação na saúde (MATOS *et al.*, 2016). Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo analisar, por meio de abordagem metagenômica, se há microrganismos nas amostras de solo que são produtores de  $\beta$ -amilase com intuito de encontrar novas fontes dessa enzima de perfil antioxidante.

## 2 | MATERIAL E MÉTODOS

As amostras do solo são provenientes da Embrapa Agropecuária Oeste de Dourados - MS. Após extração de dna e sequenciamento, o material genético sequenciado foi previamente analisado utilizando programas de bioinformática descritos abaixo. O programa FastQC foi utilizado para avaliar a qualidade do sequenciamento, onde

sequências muito curtas ou de baixa qualidade foram filtradas pelo programa Prinseq-lite (SCHMIEDER; EDWARDS, 2011). O programa IDBA-UD (PENG *et al.*, 2012) foi utilizado para a montagem das sequências. O programa FragGeneScan (RHO; TANG; YE, 2010) foi usado para identificar as regiões codificantes chamadas de ORFs (open read frames). Todas as ORFs e análises acima descritas foram geradas no trabalho de RISSI (2015) e foram prospectadas para busca de  $\beta$ -amilase na presente pesquisa.

As sequências de DNA provenientes das duas amostras de solo foram comparadas com banco de dados de  $\beta$ -amilase, que foi criado a partir das sequências de  $\beta$ -amilase oriundas de diversos microrganismos do banco de proteínas do NCBI (National Center for Biotechnology Information). Para essa comparação, o alinhamento de sequências foi feito utilizando o programa Blastall (BORATYN *et al.* 2013).

O programa MEGAN6 (HUSON *et al.*, 2016) foi utilizado para a comparação e classificação taxonômica das sequências de  $\beta$ -amilases presentes em cada amostra. Diferentes gráficos foram construídos utilizando o mesmo programa para melhor visualização dos organismos de cada uma das amostras de solo que retornaram resultados. A comparação foi feita importando as sequências do resultado gerado pelo Blastall (BORATIN *et al.*, 2013).

Obtendo uma ampla gama de resultados para análise, utilizamos o InteractiVenn, que é uma ferramenta online gratuita que permite criar e visualizar diagramas de Venn interativos. Os diagramas de Venn são uma forma comum de representar conjuntos e suas interseções em um diagrama com sobreposições de círculos, sendo uma ferramenta útil para estudantes, pesquisadores e profissionais que precisam visualizar e analisar a interseção entre conjuntos de dados ou informações (HEBERLE *et al.*, 2015).

O programa STAMP (PARKS *et al.*, 2014) foi utilizado para realizar análises estatísticas e gerar um gráfico de barra de erro estendido comparando cada uma das amostras de solo entre elas. Nesta etapa foi necessário a exportação do arquivo gerado pelo MEGAN6 com as comparações dos resultados das duas amostras de solo além de um arquivo metadata que contém a identificação das amostras, dessa forma é possível gerar um dado estatístico que é conduzido entre pares de amostras, comparando o perfil de abundância taxonômica e apresenta os resultados com diferenças estatísticas com intervalo de confiança de 95%. Através dos gráficos gerados foi possível saber a qual fil e espécie pertencem os representantes que são estatisticamente diferentes nas amostras.

### 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

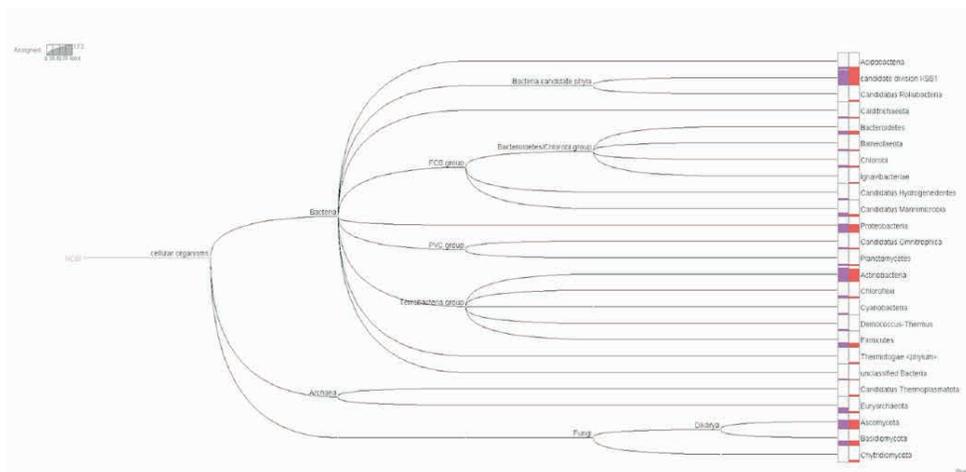
Um banco de dados local foi construído contendo 7523 sequências não-redundantes de aminoácidos da enzima  $\beta$ -amilase provenientes dos microrganismos: bactérias, fungos e archaea. Essas sequências foram provenientes do banco de dados biológicos secundário público “*identical protein groups*” do NCBI.

