



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

DINO ADLER DE QUEIROZ SILVA

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO ENZIMÁTICA POR ACTINOBACTÉRIAS
ISOLADAS DO INTESTINO DO CAMARÃO-BRANCO-DO-PACÍFICO (*Litopenaeus
vannamei*)**

**FORTALEZA
2025**

DINO ADLER DE QUEIROZ SILVA

AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO ENZIMÁTICA POR ACTINOBACTÉRIAS ISOLADAS
DO INTESTINO DO CAMARÃO-BRANCO-DO-PACÍFICO (*Litopenaeus vannamei*)

Monografia apresentada ao curso de graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Profa. Dra. Claudia Miranda Martins.

Coorientador: Profa. Dra. Suzana Claudia Silveira Martins

FORTALEZA

2025

DINO ADLER DE QUEIROZ SILVA

AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO ENZIMÁTICA POR ACTINOBACTÉRIAS ISOLADAS
DO INTESTINO DO CAMARÃO-BRANCO-DO-PACÍFICO (*Litopenaeus Vannamei*)

Monografia apresentada ao curso de
Biotecnologia da Universidade Federal do
Ceará, como requisito parcial à obtenção do
título de bacharel em Biotecnologia.

Aprovada em: 18/12/2025 .

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Claudia Miranda Martins
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Suzana Cláudia Silveira Martins
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Maria Valdeez Ponte Rocha
Universidade Federal do Ceará (UFC)

“Toda vez que você sangra em busca da
grandeza, implacavelmente, você sobrevive.”

– *League of Legends*

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Ceará (UFC), pelo apoio financeiro, pelo ensino de excelência e por ter proporcionado experiências acadêmicas e pessoais inesquecíveis.

À Professora Doutora Claudia Miranda Martins, pela orientação cuidadosa, precisa e inspiradora, fundamentais para a realização deste trabalho e para o meu crescimento acadêmico.

À Professora Doutora Suzana Cláudia Silveira Martins, pela coorientação dedicada e pelo comprometimento exemplar nas atividades de laboratório, contribuindo de forma significativa para o desenvolvimento desta pesquisa.

Às professoras que compuseram a banca examinadora, Suzana Claudia Silveira Martins e Maria Valdevez Ponte Rocha pela leitura atenta, pelas valiosas contribuições e sugestões que enriqueceram este trabalho.

Ao Laboratório de Microbiologia Ambiental (LAMAB), pelo espaço cedido, pela estrutura disponibilizada e pela colaboração essencial à execução desta pesquisa.

À minha mãe, Andrea, por ser minha base em todos os momentos. Seu amor incondicional, força e apoio constante foram fundamentais ao longo da minha trajetória.

Ao meu pai, Alberto, que, mesmo à distância, sempre encontrou formas de estar presente. Seus conselhos e valores seguem comigo e fazem parte de quem sou.

Aos meus avós maternos, João e Efigênia, por acreditarem no meu potencial e por serem meu alicerce emocional durante toda a graduação.

Aos meus avós paternos, João e Ercília, por sua presença acolhedora e por contribuírem profundamente para minha formação pessoal e afetiva.

Aos meus amigos Eliflávio, Júlia e Cailine, por anos de amizade sólida, apoio incondicional e por compartilharem comigo tantos momentos importantes.

Ao Leonardo Lima Bandeira, pelos ensinamentos generosos, pela paciência nas dúvidas e pela amizade genuína. Sua ajuda fez diferença nesta caminhada.

A Ariel, Laís, Amanda, João Neto e Fernando, que, além de brilhantes pesquisadores, são amigos queridos que tornaram esta jornada mais leve e possível.

A Matheus Lucas, Ariane, Luiz Gustavo e Fê, por uma amizade verdadeira e pelos momentos de descontração que me ajudaram a respirar em meio à correria acadêmica.

À Gabriela Brito Duarte, por uma amizade que nasceu espontaneamente e se tornou essencial. Agradeço por sua ajuda inestimável, sua parceria e por estar sempre presente.

À Fátima, pela amizade valiosa, por seus conselhos acolhedores e por ser ombro amigo nos momentos em que mais precisei.

Ao Salomão, por ser luz nos dias cinzentos, por espalhar alegria e por dividir comigo os prazeres mais simples, inclusive os da comilança.

A Nayane e Nayra, pela amizade verdadeira, pelo carinho e pela preocupação constante. São pessoas que levo no coração e quero manter por toda a vida.

À Marluce, pelo carinho de mãe, pela sabedoria e cuidado em cada palavra e gesto.

Aos meus amigos do grupo “Vai me ressarcir?”, Ícaro, Queiroga, Letícia, Gustavo, Pedro e Plácido, pela amizade sincera e pelos momentos de humor que tornaram a jornada acadêmica mais leve.

À Ryan Hudson, obrigado por tudo.

A Wilton, Marinara, Wanderson, Walisson e meus irmãos de fé, pelos momentos marcantes de fé e companheirismo.

A Matheus, meu companheiro de jornada, por estar ao meu lado em silêncio ou em festa, nos dias fáceis e nos mais difíceis. Por dividir comigo os sonhos, as dúvidas e os caminhos. Obrigado por me lembrar, com seu amor tranquilo e constante, que não estou só, e que há beleza até nos dias mais cansativos.

Ao meu eu mais novo, que um dia sonhou em ser um grande cientista mesmo sem saber exatamente o que isso significava. Agradeço por não ter desistido, mesmo quando tudo parecia impossível. Hoje, tento trilhar esse caminho com dedicação e coragem, na esperança de deixá-lo orgulhoso. porque foi ele quem começou tudo.

RESUMO

O planeta tem passado por mudanças ambientais cada vez mais intensas, afetando ecossistemas terrestres e aquáticos em diferentes escalas. Grande parte dessas alterações decorre de atividades humanas, especialmente do setor industrial, cuja expansão e demanda produtiva geram impactos significativos sobre o meio ambiente. Diante desse cenário, torna-se necessária a busca por processos industriais mais sustentáveis, e a utilização de enzimas microbianas surge como uma alternativa promissora, capaz de reduzir custos, otimizar reações e minimizar a geração de resíduos. Entre os microrganismos de maior interesse biotecnológico, destacam-se as actinobactérias, um filo de bactérias Gram-positivas amplamente distribuído em ambientes como o solo, ambientes marinhos e sistemas simbióticos. Essas bactérias são reconhecidas pela elevada versatilidade metabólica, que lhes permite sintetizar compostos bioativos, incluindo antibióticos, pigmentos e diversas enzimas de relevância comercial. Neste estudo, foi realizada a avaliação da produção enzimática de 14 cepas de actinobactérias isoladas do intestino do camarão branco-do-Pacífico, um importante recurso da carcinicultura cearense, aproveitando-se esse rejeito industrial como fonte alternativa de microrganismos com potencial biotecnológico. Foram investigadas quatro enzimas pertencentes à classe das hidrolases, sendo elas amilases, celulasas, lipases e proteases, e ao menos quatro cepas, SGA1, SGA5, SGA6 e SGA8, demonstraram atividade positiva para cada uma delas, evidenciando a diversidade metabólica do grupo. Além disso, processos fermentativos foram conduzidos para quantificar a atividade de amilases, celulasas e proteases, permitindo selecionar a cepa com maior índice enzimático, a qual apresentou desempenho intermediário para as três enzimas avaliadas; para amilase, a cepa SGA8 obteve como resultado a produção de 3,54 UI/mL ($\mu\text{mol glicose} \times \text{min}^{-1}$), enquanto a SGA1 apresentou o valor de 0,51 UI/mL ($\mu\text{mol glicose} \times \text{min}^{-1}$). Já para proteases, a cepa SGA1 obteve o valor de 138,16 UI/mL ($\mu\text{mol azopeptídeo} \times \text{min}^{-1}$). Os resultados obtidos reforçam o potencial dessas actinobactérias como fontes de biocatalisadores industriais e indicam a necessidade de aprofundar as análises, especialmente no que diz respeito à quantificação específica das enzimas lipolíticas, que se mostraram particularmente promissoras ao longo do estudo.

Palavras-chave: Biocatálise; Hidrolases; Intestino; Microbiota; Enzimas microbianas.

ABSTRACT

The planet has been undergoing increasingly intense environmental changes, affecting terrestrial and aquatic ecosystems at different scales. A large portion of these changes results from human activities, especially those related to the industrial sector, whose expansion and productive demand generate significant impacts on the environment. In this context, the search for more sustainable industrial processes becomes necessary, and the use of microbial enzymes emerges as a promising alternative, capable of reducing costs, optimizing reactions, and minimizing waste generation. Among the microorganisms of greatest biotechnological interest are actinobacteria, a phylum of Gram-positive bacteria widely distributed in environments such as soil, marine habitats, and symbiotic systems. These bacteria are recognized for their high metabolic versatility, which allows them to synthesize bioactive compounds, including antibiotics, pigments, and several enzymes of commercial relevance. In this study, the production of enzymes by 14 strains of actinobacteria isolated from the intestine of the Pacific white shrimp was evaluated. This species represents an important resource for shrimp farming in the state of Ceará, and this industrial byproduct was used as an alternative source of microorganisms with biotechnological potential. Four enzymes belonging to the hydrolase class were investigated, namely amylases, cellulases, lipases, and proteases, and at least four strains—SGA1, SGA5, SGA6, and SGA8—showed positive activity for each of them, highlighting the metabolic diversity of this group. In addition, fermentative processes were conducted to quantify the activity of amylases, cellulases, and proteases, allowing the selection of the strain with the highest enzymatic index, which showed intermediate performance for the three enzymes evaluated. For amylase, strain SGA8 showed a production of 3.54 IU/mL ($\mu\text{mol glucose}\times\text{min}^{-1}$), while SGA1 presented a value of 0.51 IU/mL ($\mu\text{mol glucose}\times\text{min}^{-1}$). Regarding proteases, strain SGA1 showed a value of 138.16 IU/mL ($\mu\text{mol azopeptide}\times\text{min}^{-1}$). The results reinforce the potential of these actinobacteria as sources of industrial biocatalysts and indicate the need for further analyses, especially with regard to the specific quantification of lipolytic enzymes, which proved to be particularly promising throughout the study.

Keywords: Biocatalysis; Hydrolases; Gut; Microbiota; Microbial enzymes.

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - <i>Boxplot</i> com os índices enzimáticos de cepas de actinobactérias do camarão branco-do-Pacífico com atividade amilolítica.....	44
Gráfico 2 – <i>Boxplot</i> com os índices enzimáticos de cepas de actinobactérias do camarão branco-do-Pacífico com atividade celulolítica.....	45
Gráfico 3 - <i>Boxplot</i> com os índices enzimáticos de cepas de actinobactérias do camarão branco-do-Pacífico com atividade lipolítica.....	45
Gráfico 4 – <i>Boxplot</i> com os índices enzimáticos de cepas de actinobactérias do camarão branco-do-Pacífico com atividade proteolítica.....	46
Gráfico 5 – Gráfico em colunas com os resultados da quantificação enzimática de cepas de actinobactérias do camarão branco-do-Pacífico.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ABCC – Associação Brasileira de Criadores de Camarão
- ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas
- AFM – *Atomic Force Microscopy* (Microscopia de Força Atômica)
- ATP – Adenosina Trifosfato
- BLC – Biomassa Lignocelulósica
- BSA – *Bovine Serum Albumin* (Albumina Sérica Bovina)
- CBHs – Celobiohidrolases
- CMC – Carboximetilcelulose
- CMCase – Atividade Celulolítica (referente à degradação de CMC)
- COP – Conferência das Partes (Conferência do Clima da ONU)
- DBO – Demanda Bioquímica de Oxigênio (tipo de incubadora/estufa)
- DNA – Ácido Desoxirribonucleico
- DNS – Ácido 3,5-Dinitrossalicílico (reagente para dosagem de açúcares redutores)
- EC – *Enzyme Commission* (Comissão de Enzimas)
- EEB – Extrato Enzimático Bruto
- EGs – Endoglucanases
- EPS – Matriz Extracelular (*Extracellular Polymeric Substance*)
- G+C – Guanina + Citosina (composição de bases nitrogenadas do DNA)
- GtCO₂ – Gigatoneladas de Dióxido de Carbono
- HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
- IEA – *International Energy Agency* (Agência Internacional de Energia)
- IFF – *International Flavors & Fragrances*
- IPCC – *Intergovernmental Panel on Climate Change* (Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas)
- ISP – *International Streptomyces Project* (Meios de cultura padronizados para *Streptomyces*)
- IUBMB – *International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular)
- LAMAB – Laboratório de Microbiologia Ambiental
- MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura
- NBR – Norma Brasileira Regulamentar
- NCQG – *New Collective Quantified Goal* (Nova Meta Coletiva Quantificada)

NDCs – *Nationally Determined Contributions* (Contribuições Nacionalmente Determinadas)

RPM – Rotações Por Minuto

SCA – *Starch Casein Agar* (Ágar Amido-Caseína)

SGA – *Shrimp Gut Actinobacteria*

SIBI – Sistema Integrado de Bibliotecas

SMA – *Skim Milk Agar* (Ágar Leite Desnatado)

TCA – Ácido Tricloroacético

Tris-HCl – Tampão Tris-Hidroclorídrico

UFC – Universidade Federal do Ceará

UI/mL – Unidades Internacional por Mililitro

UNFCCC – *United Nations Framework Convention on Climate Change* (Convenção-Quadro das Nações Unidas sobre Mudança do Clima)

USD – Dólar Americano

LISTA DE SÍMBOLOS

% – Porcentagem

°C – Graus Celsius

μL – Microlitro

μmol – Micromol

α – Alfa (usado em α-amilase, ligação α-1,4)

β – Beta (usado em β-amilase, ligação β-1,4)

γ – Gama (usado em γ-amilase)

≥ – Maior ou igual a

≤ – Menor ou igual a

± – Mais ou menos

C – Carbono

C₄H₄N₂O₆ – Tartarato de sódio

Ca²⁺ – Íon cálcio

CaCl₂ – Cloreto de cálcio

CaCl₂·H₂O – Cloreto de cálcio dihidratado

CaCO₃ – Carbonato de cálcio

Cl⁻ – Íon cloreto

CO₂ – Dióxido de carbono

CoCl₂ – Cloreto de cobalto

CuCl₂ – Cloreto de cobre

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DO – Densidade óptica

FeSO₄ – Sulfato ferroso

g – Grama

h – Hora

HCl – Ácido clorídrico

H₃BO₃ – Ácido bórico

K – Potássio

K₂HPO₄ – Fosfato dipotássico

KNO₃ – Nitrato de potássio

L – Litro

M – Molar

mg – Miligrama
min – Minuto
mL – Mililitro
mM – Milimolar
mmol – Milimol
MgCl₂ – Cloreto de magnésio
MgSO₄ – Sulfato de magnésio
Na₂MoO₄ – Molibdato de sódio
NaCl – Cloreto de sódio
NaNO₃ – Nitrato de sódio
NaOH – Hidróxido de sódio
nm – Nanômetro
p/v – Peso por volume
pH – Potencial hidrogeniônico
rpm – Rotações por minuto
s – Segundo
sn – Estereoquímica
Tris-HCl – Tampão Tris-Hidroclorídrico
UI – Unidade internacional
v/v – Volume por volume
Zn²⁺ – Íon zinco
ZnCl₂ – Cloreto de zinco

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1	Actinobactérias	16
2.2	Enzimas	20
2.3	Amilases	22
2.4	Celulases	23
2.5	Lipases	24
2.6	Proteases	26
2.7	Mercado enzimático e aplicações	26
2.8	O impacto do camarão branco-do-Pacífico na economia cearense	27
3	OBJETIVOS	28
3.1	Objetivo geral	28
3.2	Objetivos específicos	28
4	MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1	Reativação de cepas de actinobactérias	29
4.2	Coloração de Gram	30
4.3	Caracterização microscópica	31
4.4	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	32
4.5	Screening enzimático	32
4.6	Atividade amilolítica	33
4.7	Atividade celulolítica	34
4.8	Atividade lipolítica	35
4.9	Atividade proteolítica	36
4.10	Fermentação	37
4.11	Quantificação de amilases	38
4.12	Quantificação de celulases	38
4.13	Quantificação de proteases	39
5	RESULTADO E DISCUSSÃO	39
5.1	Coloração de Gram	39
5.2	Caracterização microscópica	40

5.3	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	41
5.4	Atividades enzimáticas	42
5.5	Atividade amilolítica	43
5.6	Atividade celulolítica	44
5.7	Atividade lipolítica	45
5.8	Atividade proteolítica	46
5.9	Quantificação de enzimas	46
6	CONCLUSÃO	48
7	REFERÊNCIAS	50

1 – INTRODUÇÃO

A poluição é caracterizada pela introdução de substâncias no meio ambiente, afetando seu equilíbrio e provocando mudanças indesejadas. Segundo o Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas (IPCC, 2019), entre os anos de 2007 e 2016, o sumidouro terrestre absorveu cerca de 11,2 GtCO₂ por ano; já em 2022, esse número quadruplicou, alcançando 57,4 GtCO₂ (IEA, 2022). Esses dados evidenciam uma clara piora no quadro da poluição ambiental, com 40,5 GtCO₂ daquele total provindo da produção e queima de combustíveis fósseis. Esse cenário alarmante, que contribui para processos de mudança climática como a desertificação, degradação do solo, diminuição da biodiversidade e aumento do nível do mar, foi o ponto central da COP29 em Baku (2024), que focou em estabelecer a Nova Meta Coletiva Quantificada de Financiamento (NCQG), um mecanismo crucial para viabilizar financeiramente a "transição para longe" (*transition away*) dos combustíveis fósseis, conforme acordado na COP28. Dando continuidade a essa agenda, a COP30, realizada no Brasil, projetou-se como o momento decisivo para a revisão das Contribuições Nacionalmente Determinadas (NDCs) e para a consolidação da bioeconomia como estratégia central de descarbonização.

Diante desses desafios globais, torna-se essencial desenvolver combustíveis verdes e técnicas que minimizem os impactos ambientais, contexto no qual a biotecnologia microbiana, especialmente com o uso de actinobactérias, tem se destacado como uma alternativa promissora (Lewin et al., 2016). Nesse cenário, a identificação de cepas com elevado potencial metabólico torna-se um passo fundamental, uma vez que a seleção adequada de microrganismos influencia diretamente a eficiência dos processos biotecnológicos e sua viabilidade em escala industrial. Estudos da literatura demonstram que diferentes gêneros de actinobactérias, como *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Nocardia* e *Rhodococcus*, apresentam ampla capacidade de degradação de substratos complexos e produção de enzimas hidrolíticas e oxidativas, características essenciais para aplicações em biorrefinarias e na produção de biocombustíveis. Além disso, a caracterização fisiológica e bioquímica dessas cepas permite correlacionar atributos metabólicos específicos com condições de cultivo e fermentação, favorecendo a otimização de processos industriais e o desenvolvimento de tecnologias mais sustentáveis, alinhadas às demandas ambientais e energéticas atuais (Anteneh; Franco, 2019; Doroghazi; Metcalf, 2013; Vojnovic et al., 2024).

Actinobactérias são bactérias Gram-positivas amplamente distribuídas em ambientes aquáticos e terrestres, apresentando ainda comportamentos simbióticos com diversos

organismos, como animais aquáticos, plantas e seres humanos (Barka et al., 2016; Kurtböke, 2017; Narsing Rao; Li, 2022). Além de sua ampla distribuição, elas possuem a capacidade de sintetizar e excretar compostos bioativos e enzimas hidrolíticas de interesse industrial, como amilases, celulasas, lacases, lipases, pectinases e proteases (Salwan; Sharma, 2018; Matos Neto et al., 2022), moléculas cruciais que auxiliam diretamente no melhoramento de processos industriais e na produção de combustíveis verdes, atuando na degradação de biomassa complexa ou na biorremediação. As actinobactérias também são responsáveis pela produção de aproximadamente 75% dos compostos antibióticos bioativos conhecidos, além da produção de pigmentos com potencial aplicação na indústria farmacêutica (Barka et al., 2016; Evangelista-Martinez et al., 2023). Embora actinobactérias de ambientes marinhos sejam promissoras, este trabalho apresenta uma abordagem inédita ao ter como objetivo analisar actinobactérias isoladas do intestino do camarão-branco-do-Pacífico (*Litopenaeus vannamei*), com foco na produção destes compostos bioativos.

2 - REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Actinobactérias

Actinobactérias são microrganismos que compreendem o filo Actinobacteria, anteriormente nomeadas de actinomicetos, a etimologia deriva do grego *Aktis* (raio ou feixe) e *mykes* (fungos), referenciando a morfologia filamentosa e ramificada desses microrganismos, que inicialmente lembravam hifas fúngicas dispostas de forma radial. Uma das primeiras descrições de uma actinobactéria na literatura científica é a do pesquisador Carl Otto Harz em seus estudos sobre actinomicose bovina, causada pelo agente etiológico *Actinomyces bovis* (Harz, 1877). Já no século XX, Selman Waksman se destacou na pesquisa com actinobactérias, dedicando-se a compreender o papel desses microrganismos no solo e analisando a forma como as actinobactérias impactavam na degradação de matéria orgânica e na relação desses organismos com fungos e outras bactérias. Waksman demonstrou de forma prática a importância das actinobactérias, tendo, a partir desses microrganismos, descoberto a estreptomicina, antibiótico utilizado no tratamento da tuberculose bacteriana (*American Chemical Society*, 2005; Waksman; Woodruff, 1940). No início do século XXI os estudos envolvendo as actinobactérias passaram a contar com o auxílio da biologia molecular e genômica, o que propiciou avanços como o sequenciamento do genoma completo de *Streptomyces*; além disso, com a utilização de ferramentas metagenômicas chegou-se à conclusão que a diversidade desses microrganismos presentes no solo era maior que a isolada e cultivada em laboratório, assim como apontou a presença desses organismos em ambientes extremos, capazes de sintetizarem compostos inéditos (Bentley et al., 2002; Qin et al., 2011).

O termo “actinomicetos”, empregado na literatura clássica, caiu em desuso por agrupar microrganismos com base em semelhanças morfológicas, sem refletir corretamente suas relações evolutivas, frequentemente formando grupos para- ou polifiléticos. Com o avanço das análises filogenéticas e genômicas, essa classificação foi substituída pelo filo *Actinobacteria*, que representa um grupo monofilético e evolutivamente coerente. Para refletir de forma adequada essa unidade evolutiva, instituiu-se o filo *Actinobacteria*, que inclui não apenas os microrganismos filamentosos anteriormente classificados como actinomicetos, mas também organismos não filamentosos, como *Mycobacterium*, *Corynebacterium* e *Nocardia* (Goodfellow et al., 2012; Stackebrandt; Rainey; Ward-Rainey, 1997). Além da coerência filogenética, esse filo compartilha características genéticas e estruturais marcantes, que contribuem para sua ampla distribuição e relevância biotecnológica.

Nesse contexto, as actinobactérias são organismos bacterianos Gram-positivos que apresentam elevada proporção de G+C (guanina + citosina) em seu material genético, frequentemente $\geq 55\%$. Essa característica possui implicações diretas em sua evolução e adaptação, uma vez que a alta taxa de G+C está associada à maior estabilidade do DNA, maior termotolerância e, possivelmente, à presença de mecanismos específicos de reparo genético (Dong et al., 2019; Maddox; Ormerod, 2012).

Uma característica marcante das actinobactérias é a organização de suas colônias sob a forma de hifas ramificadas que constituem um micélio radial, aspecto morfológico frequentemente associado aos fungos. Contudo, apesar dessa semelhança estrutural, as células que compõem essas hifas apresentam organização típica de procariontes, caracterizada pela ausência de núcleo verdadeiro, presença de um cromossomo organizado em um nucleóide, regiões de DNA citoplasmático e parede celular constituída por peptidoglicano (Madigan et al., 2018). Essa distinção celular influencia diretamente o padrão de crescimento e diferenciação micelial observado nesse grupo bacteriano.

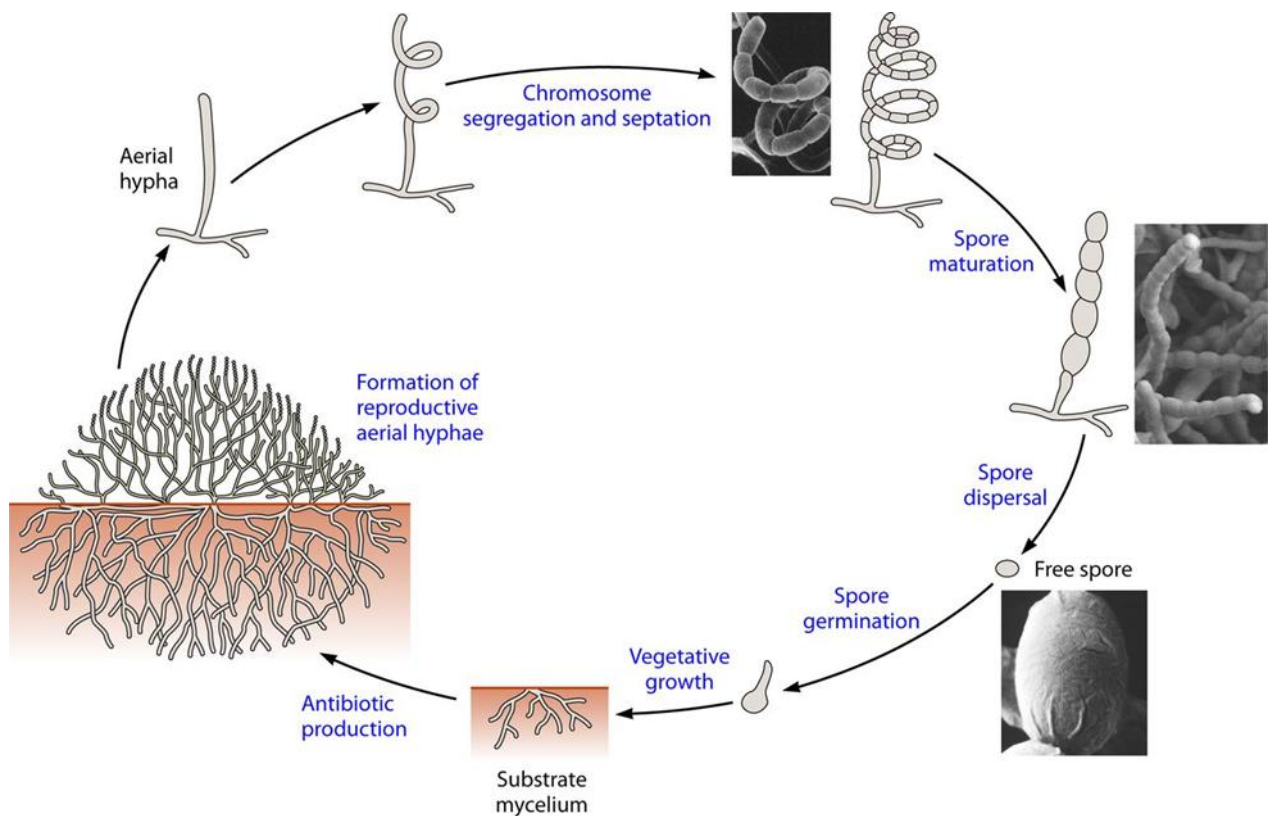
A partir desse crescimento micelial, as actinobactérias produzem dois tipos principais de micélio. O primeiro corresponde ao micélio vegetativo ou radial, composto por células hidrofílicas responsáveis pela colonização do substrato. Esse micélio produz uma matriz extracelular (EPS), formada por proteínas, polissacarídeos e DNA extracelular, que contribui para a adesão ao substrato, a formação de agregados celulares e a estabilidade estrutural da colônia. Estudos que utilizam a técnica *Atomic Force Microscopy* (AFM) mostram que há diferenciação entre micélios vegetativos mais jovens e mais velhos, onde os micélios mais jovens apresentam superfície mais lisa e maior quantidade de matriz proteica (Del Sol et al., 2007). Além disso, o micélio vegetativo é responsável pela obtenção de nutrientes por meio da liberação de metabólitos e da síntese de sideróforos, que auxiliam na captação de ferro no substrato colonizado pela bactéria. (Barger et al., 2012; Chater, 2006).