Após a comparação com o banco de dados local de 46630 sequências de aminoácidos da amostra de solo de mata nativa, 933 sequências apresentaram similaridade com a enzima  $\beta$ -amilase. A amostra de solo de plantio convencional apresentou 1435 sequências similares a  $\beta$ -amilase de um total de 71762 sequências de aminoácidos.

Esses resultados corroboram para identificação de novas fontes produtoras de  $\beta$ -amilase, levando em consideração o potencial antioxidante dessa enzima, esta é uma alternativa factível de aplicação quando comparada com outras metodologias de obtenção de  $\beta$ -amilase.

Ainda na perspectiva de verificar a presença de  $\beta$ -amilase em fontes microbianas, os arquivos de sequências que retornaram como resultados do BLAST, foram importados para o programa MEGAN 6. Esse software que inclui diversos pacotes para análises de dados metagenômicos e é utilizado para determinar a origem taxonômica dos microrganismos responsáveis pela produção da  $\beta$ -amilase.

A figura 1 a seguir, exibem a comparação dos resultados das duas amostras de solo correspondendo a árvore filogenética em nível de filo e gênero dos microrganismos, respectivamente. Pode ser observado na Figura 1 a predominância do domínio Bactéria, pertencendo a filós de Bacteria candidate phyla que apresenta o maior número de organismos identificados com 150 no total, FCB group com 22 organismos, PVC group apenas 2 organismos e Terrabacteria group com 148 organismos identificados

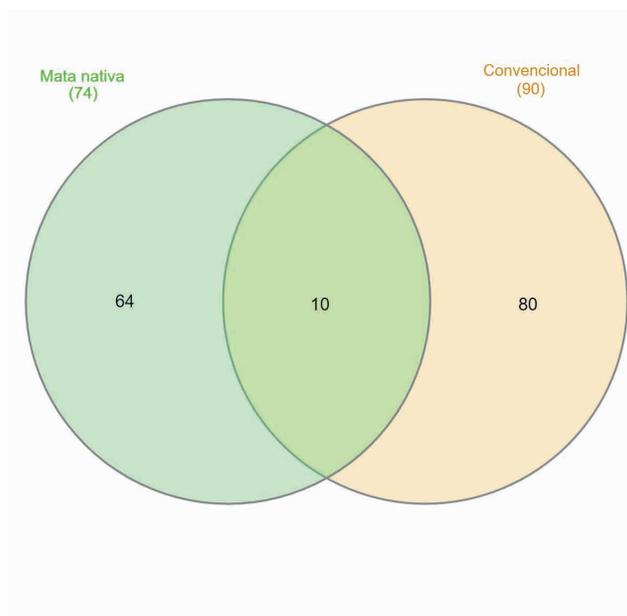


**Figura 1.** Árvore filogenética gerada pelo MEGAN6 abrangendo filo, considerando que a coloração rosa corresponde a amostra do solo de mata nativa e coloração roxa corresponde a amostra do solo de plantio convencional.