O micélio aéreo é formado a partir do início da escassez de nutrientes no substrato, o que faz com que o micélio vegetativo desencadeie uma cascata de sinais bioquímicos o que dá início ao processo transitório entre micélio vegetativo e micélio aéreo (Barger et al., 2012). Essa transição é caracterizada por algumas etapas, a primeira delas é a ativação da cascata de sinalização dos genes *bld* (*bald*), esses genes atuam nos operons responsáveis pelo início da produção de proteínas que irão alterar a interação dos micélios com o substrato (Hunt et al., 2005; Liu et al., 2013). A mudança de interação da bactéria com o substrato ocorre em decorrência da síntese de proteínas *chaplins* e *rodmins*, as proteínas *chaplins* se agrupam na

superfície dos micélios que estão em processo transitório formando uma camada de fibrilas hidrofóbicas que fazem com que os micélios se desagreguem do substrato do meio e desenvolvam a porção aérea (Bibb et al., 2012; Mouri et al., 2017).

O desenvolvimento de micélio regulado por genes *bld* é uma característica conservada entre diferentes espécies de actinobactérias, já a diferenciação desses organismos em gêneros distintos é fruto de uma gama de fatores como adaptações genômicas adquiridas ao longo do tempo, adaptações a nichos ecológicos específicos e também o desenvolvimento de rotas metabólicas específicas (Figura 1) (Chevrette et al., 2020; Mohammadipannah; Dehghani, 2017; Kusuma; Nouioui; Goodfellow, 2021; Verma et al., 2013).

Figura 1 – Esquematisação do ciclo de vida de actinobactérias filamentosas.



Autor: Barka et al. (2016)

Além dos ambientes terrestres, os ambientes aquáticos também apresentam uma grande variedade de actinobactérias, sejam essas bactérias dispostas no ambiente marinho, aderidas a sedimentos no fundo do mar e em simbiose com organismos como poríferos, peixes e crustáceos (Chen et al., 2021; Ezeobiora et al., 2022; Lebron-Lopez; Nadathur; Schizas, 2024; Olano; Rodriguez, 2024). Essas actinobactérias possuem características únicas, uma vez que precisam dispor de fontes diferentes de obtenção de nutrientes; algumas bactérias apresentam a formação de micélio quando em simbiose com organismos como esponjas e corais (Weeraphan

et al., 2025; Le Roarer et al., 2025). Outra característica única dessas bactérias é a liberação de esporos móveis com estruturas semelhantes a zoósporos que são comuns em fungos, os gêneros que apresentaram essas características são comumente *Actinoplanes*, *Kineosporia* e *Actinomycetia* (Li et al., 2016; Ezeobiora et al., 2022). A morfologia bacilar ou cocoide é uma característica recorrente em diversas actinobactérias marinhas, especialmente entre aquelas que estabelecem relações simbióticas com organismos aquáticos, como esponjas, crustáceos e peixes, sendo particularmente frequente em cepas associadas ao trato intestinal (Ghai et al., 2013; Jami et al., 2015; López-Perez et al., 2020).

Essa conformação celular representa uma importante adaptação evolutiva voltada à eficiência metabólica, uma vez que o formato reduzido e simples dessas células proporciona maior relação superfície/volume, favorecendo a absorção e o intercâmbio de nutrientes com o meio circundante ou com o hospedeiro. Além disso, o baixo custo energético associado à manutenção estrutural dessas formas celulares permite que os recursos bioenergéticos sejam redirecionados para processos essenciais, como replicação, transporte ativo e síntese de biomoléculas primárias. Em ambientes marinhos oligotróficos, onde os nutrientes são escassos, mas relativamente constantes, essa estratégia se mostra particularmente vantajosa, garantindo economia metabólica e otimização fisiológica. Assim, a forma bacilar ou cocoide das actinobactérias simbiontes reflete uma rota adaptativa de especialização ecológica, que prioriza a eficiência energética em detrimento da complexidade estrutural (Ghai *et al.* 2013; Undabarrena et al., 2016; Yang et al., 2016).

As actinobactérias são amplamente distribuídas na natureza e podem ser isoladas de uma grande diversidade de ambientes, incluindo solos, sedimentos marinhos, ambientes aquáticos, rizosfera de plantas e associações simbióticas com organismos animais e vegetais (Barka et al., 2016; Goodfellow; Williams, 1983). Em particular, ambientes associados a hospedeiros vivos têm se mostrado importantes reservatórios desses microrganismos, uma vez que favorecem interações mutualísticas mediadas pela produção de metabólitos bioativos e enzimas extracelulares. A microbiota intestinal de invertebrados aquáticos, por exemplo, tem sido reconhecida como uma fonte relevante de actinobactérias com potencial funcional, desempenhando papéis essenciais na digestão, na proteção contra patógenos e na manutenção do equilíbrio microbiano do hospedeiro (Manivasagan et al., 2014; Subramani; Sipkema, 2019).

A presença de actinobactérias na microbiota intestinal do camarão-branco-do-Pacífico têm se mostrado benéfica, uma vez que esses microrganismos secretam metabólitos que auxiliam na regulação da microbiota intestinal do camarão protegendo o organismo contra

patógenos (Li et al., 2018; Zhou et al., 2024). A presença desses microrganismos no intestino do camarão auxilia na degradação do alimento, pois secretam enzimas extracelulares facilitando a obtenção de nutrientes e conseqüentemente favorecendo a homeostase do animal (Hebrom et al., 2024; Tzuc et al., 2014).

As actinobactérias são importantes fontes de enzimas de alto valor biotecnológico, destacando-se pela produção de amilases e glucoamilases, utilizadas na hidrólise do amido para obtenção de açúcares fermentescíveis; celulases e xilanases, aplicadas na conversão de biomassa lignocelulósica; proteases alcalinas, empregadas em detergentes; e lipases, utilizadas em reações de transesterificação para produção de biodiesel e em sínteses enantiosseletivas. Um exemplo de enzima com aplicação industrial consolidada é a glucose isomerase, tradicionalmente produzida por actinobactérias do gênero *Streptomyces*, como *Streptomyces rubiginosus* e *Streptomyces murinus*, amplamente utilizada na indústria alimentícia para a conversão de glicose em frutose na produção de xarope de milho de alta frutose (HFCS). Essa enzima é empregada comercialmente por empresas do setor de biotecnologia industrial e alimentos, representando um dos casos mais bem-sucedidos de aplicação enzimática derivada de actinobactérias em larga escala (Barka et al., 2016; Nam, 2022; Pandey et al., 2000; Rao et al., 1998).

2.2 Enzimas

Enzimas são catalisadores biológicos, majoritariamente proteínas com exceção de algumas ribozimas e de complexos ribonucleoproteicos, que aceleram reações químicas ao reduzir a energia de ativação necessária para que ocorra a transformação do substrato em produto, sem se consumirem no processo; isso é conseguido pela formação transitória de complexos enzima-substrato e pela estabilização do estado de transição na região ativa da proteína (Lewis, 2023). Elas exibem alta especificidade e obedecem a leis cinéticas como a lei cinética de Michaelis-Menten, o que permite que a célula regule fluxos metabólicos com precisão. Muitas enzimas dependem de cofatores (íons metálicos) ou coenzimas (vitaminas derivadas) para atividade catalítica, e sua função é modulada por mecanismos de regulação alostérica, modificações covalentes e controle transcricional e traducional, mecanismos que ajustam a atividade enzimática às necessidades fisiológicas (Goldbeter, 2013; Sun et al., 2023).

Para organizar sistematicamente a gama de atividades enzimáticas, a International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) estabeleceu a classificação Enzyme Commission (EC). Esse sistema categoriza as enzimas com base no tipo de reação química que

elas catalisam. Cada enzima recebe um código EC único composto por quatro dígitos (exemplo: EC 1.1.1.1), sendo o primeiro dígito aquele que define a qual das sete classes de enzimas ela pertence. As sete classes de enzimas são: oxidorreduções (EC 1), que catalisam reações de oxidorredução; transferases (EC 2), que transferem grupos funcionais de uma molécula para outra; hidrolases (EC 3), que quebram ligações químicas por meio de hidrólise; liases (EC 4), que quebram ligações sem o uso de hidrólise ou oxidação; isomerases (EC 5), que catalisam rearranjos estruturais dentro de uma mesma molécula; ligases (EC 6), que unem duas moléculas em reações acopladas à hidrólise de ATP; e translocases (EC 7), que catalisam o movimento de substâncias através de membranas (Nelson; Cox, 2022).

Além de atuarem como catalisadores biológicos, as enzimas são fundamentais para a manutenção da homeostase celular e para a eficiência energética dos organismos. A estrutura tridimensional das enzimas é importante para compreendermos o mecanismo de ação delas; essas enzimas possuem uma região específica chamada de sítio ativo composto por resíduos de aminoácidos posicionados de modo a interagirem com o substrato por meio de ligações de hidrogênio, forças de van der Waals e interações hidrofóbicas (Nelson; Cox, 2022; Voet; Voet, 2013; Wolfenden; Snider, 2001).

Embora o modelo clássico de “chave-fechadura” tenha proposto um encaixe rígido, o modelo de encaixe induzido (Koshland, 1985) é o mais aceito, ele postula que o sítio ativo é flexível e que a ligação do substrato induz uma mudança conformacional na enzima. Esse ajuste otimiza o alinhamento para a catálise e estabiliza o estado de transição, explicando com maior precisão a especificidade e a dinâmica do processo. Essa dinâmica é central para a própria catálise, pois a afinidade máxima da enzima não é pelo substrato em seu estado fundamental, mas sim pelo estado de transição da reação – a estrutura molecular instável e de alta energia que se forma momentaneamente entre o substrato e o produto. O encaixe induzido é o mecanismo físico pelo qual a enzima utiliza a energia de ligação do substrato para forçar a si mesma e ao substrato a adotar, uma geometria que mimetiza o estado de transição (Pauling, 1946). Ao estabilizar, preferencialmente no estado de transição, a enzima reduz drasticamente a energia de ativação, o que explica fundamentalmente as vastas acelerações de velocidades observadas (Kraut, 2007; Wolfenden, 2011).

Além disso, a flexibilidade conformacional exigida pelo modelo de encaixe induzido é a base molecular para a regulação alostérica. Em alguns casos, a atividade enzimática é controlada por moléculas efetoras, sejam ativadoras ou inibidoras que se ligam a um sítio alostérico, distinto do sítio ativo, aumentando ou diminuindo sua afinidade ou capacidade

catalítica. Esse é um mecanismo de controle rápido e reversível, essencial para regular o fluxo em vias metabólicas complexas, conforme descrito por modelos clássicos como o de Monod, Wyman e Changeux ou o próprio modelo sequencial de Koshland (Koshland, 1966; Monod; Wyman; Changeux, 1965).

Do ponto de vista biotecnológico, enzimas possuem papel central em áreas como a produção de alimentos, indústria farmacêutica, biorremediação e diagnósticos clínicos. Mais recentemente, as enzimas artificiais e catalisadores imobilizados vêm ampliando a aplicabilidade desses sistemas, garantindo maior estabilidade e reaproveitamento em processos contínuos (Eş; Vieira; Amaral, 2015; Liang; Yan, 2019).

2.3 Amilases

Amilases são enzimas hidrolíticas que catalisam a degradação de polissacarídeos complexos, sendo o amido seu principal substrato. Amido é o que constitui a principal reserva de carboidratos nas plantas, é um polímero de glicose composto por duas frações: a amilose, uma cadeia linear de unidades de glicose unidas por ligações glicosídicas α -1,4, e a amilopectina, uma estrutura ramificada que contém cadeias lineares (ligações α -1,4) com pontos de ramificações formados por ligações α -1,6.

O mecanismo de ação geral das amilases envolve a hidrólise dessas ligações glicosídicas; muitas delas, especialmente as α -amilases que requerem íons metálicos, como cálcio (Ca^{2+}), para sua estabilidade estrutural e atividade catalítica, e frequentemente são ativadas por outros íons, como o cloreto (Cl^-) (Gou et al., 2021). Elas são classicamente divididas com base em como realizam essa quebra, as α -amilases (endoamilases) atuam em ligações α -1,4 internas de forma aleatória, “liquefazendo” o amido em oligossacarídeos menores; as β -amilases (exoamilases) atuam a partir das extremidades não redutoras, liberando sequencialmente unidades de maltose; as glicoamilases ou γ -amilases clivam tanto as ligações α -1,4 quanto as α -1,6 liberando glicose (Paul et al., 2021).

Sua aplicação mais robusta encontra-se na indústria de alimentos e bebidas. No subsetor de processamento de amido, as amilases são a base para a produção de xaropes adoçantes, mediante um processo de duas etapas: primeiro, a liquefação, onde α -amilases termoestáveis reduzem a viscosidade do amido gelatinizado; seguido da sacarificação, onde glicoamilases convertem as dextrinas em glicose. Na panificação, as amilases não apenas fornecem açúcares fermentáveis (maltose) para a levedura, impulsionando a produção de CO_2 e o volume do pão, mas também atuam como agentes antienvelhecimento, modificando a estrutura do amido para retardar sua retrogradação e, assim, prolongar a maciez e o *shelf-life*

do produto. Na cervejaria, elas são vitais durante a mosturação para converter o amido do malte e de grãos adjuntos em açúcares fermentáveis, sendo indispensáveis para cervejas com alta proporção de adjuntos. Além disso, são usadas na clarificação de sucos de frutas, onde eliminam a turbidez causada por amido residual (Gomaa, 2018; Guerra et al., 2009; Kasar; Mareshwari; Pawar, 2022; Paras-Viader et al., 2021).

Além do setor alimentício, as amilases desempenham papel fundamental na produção de bioetanol de primeira geração, a partir de matérias-primas ricas em amido, como milho e mandioca. Nesse processo, essas enzimas são responsáveis pelas etapas de liquefação e sacarificação do amido, promovendo sua hidrólise em açúcares fermentescíveis, principalmente glicose. A glicose liberada é então utilizada como substrato pelas leveduras, que não possuem capacidade amilolítica, sendo responsável exclusivamente pela fermentação alcoólica, convertendo esse monossacarídeo em etanol e dióxido de carbono. Na indústria têxtil, as α -amilases são a escolha padrão para o processo de desengomagem, removendo seletivamente a goma de amido aplicada aos fios de algodão para protegê-los durante a tecelagem, sem danificar a fibra de celulose. Finalmente, são um componente padrão em detergentes para roupas e louças, especializadas na quebra e eliminação de manchas de difícil remoção à base de amido, como as de molhos, chocolate e alimentos infantis, apresentando alta eficiência mesmo em baixas temperaturas de lavagem (Castro; Castilho; Freire, 2011; Souza et al., 2010).

2.4 Celulases

As celulases são um conjunto de enzimas classificadas em diversas famílias de glicosil hidrolases (EC 3.2.1.4, EC 3.2.1.91 e EC 3.2.1.21) que atuam de forma sinérgica para degradar a celulose. A celulose é um polissacarídeo linear de glicoses unidas por ligações β -1,4, que permitem um alinhamento reto das cadeias e a formação de extensas redes de ligações de hidrogênio. Essa arquitetura resulta em microfibrilas com regiões altamente cristalinas (ordenadas e densas) e regiões amorfas (desorganizadas). Na parede celular vegetal, essa estrutura está associada e entrelaçada com hemiceluloses e ligninas, formando a complexa matriz da biomassa lignocelulósica (BLC). Essa associação confere à celulose sua característica recalcitrância, tornando-a insolúvel e extremamente resistente à hidrólise (Bardwaj et al., 2021; Kuhad; Gupta; Singh, 2011).

Devido à sua complexidade, a degradação da celulose requer um complexo celulolítico que atua coordenadamente. Em fungos como o *Trichoderma reesei*, o mecanismo

sinérgico envolve três classes hidrolíticas: endoglucanases (EGs) que atuam preferencialmente em regiões amorfas mais acessíveis, clivando aleatoriamente as ligações β -1,4 internas e abrindo as fibras para criar novas extremidades de cadeia; exoglucanases ou celobiohidrolases (CBHs) que atuam de forma processiva sem se dissociar do substrato, dividindo-se em tipos que atacam a extremidade redutora e outros que atacam a extremidade não redutora, expondo as regiões cristalinas e liberando o dissacarídeo celobiose; as β -glicosidasases que hidrolisam a celobiose em glicose (Zhang; Himmel; Mielenz, 2006).

As celulases são importantes economicamente, pois atuam na valorização da biomassa lignocelulósica. A aplicação de maior impacto é na produção de etanol de segunda geração, onde as celulases realizam a etapa de sacarificação; elas clivam a estrutura cristalina da celulose presente em resíduos agroindustriais para liberar glicose, que é então fermentada em bioetanol (Binod et al., 2019). Na indústria têxtil, as celulases atuam no acabamento de tecidos de algodão, no processo do biopolimento, elas removem seletivamente as microfibrilas superficiais conferindo ao tecido maior maciez, brilho e resistência a formação de *pilling*; no processamento de jeans, elas são utilizadas num processo chamado “*enzymatic stone washing*”, criando o efeito desgastado de forma controlada e ecologicamente superior a abrasão por pedras-pomes (De Souza Moreira; Sciuto; Ferreira Filho, 2016; Korsá et al., 2019; Naveed; Zahid, 2025).

Além disso, são amplamente empregadas na indústria de alimentos e rações. Na nutrição animal são aditivos de rações para animais monogástricos, quebrando a parede celular de grãos e liberando nutrientes intracelulares, melhorando a digestibilidade e a conversão alimentar. Na indústria alimentícia, são usadas na maceração de frutas e vegetais para aumentar o rendimento da extração de sucos e óleos, também atuam na clarificação de vinhos e cervejas. Outra aplicação relevante é na indústria do papel, onde atuam na descoloração do papel reciclado (Bahaddad et al., 2023; Mondal et al., 2022; Velázquez-de-Lucio, 2021).

2.5 Lipases

As lipases são uma classe de enzimas hidrolíticas que pertencem à superfamília das α/β -hidrolases e catalisam a hidrólise de ligações éster em lipídios insolúveis, principalmente triglicerídeos. A característica fundamental que define essas enzimas é o fenômeno da ativação interfacial: devido à insolubilidade de seus substratos em meio aquoso, as lipases exibem sua atividade catalítica máxima na interface entre a fase aquosa e a fase lipídica. Estruturalmente, a maioria das lipases possui um sítio ativo - frequentemente composto por uma tríade catalítica

de Serina-Histidina-Ácido Aspártico ou Glutâmico (Ser-His-Asp/Glu)- coberto por uma tampa anfipática. Em um ambiente aquoso, essa tampa sela o sítio ativo; contudo, na presença de uma interface lipídica, ela sofre uma mudança conformacional que expõe o sítio ativo hidrofóbico, permitindo o acesso ao substrato (Chandra et al., 2020).

As lipases bacterianas são um exemplo proeminente dessa classe, amplamente estudadas por sua diversidade e robustez. Uma característica notável de lipases bacterianas, especialmente as isoladas de microrganismos extremófilos, é a sua estabilidade e tolerância a solventes orgânicos, além disso, as lipases são conhecidas por sua alta seletividade, o que permite que elas discriminem e modifiquem posições específicas nos triglicerídeos ou em outros ésteres (Casas-Godoy et al., 2018).

Uma das propriedades que contribui para a alta seletividade das lipases é a regioseletividade, destacando-se a especificidade sn-1,3. Isso significa que muitas enzimas hidrolisam preferencialmente ligações éster nas posições 1 e 3 da molécula de triglicerídeo, deixando intacto o sn-2-monoacilglicerol. Essa precisão é controlada pela tampa que induz um rearranjo estrutural dinâmico que é favorecido pelo ambiente hidrofóbico da interface. A exposição de resíduos hidrofóbicos que compõem a face interna da tampa, à fase lipídica estabiliza termodinamicamente a conformação aberta, modulando o acesso ao túnel que leva à tríade catalítica (Remonato et al., 2022)

Essa flexibilidade estrutural e a capacidade de funcionar em ambientes não aquosos são o que conferem a muitas lipases bacterianas sua estabilidade em solventes orgânicos, permitindo que elas catalisem reações inversas, como a transesterificação, um processo fundamental na produção de biodiesel e outros bioprodutos (Monteiro et al., 2023). Além disso, são enzimas amplamente utilizadas para a modificação de gorduras e óleos, visando melhorar propriedades nutricionais, como a produção de gorduras com baixo teor calórico ou a síntese de CBE (Manteiga de cacau equivalente) para chocolates. Além disso, são cruciais no desenvolvimento de sabor em produtos lácteos, especialmente na maturação de queijos, onde a hidrólise controlada da gordura do leite libera ácidos graxos de cadeia curta, responsáveis por adicionar um sabor picante. Na indústria de detergentes, as lipases são as primeiras enzimas a atuar na remoção de manchas de gordura e óleo, quebrando-as em componentes menores e mais solúveis. Por fim, as lipases atuam no setor farmacêutico, a alta enantioseletividade dessas enzimas é explorada na resolução de misturas racêmicas, permitindo a síntese de fármacos enantiomericamente puros, onde apenas um dos isômeros ópticos possui a atividade terapêutica

desejada (Bardwaj; Gupta, 2017; Chen et al., 2025; Melani; Tambourgi; Silveira, 2020; Phukon et al., 2020).

2.6 Proteases

As proteases, também chamadas de peptidases (EC 3.4), são uma classe de enzimas hidrolíticas que catalisam a proteólise, a clivagem das ligações peptídicas que unem os aminoácidos em proteínas e peptídeos. Devido sua diversidade e importância em inúmeros processos biológicos, as proteases são classificadas não apenas por sua especificidade, mas fundamentalmente pelo seu mecanismo catalítico e o resíduo de aminoácido central em seu sítio ativo (Fernandez-Fernandez; Stael; Van Breusegem, 2023).

As principais classes mecanicistas são: serina proteases (Tripsina e Quimotripsina) que utilizam uma tríade catalítica (Ser-His-Asp) para tornar a serina um nucleófilo potente; já as cisteína proteases (Papaina e Caspases) utilizam uma díade (Cys-His) de maneira similar; as aspartato proteases (Pepsina e Protease do HIV), que empregam dois resíduos de aspartato para ativar uma molécula de água e por fim as metalo proteases (Termolisina e Colagenase) que utilizam um íon metálico, tipicamente zinco (Zn^{2+}), coordenados por resíduos para polarizar a água e realizar a hidrólise. Cada uma dessas classes catalíticas evoluiu independentemente para convergir na mesma função de quebra de ligações peptídicas (Rozanov et al., 2021; *Uniprot Consortium*, 2006; Tavano, 2018).

A principal força desse mercado é a indústria de detergentes, onde as proteases alcalinas são aditivos padrão há décadas, especializadas na quebra e na solubilização de manchas proteicas complexas, garantindo eficiência de lavagem mesmo em baixas temperaturas. Na indústria alimentícia, o uso de proteases se dá em processos de produção de queijos e no amaciamento de carnes. Além disso, as proteases são utilizadas na indústria do couro onde substituem produtos químicos agressivos nos processos de depilação e *bating*, removendo seletivamente os pelos e proteínas não estruturais da pele do animal (Abril et al., 2023; Naveed et al., 2021; Nicosia, 2022). Outra aplicação dessas enzimas é na indústria farmacêutica, onde são usadas para o desbridamento de feridas necróticas (Fang et al., 2017; Isabela Avila-Rodríguez et al., 2020; Tavano et al., 2018).

2.7 Mercado enzimático e aplicações

O mercado global de enzimas constitui um setor industrial estratégico e de alta tecnologia, fundamental para o avanço da bioeconomia e da química verde. Avaliado em um

espectro que varia de USD 10,7 bilhões a USD 14,1 bilhões em 2024, esse mercado apresenta uma projeção de crescimento anual composto robusta, estimada entre 5,5% e 7,1% para a próxima década (*Grand View Research.*, 2024; *Market US.*, 2025). Estruturalmente, o setor é caracterizado por uma alta consolidação, distanciando-se de modelos fragmentados, com elevadas barreiras de entrada devido ao custo e engenharia de processos. A dominância é exercida por um número restrito de corporações multinacionais que controlam o desenvolvimento, a capacidade de fermentação em larga escala e as patentes-chave, entre essas destacam-se a Novonesis que é resultado de uma fusão da Novozymes e da Chr.Hansen, a IFF (*Enzymes for Food and Beverages*), a DSM-Firmenich e a BASF (*Mordor Intelligence*, 2023). A segmentação desse mercado revela o domínio das carbohidrases (amilases e celulasas), que respondem por quase metade da receita, seguidas pelas proteases (*Grand View Research*, 2024).

Quanto à origem, as fontes microbianas são preferidas, representando mais de 85% do mercado, vantagem atribuída à rápida escalabilidade produtiva e à suscetibilidade à engenharia de proteínas. Regionalmente a América do Norte detém a maior parte, embora a região Ásia-Pacífico apresente o potencial de crescimento mais acelerado. O dinamismo futuro do setor é impulsionado por avanços em biotecnologia, notadamente a evolução dirigida e o design racional auxiliado por *machine learning* viabilizam a criação de biocatalisadores sob medida, otimizados para condições industriais adversas (*Grand View Research.*, 2024; *Mordor Intelligence*, 2023).

A adoção da biocatálise enzimática é uma das principais estratégias para a intensificação de processos na indústria moderna, substituindo catalisadores químicos convencionais que são perigosos e ambientalmente problemáticos (Chapman; Ismail; Dinu, 2018). A principal vantagem competitiva reside na capacidade das enzimas de operarem em condições reacionais brandas e em temperaturas moderadas, contrastando com as altas pressões e temperaturas exigidas pela catálise química tradicional. Isso se traduz diretamente em uma significativa economia de energia e redução de custos operacionais (Kuhad et al., 2011). Além da eficiência energética, as enzimas exibem alta seletividade, o que minimiza a formação de subprodutos indesejáveis e isômeros incorretos (Sheldon; Woodley, 2018). Essa precisão biocatalítica não só aumenta o rendimento do produto de interesse, mas também simplifica etapas de purificação (*Downstream processing*), reduzindo a carga de efluentes e o custo total do processo.

2.8 O impacto do camarão branco-do-Pacífico na economia cearense

O camarão branco-do-pacífico representa a espécie de maior relevância para a carcinicultura mundial e brasileira, devido a sua alta rusticidade, rápido crescimento e alta adaptabilidade a diferentes densidades de cultivo (Asmild et al., 2024; Brandão et al., 2024). No cenário nacional, o estado do Ceará, consolidou-se como o principal polo produtor, sendo responsável por mais de 50% da produção brasileira, segundo dados da Associação Brasileira de Criadores de Camarão (ABCC, 2023). Essa liderança impulsiona uma cadeia agroindustrial que abastece o mercado interno e também exporta, consolidando a atividade como um vetor estratégico de desenvolvimento socioeconômico regional (De Lacerda et al., 2021).

Porém, a intensificação da industrialização para atender às demandas do mercado resultam num volume substancial de resíduos sólidos. Estimativas indicam que o rendimento final da parte comestível varia entre 50 e 60% do peso total do animal, o que implica que aproximadamente 40 e 50% da biomassa capturada é descartada durante o processamento (Gonçalves et al., 2011). Esses resíduos são majoritariamente cefalotórax e cascas, considerando a produção de milhares de toneladas anuais do estado, o descarte desses resíduos representa um passivo ambiental crítico devido a sua alta carga orgânica e potencial poluente (Rossi; Grosso; Delerue-Matos, 2024).