Portanto, com base na taxonomia foi obtido quantitativamente 739 bactérias, 19 archaea e 144 fungos capazes de sintetizar a enzima  $\beta$ -amilase. Diversos estudos comprovam a viabilização desses microrganismos para síntese da  $\beta$ -amilase, por exemplo

o *Saccharopolyspora* sp. que a amilase isolada relatou diversas novas propriedades em comparação com outras amilases microbianas (CHAKRABORTY, *et al.*, 2011), no artigo publicado por Bahrim *et al* em 2007 também relatam um microrganismo alternativo para síntese da  $\beta$ -amilase, no caso do estudo são *Streptomyces*.

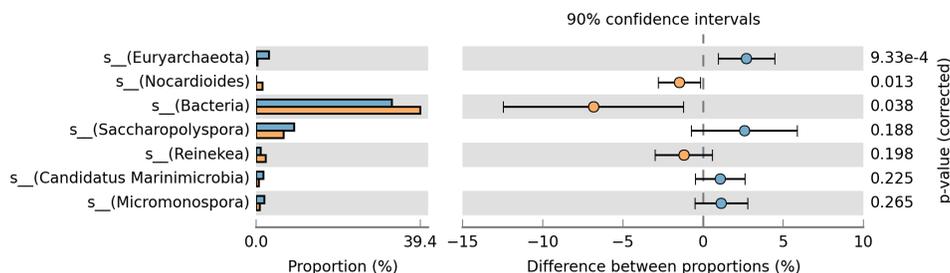
Na Figura 2 temos o diagrama de venn em nível de espécie, correspondendo ao número total de microrganismos identificados nas amostras, sendo 74 microrganismos no solo de mata nativa e 90 no solo de plantio convencional. Além desses resultados o programa InteractiVenn permite a visualização da inserção entre os conjuntos, ou seja, é possível analisar quais microorganismos são comuns nas duas amostras de solo.



**Figura 2.** Diagrama de venn gerada pelo InteractiVenn abrangendo espécie, considerando que a coloração verde corresponde a amostra do solo de mata nativa e coloração laranja corresponde a amostra do solo de plantio convencional.

Foi evidenciado, portanto, que as espécies microbianas comuns entre as amostras foi a *Calditrichaeota bacterium*, *Flammeovirga pacifica*, *Bacteroidetes bacterium*, *Aliifodinibius halophilus*, *Alphaproteobacteria bacterium*, *Candidatus Omnitrphica bacterium*, *Planctomycetes bacterium*, *Paenibacillus curdlanolyticus*, *Planococcus donghaensis e bacterium*.

Posteriormente o software STAMP foi usado para realizar a análise estatística, os resultados estão expressos na Figura 3.



**Figura 3.** Análise estatística com intervalo de confiança de 90%, sendo a coloração azul correspondente ao solo de mata nativa e coloração laranja ao solo de plantio convencional.

Foi observado que amostra do solo de mata nativa e amostra do solo de plantio convencional apresentaram diferença estatística significativa na proporção, principalmente em relação a espécie Bactéria que atualmente corresponde a *Candidatus Methylocidithermus pantelleriae* em comparação a outras espécies dos microrganismos resultantes. Além disso, foi observado que a espécie *Saccharopolyspora* do reino bactéria apresentou maior proporção para o solo de mata nativa, por outro lado as espécies bacterianas *Nocardioides* e *Reinekea* foi encontrado em maior proporção no solo de plantio convencional.

## 4 | CONCLUSÃO

Foram identificadas 2368 sequências que apresentaram similaridade com a enzima  $\beta$ -amilase e com a abordagem da metagenômica foi constatado 901 microrganismos diferentes, identificados respectivamente por filo, gênero e espécie. Foi observado também que o domínio bactéria apresentou maior quantidade de organismos que sintetizam a enzima de interesse comparado aos fungos e archaeas.

Este trabalho permitiu observar a diversidade de microrganismos do solo produtores da enzima  $\beta$ -amilase, evidenciando então que a metagenômica pode ser uma ferramenta no auxílio de identificação dessas enzimas, principalmente visto que a enzima esta associada no controle do estresse oxidativo, portanto novas fontes de obtenção da  $\beta$ -amilase é de grande valia na perspectiva de saúde.

## AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsa de iniciação científica e a Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD).