A escolha de isolar actinobactérias do camarão-branco-do-Pacífico baseia-se na importância econômica dessa espécie para a economia cearense e no impacto ecológico associado ao uso de fontes provenientes de resíduos industriais para a obtenção de enzimas de interesse biotecnológico, com diversas aplicações. Além da utilização dos intestinos para a obtenção de isolados com potencial biotecnológico, as cabeças e cascas descartadas também podem ser empregadas na produção de meios de cultura mais baratos e igualmente nutritivos, por serem ricas em polímeros, proteínas, cálcio e quitina. Esses meios de cultura podem ainda ser aplicados em processos fermentativos voltados à prospecção de enzimas, como as quitinases (Brzezinska et al., 2010; Setiawan et al., 2021; Widyastuti et al., 2022).

3 – OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a produção de enzimas de interesse comercial por actinobactérias isoladas do intestino do camarão branco-do-Pacífico.

3.2 Objetivos específicos

- Analisar a pureza da coleção de cepas previamente isoladas através da coloração de Gram, de uma avaliação microscópica e da técnica de microscopia eletrônica de varredura.
- Realizar um *screening* para avaliar a capacidade das cepas de produzirem as enzimas de interesse.
- Fermentação das cepas positivas para amilases, celulasas e proteases.
- Quantificação de atividade enzimática dos extratos enzimáticos brutos.

4 – MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Reativação de cepas de actinobactérias

As 14 cepas de actinobactérias utilizadas neste trabalho foram previamente isoladas por Mesquita (2025), em um estudo colaborativo entre o Laboratório de Tecnologia do Pescado e o Laboratório de Microbiologia Ambiental. As culturas-estoque encontravam-se armazenadas em caldo ISP2 (Shirling; Gottlieb, 1966) a 4°C. Para a reativação destas cepas, dois métodos distintos foram empregados. O primeiro método consistiu no repique por esgotamento em estrias em placas contendo os meios ISP2 e ISP7 (Tabela 1 e 2). O segundo método foi a semeadura por espalhamento, na qual uma alíquota de 100 µL do caldo de armazenamento de cada cepa foi espalhada sobre a superfície do ágar com o auxílio de uma alça de Drigalski. Cada método foi realizado em triplicata para todas as cepas, visando garantir a recuperação das culturas viáveis. As cepas então foram armazenadas em incubadora DBO (Demanda bioquímica de oxigênio) por um período de 7 dias a $28 \pm 2^\circ\text{C}$.

Tabela 1 – Formulação do meio de cultura ISP2

Meio ISP2 pH 6,2 ± 0,2

Extrato de malte	3g
Extrato de levedura	3g
Dextrose	10g
Ágar bacteriológico	20g
Água destilada	1L

Fonte: Shirling; Gottlieb (1966) (Formulação para 1 litro de meio de cultura).

Tabela 2 – Formulação do meio de cultura ISP7
Meio ISP7 pH 7,2 ± 0,2

L-asparagina	1g
L-tirosina	0,5g
Fosfato dipotássico	0,5g
Sulfato de magnésio	0,5g
Sulfato ferroso	0,011mg
Cloreto de cobre	0,027mg
Cloreto de cobalto	0,040mg
Molibdato de sódio	0,025mg
Cloreto de zinco	0,020mg
Ácido bórico	2,85mg
Cloreto de sódio	0,5mg
Cloreto de magnésio	1,80mg
Tartarato de sódio	1,77mg
Ágar bacteriológico	20g
Água destilada	1L

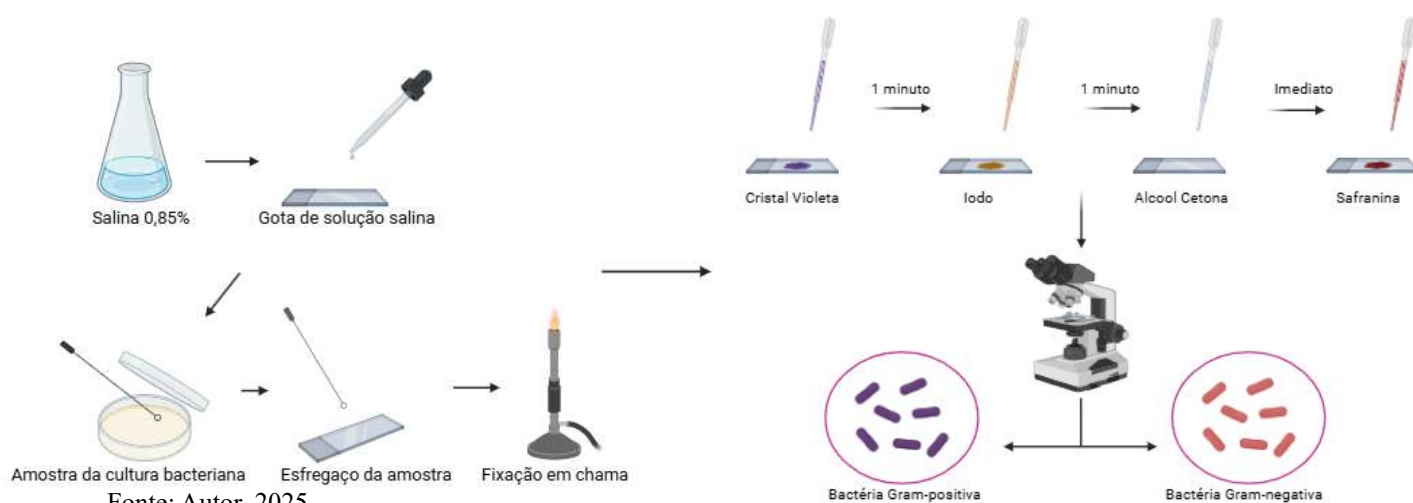
Fonte: Shirling; Gottlieb (1966) (Formulação para 1 litro de meio de cultura).

4.2 Coloração de Gram

Após o crescimento das cepas, foi realizada a coloração de Gram com o objetivo de validar se as amostras em questão eram cepas Gram-positivas. Para esse procedimento, foi pipetada uma gota de solução salina a 0,85%, previamente preparada, sobre lâminas estéreis. Em seguida, foi coletado material biológico das cepas analisadas e foi realizado um esfregaço na lâmina. Após a realização do esfregaço, o material foi fixado à lâmina com o auxílio de uma chama.

Na etapa seguinte, foi iniciado o processo de coloração. Cada lâmina foi coberta com solução de cristal violeta por um minuto; em seguida, foi lavada com água destilada e adicionada solução de lugol (mordente) também por um minuto. Após esse tempo, a lâmina foi novamente lavada com água destilada e adicionada uma solução de álcool-acetona (descolorante). Nessa etapa, as lâminas foram rapidamente lavadas em água corrente. Posteriormente, foi adicionada solução de fucsina fenicada (contra corante) e, após 30 segundos, as lâminas foram lavadas com água destilada e deixadas para secagem. Após a secagem as lâminas foram analisadas com o auxílio de um microscópio (Figura 2).

Figura 2 – Fluxograma da técnica de coloração de Gram.

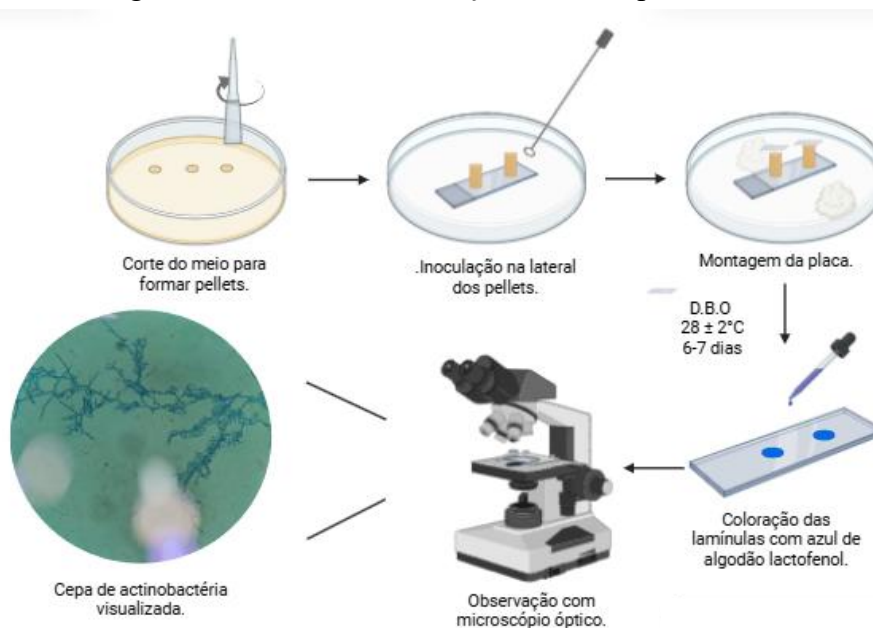


4.3 Caracterização microscópica

Para a caracterização microscópica das cepas de actinobactérias foi empregada a técnica do microcultivo, que consistiu na adaptação da técnica do método proposto por Kern e Blewins (1999). Todo o processo foi realizado em cabine de fluxo laminar e compreendeu as seguintes etapas: primeiramente, foi preparado o meio ISP2. A partir desse meio, previamente preparado e plaqueado, foi realizado o corte do ágar com o auxílio de uma ponteira estéril de 1 mL (15 mm de diâmetro), formando os *pellets*. Em seguida, foi adicionada uma lâmina estéril a uma placa de Petri também estéril e vazia; sobre essa lâmina, foram posicionados dois *pellets* distanciados entre si, com o auxílio de uma pinça previamente flambada. Posteriormente, a cepa foi coletada com o auxílio de uma alça de inoculação estéril, e os *pellets* foram inoculados lateralmente. Após essa etapa, foi posicionada uma lâmina circular sobre cada *pellet*. Para manter a umidade do sistema, foram adicionados dois chumaços de algodão umedecidos e estéreis em cada placa de Petri. Por fim, as placas foram fechadas e incubadas em DBO, sendo mantidas a 28 ± 2 °C por um período de sete dias.

Transcorridos os 7 dias, as lamínulas foram transferidas para lâminas estéreis, onde foram posicionadas sobre uma gota do reagente azul de algodão lactofenol, o excesso de reagente que extravasou os limites da lamínula foi seco e as lâminas foram analisadas com o auxílio de um microscópio óptico Zeiss Axioplan® até a lente objetiva de imersão (100x). Após a análise em microscópio óptico, as cepas foram fotografadas e sua morfologia comparada com o *Atlas of Actinomycetes* (1977) e com o *Digital Atlas of Actinomycetes 2* (2022) (Figura 3).

Figura 3 – Fluxograma da técnica de avaliação microscópica.



Fonte: Autor, 2025

4.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para a análise da morfologia das cepas em microscopia eletrônica de varredura, foi utilizada a mesma técnica descrita no tópico 3.3, com exceção da coloração com azul de algodão lactofenol. Após o crescimento das cepas, as lâminas foram transferidas para uma placa de 24 poços com fundo chato. Em seguida, foi aplicada uma solução de Karnovsky (Grigorev; Korzhevskii, 2018; Nishina et al., 2021) com o objetivo de fixar os micélios sobre as lamínulas. Após um período de 16 horas, a solução de Karnovsky foi removida e as lamínulas foram lavadas seis vezes com tampão fosfato de sódio 0,5 M, pH 7,4. Após a etapa de lavagens, as lamínulas foram submetidas ao processo de desidratação em série crescente de etanol (30, 50, 75 e 100%), sendo realizada a troca gradual das soluções. Em seguida, a placa de 24 poços foi encaminhada à Central Analítica da Universidade Federal do Ceará, onde ocorreram as etapas de secagem e metalização das lamínulas nos *stubs*. A visualização das cepas foi realizada por microscopia eletrônica de varredura, utilizando o microscópio Quanta 450 FEG, operando a 20 kV e 14,4 mm de *working distance*.

4.5 Screening enzimático

A capacidade das cepas em produzir e secretar enzimas hidrolíticas foi avaliada através de meios de cultura específicos descritos nos próximos tópicos (4.6, 4.7, 4.8 e 4.9), contendo indutores para as enzimas em questão: amilases, celulasas, lipases e proteases. Para a

realização dos *screenings* enzimáticos, foi empregado o método de inoculação por *spots*, que consistiu em coletar o inóculo com uma alça de inoculação estéril e inocular o meio de cultura por puntura. O experimento foi conduzido em quadruplicata, ou seja, foram realizados quatro *spots* por placa. Após a inoculação, as cepas foram incubadas em DBO a 28 ± 2 °C por um período de 7 a 10 dias. Durante esse período, as cepas produtoras das enzimas testadas formaram halos de hidrólise ao redor dos *spots*, que apresentaram diferentes características a depender do meio de cultura utilizado- alguns exibindo variações de coloração em relação ao meio, enquanto outros exigiram a adição de reagentes específicos para sua visualização (Parveen et al., 2017). O diâmetro do halo de hidrólise foi medido com o auxílio de um paquímetro, assim como o diâmetro da colônia, e, a partir desses dados, foi aplicada a fórmula proposta por Hankin e Anagnostakis (1975), possibilitando determinar a presença e a intensidade da atividade enzimática das cepas analisadas.

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

4.6 Atividade amilolítica

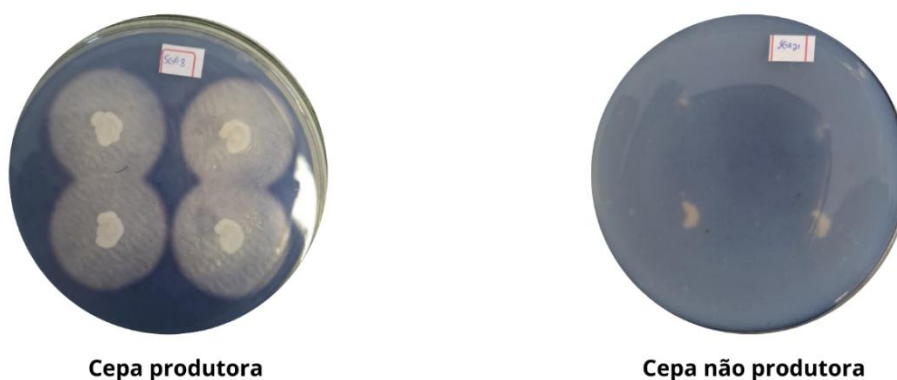
A avaliação qualitativa da atividade amilolítica foi realizada em meio de cultura SCA (Starch Casein Agar; Küster; Williams, 1964), conforme indicado no Anexo D, com procedimento metodológico baseado em Al-Gamy et al. (2021). As cepas foram inoculadas pontualmente na superfície do ágar, dispostas em quadruplicata – quatro *spots* por placa, e subsequentemente incubadas em estufa B.O.D. (Demanda Bioquímica de Oxigênio) a 28 ± 2 °C, por um período de 7 dias.

Transcorrido o tempo de incubação, a atividade enzimática foi revelada inundando-se a superfície do ágar com 10 mL de solução de Lugol 1% (m/v) por 1 minuto, com posterior descarte do excesso. A hidrólise do amido foi evidenciada pela formação de um halo claro (transparente) ao redor da colônia, contrastando com o fundo azul-violeta do meio (Apêndice C). Por fim, os diâmetros das colônias e dos halos de hidrólise foram mensurados com o auxílio de um paquímetro para o cálculo do índice enzimático, conforme equação descrita no tópico 3.5.

Tabela 3 – Formulação do meio de cultura SCA.

Meio SCA pH 6,2 ± 0,2	
Amido solúvel	10g
KNO ₃	2g
Caseína	1g
MgSO ₄	0,5g
FeSO ₄	0,001g
K ₂ HPO ₄	1g
CaCO ₃	0,1g
Ágar bacteriológico	18g
Água destilada	1L

Fonte: Küster; Williams (1964) (Formulação para 1 litro de meio de cultura).

Figura 4 – Exemplificação de cepa positiva e negativa para amilases.

Fonte: Autor (2025).

3.7 Atividade celulolítica.

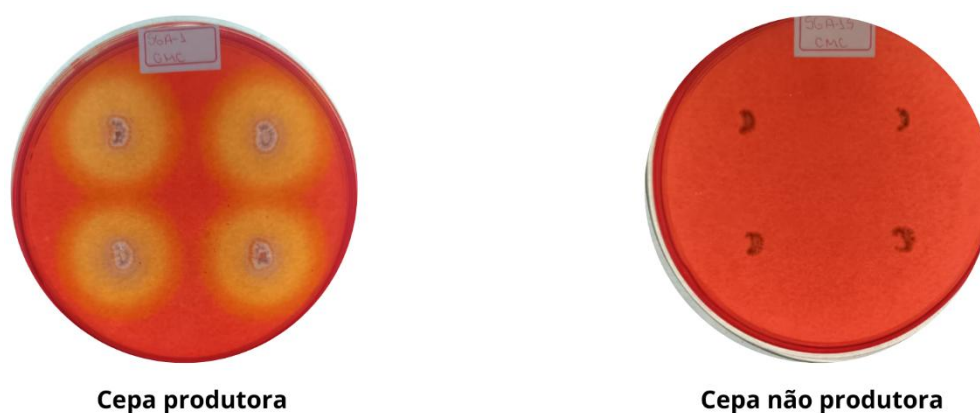
Para a avaliação qualitativa da atividade celulolítica, foi utilizado o meio de cultura contendo 0,5% (m/v) de carboximetilcelulose (CMC) conforme indicado na Tabela 4, como único substrato, conforme o protocolo de Couri e Farias (1995). As cepas foram inoculadas pontualmente na superfície do meio, em quadruplicata – quatro *spots* por placa, e incubadas em estufa D.B.O. a 28 ± 2 °C por 7 dias.

Transcorrido o período de incubação, a atividade enzimática foi revelada: as placas foram inundadas com solução de vermelho congo por 15 minutos, seguida pelo descarte do corante. Para o descoramento do meio e revelação dos halos, foi adicionada uma solução de lavagem NaCl 2mol/L, que permaneceu em contato com o ágar por 30 minutos antes de ser descartada. A hidrólise da CMC foi evidenciada pela formação de um halo de hidrólise claro amarelo-laranja ao redor das colônias produtoras, contrastando com o fundo vermelho-castanho do ágar corado (Figura 5). Os diâmetros das colônias e dos halos foram mensurados com paquímetro para o cálculo do índice enzimático, conforme equação descrita no tópico 3.5.

Tabela 4 – Formulação do meio de cultura CMC

Meio CMC pH 6,0 ± 0,2	
Carboximetilcelulose	5g
MgSO ₄	0,5g
K ₂ HPO ₄	1g
NaNO ₃	3g
FeSO ₄	0,01g
Ágar bacteriológico	15g
Água destilada	1L

Fonte: Couri; Farias (1995) (Formulação para 1 litro de meio de cultura).

Figura 5 – Exemplificação de cepa positiva e negativa para celulases.

Fonte: Autor (2025).

3.8 Atividade lipolítica

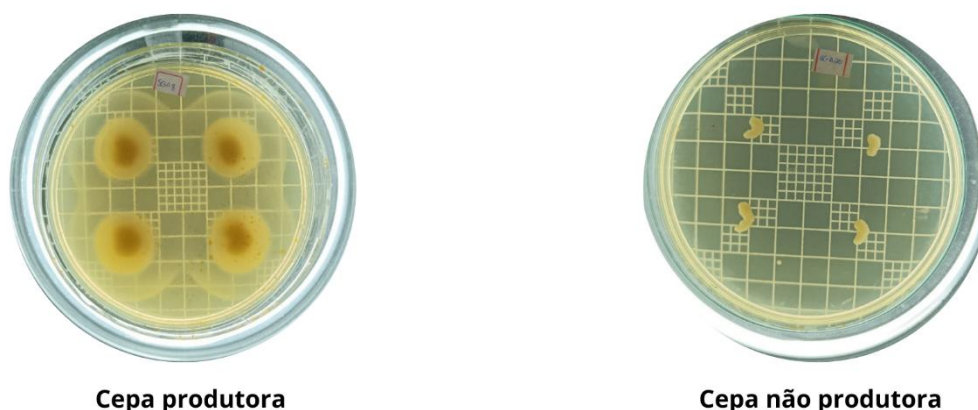
A avaliação da atividade lipolítica foi conduzida em meio de cultura sólido adaptado de Balagurunathan et al. (2016), contendo Tween 80 como substrato e fonte de lipídios (Tabela 5). As cepas foram inoculadas pontualmente na superfície do ágar, em quadruplicata – quatro *spots* por placa, e incubadas em estufa B.O.D. a 28 ± 2 °C por 10 dias.

Transcorrido o período de incubação, a atividade da lipase foi detectada pela observação visual de um halo de precipitação opaco e esbranquiçado ao redor das colônias produtoras (Figura 6). Os diâmetros da colônia e do halo de precipitação foram mensurados com paquímetro para o cálculo do índice enzimático, conforme a equação descrita no tópico 4.5.

Tabela 5 – Formulação do meio de cultura para atividade lipolítica.

Meio para atividade lipolítica pH 7,4 ± 0,2	
CaCl ₂ .H ₂ O	0,1g
NaCl	0,5g
Peptona bacteriológica	10g
Tween 80	5ml
Ágar bacteriológico	15g
Água destilada	995mL

Fonte: Adaptação de Balagurunathan et al. (2016) (Formulação para 1 litro de meio de cultura).

Figura 6 – Exemplificação de cepa positiva e negativa para lipases.

Fonte: Autor (2025).

4.9 Atividade proteolítica.

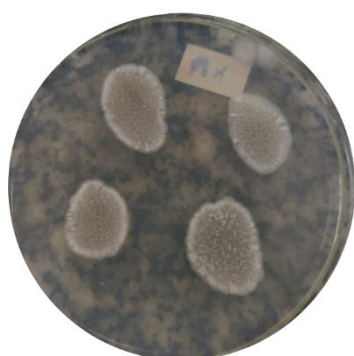
A avaliação da atividade proteolítica foi realizada utilizando o meio de cultura *Skim Milk Agar* (SMA) que contém leite desnatado em pó (Tabela 6). Este meio é naturalmente opaco devido à suspensão coloidal da caseína, a principal proteína do leite, que atua como substrato. As cepas foram inoculadas pontualmente na superfície do ágar, em quadruplicata – quatro *spots* por placa, e incubadas em estufa B.O.D. a 28 ± 2 °C por 7 dias.

Transcorrido o período de incubação, a atividade da protease foi detectada visualmente pela formação de um nítido halo de hidrólise claro e transparente ao redor das colônias produtoras, contrastando com o fundo branco e opaco do meio (Figura 7). Este halo indica que a caseína insolúvel foi hidrolisada em peptídeos e aminoácidos solúveis. Por fim, os diâmetros da colônia e do halo de hidrólise foram mensurados com paquímetro para o cálculo do índice enzimático, conforme equação descrita no tópico 3.5.

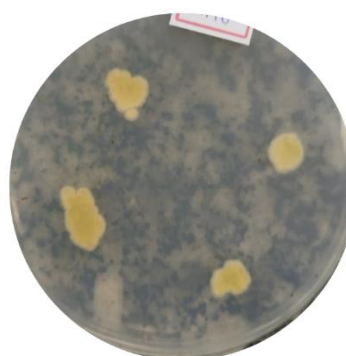
Tabela 6 – Formulação do meio de cultura SMA.

Meio SMA pH 7,0 ± 0,2	
Leite desnatado em pó	5g
NaCl	3g
Peptona bacteriológica	3g
Ágar bacteriológico	15g
Água destilada	1L

Fonte: Adaptação de Fernandez; Ramachandran; Nallakumar, (2018) (Formulação para 1 litro de meio de cultura).

Figura 6 – Exemplificação de cepa positiva e negativa para proteases.**Cepa produtora**

Fonte: Autor (2025).

**Cepa não produtora**

4.10 Fermentação.

A partir da análise dos resultados dos *screenings*, foi selecionada a cepa com o maior índice enzimático e baixos valores de desvio padrão. A cepa selecionada foi então repicada em meio Bennet (Tabela 7) para propiciar a esporulação (Jones, 1949). Após 14 dias de incubação em estufa B.O.D. a 28 ± 2 °C, preparou-se uma suspensão de esporos para a preparação do inóculo-mãe. Esta suspensão de esporos foi padronizada por turbidimetria para uma densidade óptica (DO) de 0,1 lida a 600 nm (Yepes-Garcia et al., 2020). Após essa etapa, os meios de cultura descritos nos Anexos D e E, bem como o meio para atividade proteolítica (descrito no Anexo G, acrescido de 2% m/v de frutose), foram preparados sem ágar bacteriológico e distribuídos em frascos Erlenmeyer de 150 mL. Cada frasco recebeu um volume de 28,5 mL de meio (correspondendo a 19% do volume total da vidraria), sendo então esterilizados. Após a esterilização, três dos quatro Erlenmeyers (para cada meio de cultura) foram inoculados com 1% (v/v) da suspensão de esporos padronizada. No último frasco, o volume equivalente ao inóculo (1%) foi completado com água destilada estéril, servindo como controle negativo do experimento. Os Erlenmeyers foram então incubados sob agitação orbital a 250 RPM, por um período de 7 dias a 28 ± 2 °C.

Tabela 7 – Formulação do meio de cultura Bennets.

Meio Bennets pH 7,0 ± 0,2	
Extrato de levedura	1g
Extrato de carne	1g
Triptona	2g
Dextrose	10g
Ágar bacteriológico	15g
Água destilada	1L

Fonte: Jones, 1949 (Formulação para 1 litro de meio de cultura).

4.11 Quantificação de amilases.

Transcorridos os 7 dias de agitação, o caldo fermentado foi submetido à centrifugação a 10.500 RPM e 4°C por 15 minutos para separação da biomassa celular. O sobrenadante, posteriormente tratado como extrato enzimático bruto (EEB), foi recuperado, e as células foram autoclavadas e descartadas. A atividade amilolítica do EEB foi determinada pelo método de quantificação de açúcares redutores, utilizando o reativo DNS (ácido 3,5-dinitrossalicílico), conforme a metodologia descrita por Miller (1959). O ensaio consistiu na adição de 0,5 mL do EEB a 0,5 mL de substrato (solução de amido solúvel 1% m/v, preparada em tampão fosfato de sódio 500 mmol.L⁻¹ pH 6,0). A mistura reacional foi incubada em banho-maria a 40 °C por 30 minutos, sendo a reação interrompida pela adição de 1,5 mL do reativo DNS. Para o desenvolvimento da cor, os tubos foram aquecidos em banho-maria fervente por 10 minutos e, em seguida, resfriados em banho de gelo. A absorbância foi determinada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 540 nm. Para cada amostra, foi utilizado o controle negativo como branco, e todas as análises foram realizadas em triplicata.

4.12 Quantificação de celulases.

Após os 7 dias de agitação, o caldo fermentado foi submetido à centrifugação (10.500 RPM e 4 °C por 15 minutos) para separação da biomassa celular. O extrato enzimático bruto (EEB) foi recuperado e as células foram autoclavadas e descartadas. A atividade celulolítica (CMCase) do EEB foi determinada pelo método de quantificação de açúcares redutores, utilizando o reativo DNS (Miller, 1959). O ensaio consistiu na adição de 1,0 mL do EEB a 1,0 mL de substrato (solução de carboximetilcelulose 1% m/v, preparada em tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,2). A mistura reacional foi incubada em banho-maria a 50°C por 30 minutos. A reação foi interrompida com a adição de 3,0 mL de DNS. Para o desenvolvimento da cor, os tubos foram aquecidos em banho-maria fervente por 10 minutos e, em seguida, resfriados em banho de gelo. A absorbância foi determinada em espectrofotômetro no

comprimento de onda de 540 nm. Para cada amostra foi utilizado um controle negativo como branco, e todas as análises foram realizadas em triplicata.