## REFERÊNCIAS

BAHRIM, G. E.; SCÂNTEE, M.; NEGOIȚĂ, T.G. Condições biotecnológicas de produção e utilização do complexo amilase e protease envolvendo bactérias filamentosas. **Os Anais da Universidade Dunarea de Jos Galati, Fascículo IV-Tecnologia Alimentar**, v. 1, p. 76-82, 2007.

BORATYN, G. M. et al. BLAST: a more efficient report with usability improvements. **Nucleic acids research**, v. 41, n. W1, p. W29-W33, 2013.

CARDOSO, E. J. B. N.; ANDREOTE, F. D. **Microbiologia do solo**. 2. ed. São Paulo: ESALQ, 2016.

CHAKRABORTY, S. et al. Characterization and stability studies on surfactant, detergent and oxidant stable  $\alpha$ -amylase from marine haloalkaliphilic *Saccharopolyspora* sp. A9. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 68, n. 1, p. 52-58, 2011.

DAS, R.; KAYASTHA, A. M. An antioxidant rich novel  $\beta$ -amylase from peanuts (*Arachis hypogaea*): Its purification, biochemical characterization and potential applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 111, p. 148-157, 2018.

ELEND, C. et al. Isolation and characterization of a metagenome-derived and cold-active lipase with high stereospecificity for (R)-ibuprofen esters. **Journal Biotechnol.**, v. 130, p. 370-377, 2007.

FAROOQ, M. A. et al. Biosynthesis and industrial applications of  $\alpha$ -amylase: a review. **Archives of Microbiology**, p. 1-12, 2021.

FORMAN, H.J., ZHANG, H. Targeting oxidative stress in disease: promise and limitations of antioxidant therapy. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 20, p. 689-709, 2021.

HEBERLE, H. et al. InteractiVenn: a web-based tool for the analysis of sets through Venn diagrams. **BMC Bioinformatics** v. 16, p-169, 2015.

HUSON, D. H. et al. MEGAN-LR: new algorithms allow accurate binning and easy interactive exploration of metagenomic long reads and contigs. **Biology direct**, v. 13, n. 1, p. 6, 2018.

LOBO, V. et al. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. **Pharmacognosy Reviews**, v. 4, n. 8, p. 118, 2010.

MATOS, E. R.; DURRER, A.; ANDREOTE, F. D. (org.). *Ecologia Microbiana*. In: CARDOSO, E. J. B. N.; ANDREOTE, F. D. **Microbiologia do solo**. 2. ed. Piracicaba: Esalq, 2016. Cap. 3. p. 1-221.

PARKS, D. H. et al. STAMP: statistical analysis of taxonomic and functional profiles. **Bioinformatics**, v. 30, n. 21, p. 3123-3124, 2014.

PENG, Y, LEUNG, HC, YUI, SM, CHIN, FY. IDBA-UD: a de novo assembler for single-cell and metagenomic sequencing data with highly uneven depth. **Bioinformatics**, v. 28, p. 1420-1428.

PHANIENDRA, A.; JESTADI, D. B.; PERIYASAMY, L. Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 30, n. 1, p. 11-26, 2014.

RHO, M.; TANG, H.; YE, Y. FragGeneScan: predicting genes in short and error-prone reads. **Nucleic acids research**, v. 38, n. 20, p. e191-e191, 2010.

RISSI, D. **Análise metagenômica de solos sob floresta semidecidual e sistema plantio direto**. 2015. 40 f. (Trabalho de conclusão de curso) - Curso de Biotecnologia, FCBA, UFGD, Dourados, 2015.

SCHMIEDER, R.; EDWARDS, R. Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. **Bioinformatics**, v. 27, n. 6, p. 863-864, 2011.

TAN, H. et al. Identification and characterization of a mesophilic phytase highly resilient to high temperatures from a fungus-garden associated metagenome. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 100, n. 5, p. 2225-2241, 2016.

ZHANG, Q.; HAN, Y.; XIAO, H. Microbial  $\alpha$ -amylase: a biomolecular overview. **Process Biochemistry**, v. 53, p. 88-101, 2017.

ZHANG, R.; YIP, V. L. Y.; WITHERS, S. G. Mechanisms of Enzymatic Glycosyl Transfer. **Comprehensive Natural Products II**, p. 385-422, 2010.