4.13 Quantificação de proteases.

Para a dosagem de proteína total, foi empregado o ensaio de Bradford (Greenfield, 2018). Primeiramente, uma curva padrão foi construída utilizando soluções de concentrações conhecidas de Albumina Sérica Bovina (BSA). As amostras (sobrenadantes) e os pontos da curva foram analisados em duplicata. O procedimento consistiu na adição de 100 µL da amostra a 2,5 mL do Reagente de Bradford. A mistura foi levemente agitada e incubada por 10 minutos. As leituras de densidade óptica foram realizadas a 595 nm, utilizando um branco de reagente para a calibração do espectrofotômetro. As concentrações proteicas nos sobrenadantes foram subsequentemente determinadas comparando-se suas absorbâncias com a equação da reta gerada pela curva padrão.

Para a avaliação da atividade proteolítica foi utilizado um protocolo adaptado de Oliveira et al. (2023). Um volume de 160µL do EEB foi pipetado junto a uma 40µL de uma solução de L-cisteína 10mM para ativação enzimática, as soluções foram homogeneizadas e o processo de ativação durou 5 minutos. Após esse período foram adicionados 300µL de solução de azocaseína 1% em Tris-Hcl 50mM pH 7,0, a solução foi então levada a banho seco a 37 °C onde a reação ocorreu por 1 hora. Após esse período, foi adicionado 200 µL de TCA 15% (Ácido tricloroacético) para parar a reação. Após essa etapa, a solução passou por centrifugação a 5000g por 5 minutos, transcorrido o tempo, foi preparada uma solução com 400µL do sobrenadante resultante da centrifugação e 400 µL de solução NaOH 1 mol/L. Essa solução foi lida a 420 nm previamente calibrado com água e o controle negativo.

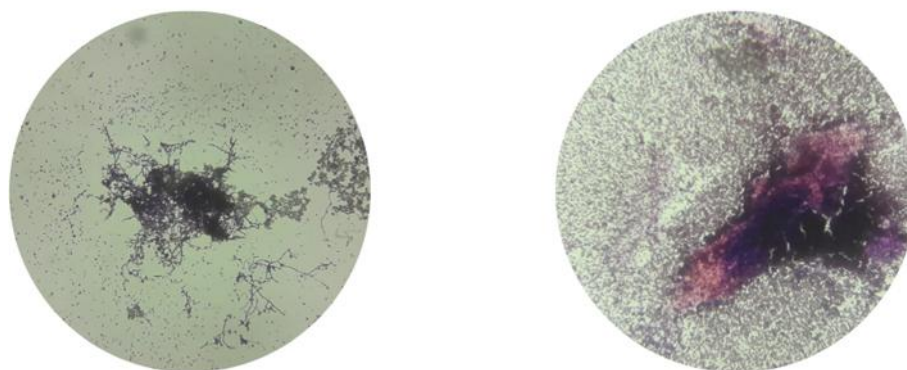
5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.

5.1 Coloração de Gram

A coloração de Gram foi empregada como ferramenta de triagem para descarte de possíveis contaminações e confirmação do caráter Gram-positivo das cepas após o repique (Figura 7). Todas as 14 cepas apresentaram resultado positivo, em concordância com a literatura, uma vez que actinobactérias são caracterizadas por uma espessa camada de peptidoglicano na parede celular. Embora essa técnica não permita identificação taxonômica detalhada, ela se mostra adequada para caracterização preliminar e controle de pureza das culturas. Além disso, a

estrutura da parede celular Gram-positiva confere maior resistência a variações ambientais e está associada à eficiente secreção de enzimas extracelulares, aspecto relevante para o potencial biotecnológico observado neste estudo (Barka et al., 2016; Hazarika; Thakur, 2020)

Figura 7 – Cepas de actinobactérias após coloração de Gram.

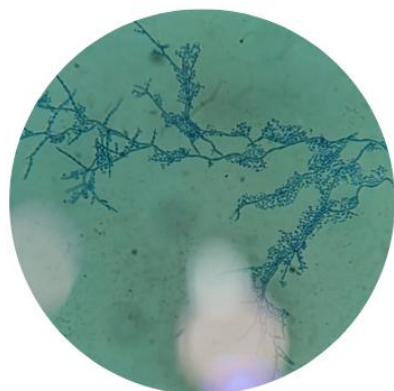


Fonte: Autor, 2025.

5.2 Caracterização microscópica

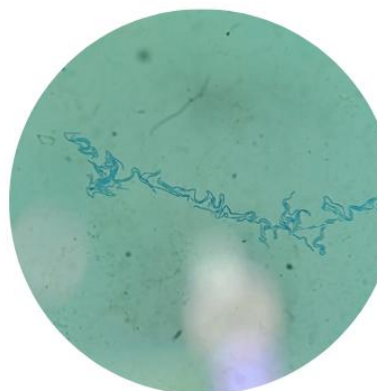
A técnica de avaliação microscópica foi utilizada como método para a caracterização micromorfológica e diferenciação preliminar das cepas. Dentre as cepas cinco apresentaram a formação de cadeias de esporos, característica típica de actinobactérias filamentosas. Por outro lado, as nove cepas restantes foram classificadas como não-filamentosas, sendo cinco de morfologia bacilar e quatro de morfologia cocoide (Figura 8). Essa variação é consistente com a literatura para o filo *Actinobacteria*, que abrange organismos esporulados, pleomórficos e de ciclo complexo. A diversidade morfológica constatada está de acordo com a ampla heterogeneidade descrita para o grupo (Goodfellow et al., 2012). Em ecossistemas marinhos, as actinobactérias apresentam notável dualidade morfológica, indo desde gêneros filamentosos como *Salinispora* (Maldonado et al., 2005) até gêneros que se apresentam sob a forma de cocos, bacilos e nocardioformes, como *Rhodococcus*, *Salinibacterium* e *Dietzia* (Andreolli et al., 2023; Brown-Elliott et al., 2024; Lu et al., 2023; Rathore; Sheikh; Singh, 2020).

Figura 8 – Diferença entre cepas filamentosas e não filamentosas



Cepa filamentosa

Fonte: Autor, 2025.

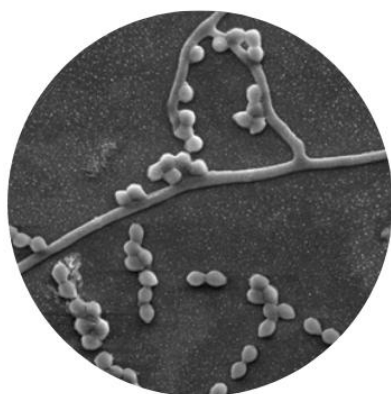


Cepa não filamentosa

5.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

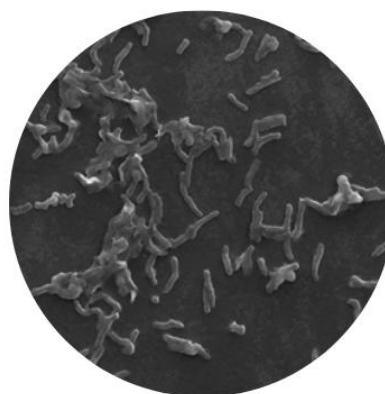
Das 14 cepas utilizadas neste estudo, 12 foram analisadas por MEV. Essas 12 cepas corroboram a diversidade morfológica observada, incluindo formas filamentosas, cocoides e bacilares. Entretanto, em algumas micrografias é possível identificar a presença de cristais de sal formados durante o preparo das amostras, indicando a necessidade de revisão do protocolo, possivelmente com o aumento do número de lavagens para garantir a remoção adequada da solução de Karnovsky (Figura 9).

Figura 9 – Diferença entre cepas filamentosas e não filamentosas a 20 μm .



Cepa filamentosa

Fonte: Autor, 2025.



Cepa não filamentosa

5.4 Atividades enzimáticas

A triagem enzimática revelou o potencial biotecnológico das 14 cepas de actinobactérias, com destaque para a produção de hidrolases extracelulares. A atividade celulolítica foi a mais prevalente, sendo detectada em 7 cepas (SGA1, SGA5, SGA6, SGA8, SGA9, SGA18 e SGA23). A produção de proteases e lipases foi confirmada em 6 cepas para cada classe enzimática (SGA1, SGA5, SGA6, SGA8, SGA18 e SGA19 para proteases; e SGA1, SGA5, SGA6, SGA8, SGA9 e SGA18 para lipases). Já a atividade amilolítica foi observada em 5 cepas (SGA5, SGA6, SGA8, SGA9 e SGA 22). Além disso, é possível observar a versatilidade metabólica das cepas SGA5, SGA6 e SGA8, que apresentaram capacidade de hidrólise positiva para todas as quatro enzimas testadas.

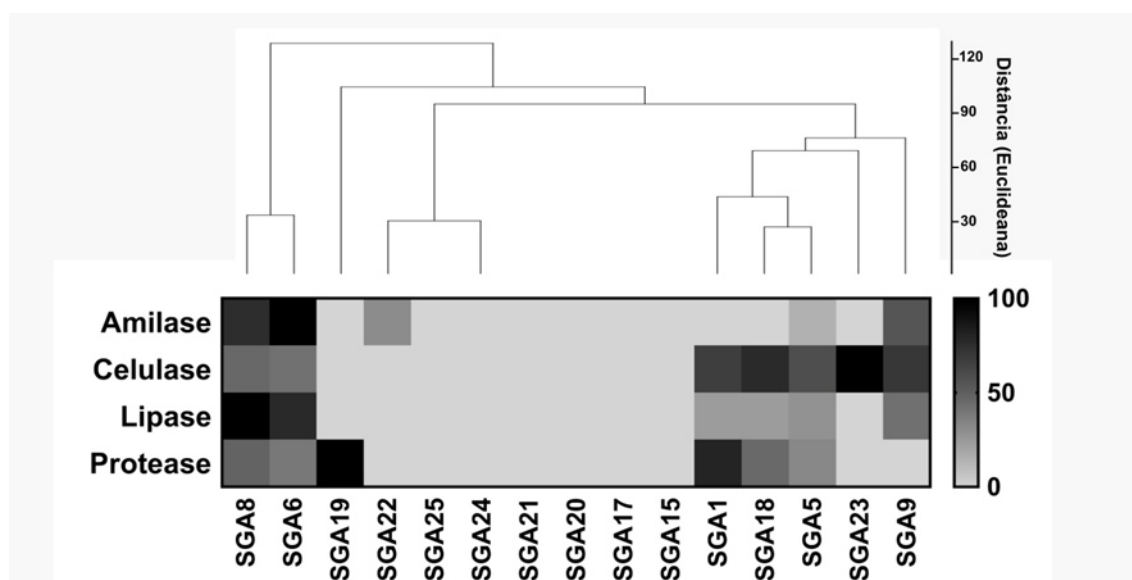
O conceito de *hit rate* é amplamente utilizado em estudos de prospecção microbiana para expressar a proporção de cepas que possuem determinada atividade bioquímica. Em estudos com actinobactérias, *hit rates* variáveis têm sido reportados, dependendo da origem das cepas e do tipo de enzima avaliada. Topatan e Hatice (2022) observaram taxas entre 68% e 100% para amilase, celulase, protease e lipase; Arumugam et al. (2017) relataram 26,4% de cepas enzimaticamente ativas; e algumas pesquisas com actinobactérias marinhas encontraram valores entre 43% e 81% para diferentes enzimas hidrolíticas (Selvam; Vishnupriya; Bose, 2011; Shaik et al., 2017; Swarna; Gnanadoss, 2020). No presente estudo, foram analisadas 14 cepas de actinobactérias, das quais 7 apresentaram atividade celulolítica, correspondendo a um *hit rate* de 50%. Para as atividades, proteolítica e lipolítica, 6 cepas demonstraram ser enzimaticamente ativas, representando um *hit rate* de 42,9%. Para a atividade amilolítica 5 cepas demonstraram ser enzimaticamente ativas, representando um *hit rate* de 35,7%. Esse desempenho enzimático das cepas analisadas está dentro da faixa observada na literatura, reforçando o potencial biotecnológico das actinobactérias isoladas do intestino do camarão-branco-do-Pacífico.

O *heatmap* (Figura 1) ilustra o perfil metabólico das cepas, na qual a intensidade da cor é proporcional a atividade enzimática, e as cepas mais produtoras são representadas em tons mais escuros. A análise de agrupamento revelou 3 padrões distintos: um grupo de alta performance multienzimática à esquerda, um grupo especializado em celulases e proteases a direita, e um núcleo central com atividades moderadas e baixas, permitindo a identificação visual das cepas mais promissoras de cada enzima.

A detecção de cepas produtoras de enzimas extracelulares no trato digestório do camarão branco-do-Pacífico evidencia uma relação de sinergismo nutricional entre a microbiota

e o hospedeiro (Bernal et al., 2015). Embora o camarão possua aparato enzimático endógeno capaz de sintetizar proteases e amilases, a contribuição microbiana é fundamental, especialmente na hidrólise de polímeros complexos. A alta ocorrência de cepas celulolíticas é relevante, uma vez que rações comerciais para carcinicultura utilizam ingredientes vegetais como soja ou milho. Como crustáceos, decápodes possuem capacidade limitada de ingerir celulose, a microbiota atua de forma complementar, quebrando fibras vegetais e liberando nutrientes que, de outra forma, seriam excretados sem absorção. (Rai et al., 2025; Zhou et al., 2025).

Figura 10 – *Heatmap* do perfil enzimático das cepas de actinobactérias do camarão branco-do-Pacífico analisadas.



Fonte: Autor, 2025.

(A) Heatmap: a intensidade de cor em cada célula representa o nível relativo de atividade enzimática para cada isolado. A escala de cores (barra vertical à direita) varia de preto (alta atividade) a branco/cinza muito claro (baixa ou nenhuma atividade detectada).

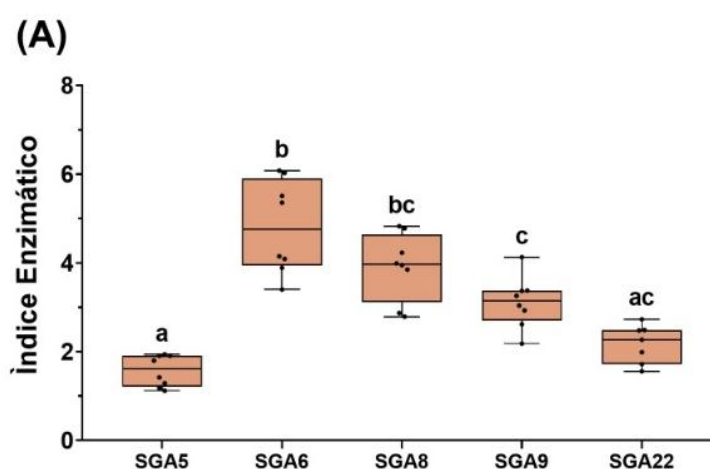
(B) Dendrograma: agrupamento hierárquico dos isolados com base na distância euclidiana de dissimilaridade dos seus perfis enzimáticos. Isolados conectados por ramos mais curtos apresentam perfis metabólicos mais similares. Os clusters principais sugerem a presença de grupos funcionais distintos dentro da coleção de isolados.

4.5 Atividade amilolítica

O índice enzimático para amilase das cepas SGA5, SGA6, SGA8, SGA9 e SGA22, foi comparado para avaliar seus desempenhos relativos (Gráfico 1). A cepa SGA6 se destacou,

apresentando mediana próxima de 5,5, com valores variando entre 4 e 6, caracterizando o maior potencial amilolítico entre as analisadas. Em seguida, a cepa SGA8 demonstrou atividade intermediária a alta, com mediana aproximada de 4,5, enquanto SGA9 apresentou desempenho moderado, com mediana em torno de 3,0 a 3,2. Por fim, as cepas SGA5 e SGA22 exibiram as menores atividades metabólicas, situando-se significativamente abaixo das demais.

Gráfico 1 – *Boxplot* com os índices enzimáticos de cepas de actinobactérias do camarão branco-do-Pacífico com atividade amilolítica.

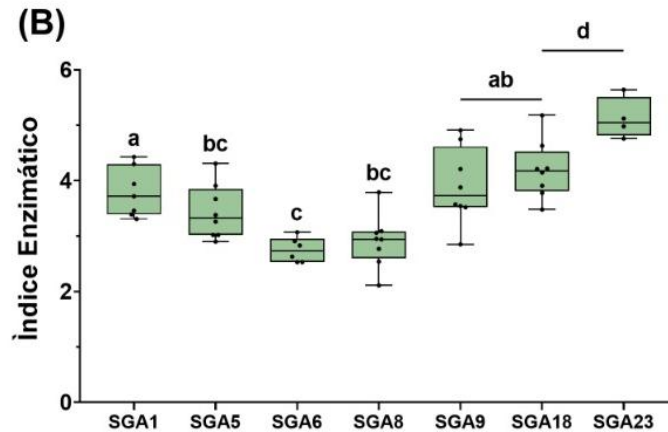


Fonte: Autor, 2025.

4.6 Atividade celulolítica

O índice enzimático para celulase das cepas SGA1, SGA5, SGA6, SGA8, SGA9, SGA18 e SGA23, evidenciou diferenças na capacidade de degradação da celulose (Gráfico 2). A cepa SGA23 é a mais destacada, apresentando mediana próxima de 5,5 e valores variando entre 5 e 6, caracterizando a maior atividade celulolítica do conjunto. As cepas SGA1, SGA5, SGA9 e SGA18 demonstram desempenho de moderado a alto, com medianas entre 3,5 e 4. Por fim, SGA6 e SGA8 exibem as menores atividades celulolíticas do grupo, situando-se significativamente abaixo das demais.

Gráfico 2 – *Boxplot* com os índices enzimáticos de cepas de actinobactérias do camarão branco-do-Pacífico com atividade celulolítica.

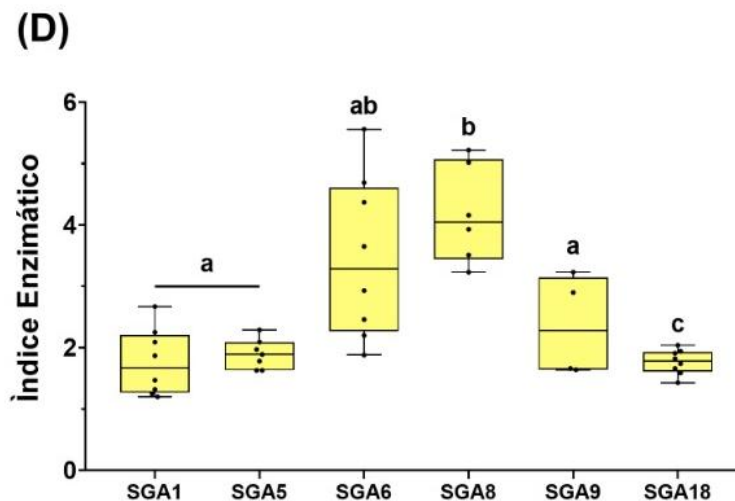


Fonte: Autor, 2025.

4.8 Atividade lipolítica

O índice enzimático para lipase das cepas SGA1, SGA5, SGA6, SGA8, SGA9 e SGA18, revelou ampla variação no potencial de degradação lipolítica (Gráfico 3). A cepa SGA8 demonstrou a maior atividade, com mediana entre 4,8 e 5,0, indicando elevada capacidade lipolítica. As cepas SGA5 e SGA6 apresentaram valores intermediários, entre 3 e 4, enquanto SGA1 e SGA9 exibiram atividades menores, com medianas entre 2 e 2,5. Por fim, a cepa SGA18 apresentou a menor atividade lipolítica, com valores próximos de 1,5, situando-se significativamente abaixo das demais.

Gráfico 3 – *Boxplot* com os índices enzimáticos de cepas de actinobactérias do camarão branco-do-Pacífico com atividade lipolítica

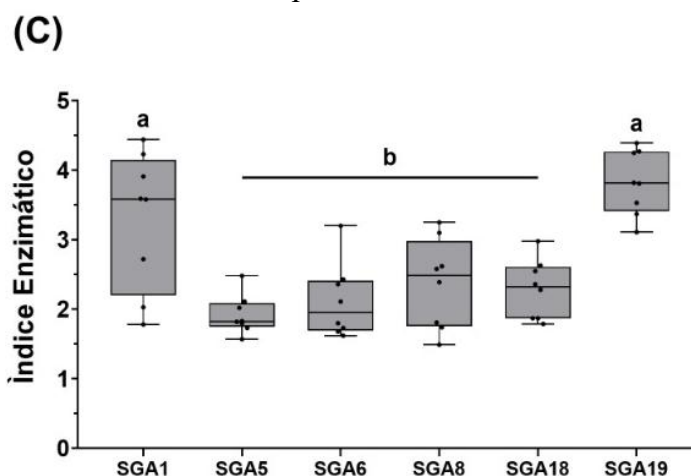


Fonte: Autor, 2025.

4.7 Atividade proteolítica.

O índice enzimático para protease das cepas SGA1, SGA5, SGA6, SGA8, SGA18 e SGA19, revelou um padrão mais concentrado, embora com diferenças claras entre as cepas (Gráfico 4). A cepa SGA1 apresenta a maior atividade proteolítica, com mediana entre 3,8 e 4,0, sendo significativamente superior às demais. A cepa SGA19 também se destaca, exibindo mediana aproximada de 3,5 e configurando o segundo maior nível de atividade. Já as cepas SGA5, SGA6, SGA8 e SGA18 formam um grupo intermediário, com medianas variando entre 2 e 2,5, sem grandes distanciamentos entre si, o que sugere atividades moderadas e relativamente homogêneas.

Gráfico 4 – *Boxplot* com os índices enzimáticos de cepas de actinobactérias do camarão branco-do-Pacífico com atividade proteolítica.



Fonte: Autor, 2025.

4.9 Quantificação de enzimas

A cepa SGA1 apresentou uma notável capacidade de produção de proteases, alcançando 138,16 UI/mL ($\mu\text{mol azopeptídeo} \times \text{min}^{-1}$). Este valor é superior às demais atividades testadas, o que corrobora o papel ecológico das actinobactérias marinhas como decompositoras primárias de matéria orgânica. A alta taxa de conversão do substrato (azocaseína) indica que a cepa possui maquinaria enzimática robusta adaptada a dieta do camarão, que é rica em proteínas, tal característica a posiciona como uma candidata promissora para compor consórcios probióticos, visando auxiliar a hidrólise da ração animal e a conversão alimentar do hospedeiro.

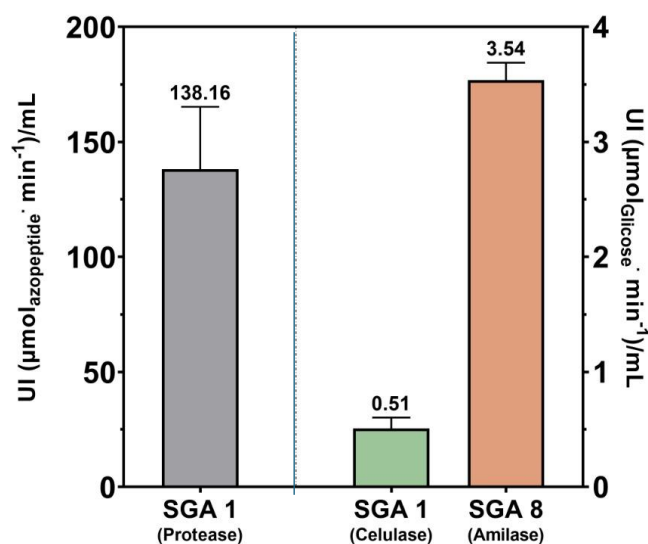
Ao comparar os níveis de produção enzimática obtidos com dados da literatura recente, destaca-se o desempenho superior da SGA1, visto que isolados selvagens de ambientes

aquáticos e sedimentos marinhos costumam apresentar atividades situadas entre 40 e 99 UI/mL (Anjani; Setyati; Pringgenies, 2025; Mazón-Suástegui et al., 2025). Os valores obtidos se assemelham ao desempenho de linhagens já submetidas a processos de otimização estatística (Septianingrum et al., 2024), corroborando a elevada eficiência metabólica e o potencial biotecnológico observado nessa cepa.

A cepa SGA1 também apresentou atividade celulolítica, porém em menor magnitude, obtendo o resultado de 0,51 UI/mL ($\mu\text{mol glicose} \times \text{min}^{-1}$). Esse resultado é compreensível, uma vez que a degradação de matéria celulósica é bioquimicamente mais complexa e lenta, porém, a detecção dessa proteína é importante, uma vez que o camarão branco-do-Pacífico não produz enzimas celulolíticas de forma endógena, a presença de bactérias capazes de liberar, ainda que em pequenas quantidades, açúcares redutores a partir de fibras vegetais sugere uma contribuição na digestão de ingredientes vegetais nas rações comerciais (James et al., 2023; Mazón-Suástegui et al., 2025).

Na avaliação da hidrólise de amido, a cepa SGA8 se destacou com uma atividade de 3,54 UI/mL ($\mu\text{mol glicose} \times \text{min}^{-1}$), este valor é superior ao obtido na avaliação de atividade celulolítica, o que reflete a natureza do amido, pois o amido é menos recalcitrante que a celulose e, portanto, é mais prontamente acessado pelas enzimas bacterianas. A atividade registrada evidencia o potencial da cepa SGA8 em metabolizar fontes de carboidratos energéticos comuns na aquicultura, liberando glicose disponível para rápida absorção intestinal e fornecimento de energia rápida ao hospedeiro (Gráfico 5).

Gráfico 5 – Gráfico em colunas com os resultados da quantificação enzimática de cepas de actinobactérias do camarão branco-do-Pacífico.



Fonte: Autor, 2025

6 - CONCLUSÃO

Actinobactérias isoladas do trato intestinal do camarão branco-do-Pacífico constituem um reservatório promissor com elevado potencial biotecnológico. As 14 cepas apresentaram diversidade morfológica confirmando a plasticidade fenotípica do filo *Actinobacteria* e a complexidade da comunidade microbiana associada ao hospedeiro.

A triagem enzimática revelou uma taxa de positividade superior à frequentemente reportada em prospecções ambientais não direcionadas, validando a hipótese de que o ambiente intestinal exerce uma pressão seletiva favorável a microrganismos metabolicamente competentes. Destaca-se a alta prevalência de cepas celulolíticas, um dado ecologicamente relevante, considerando a incapacidade do camarão em digerir fibras vegetais presentes nas rações comerciais. Quantitativamente, a cepa SGA1 emergiu como a mais versátil e potente, registrando uma atividade proteolítica excepcionalmente alta de 138.16 UI·mL⁻¹ e, simultaneamente, uma atividade celulolítica basal detectável de 0.51 UI·mL⁻¹. Em contrapartida, a cepa SGA8 mostrou um perfil distinto, com atividade amilolítica significativa de 3.54 UI·mL⁻¹. A identificação de cepas com perfis enzimáticos tão distintos e com valores absolutos elevados em suas respectivas categorias reforça a viabilidade técnica de sua utilização seletiva.

Com base nos resultados quantitativos e em parâmetros consagrados da literatura de enzimologia microbiana, conclui-se que o ambiente intestinal do camarão selecionou cepas com perfis enzimáticos distintos e de relevância biotecnológica direta. A cepa SGA1 demonstra um perfil excepcional, evidenciado por uma atividade proteolítica ($138,16 \text{ UI}\cdot\text{mL}^{-1}$) que se enquadra na faixa de alto rendimento para triagens primárias e é mais de 270 vezes superior à sua própria atividade celulolítica basal ($0,51 \text{ UI}\cdot\text{mL}^{-1}$), um padrão condizente com a pressão seletiva de um nicho rico em proteínas. Paralelamente, a cepa SGA8 apresenta um potencial amilolítico consistente e significativo ($3,54 \text{ UI}\cdot\text{mL}^{-1}$), válido para aplicações na hidrólise de carboidratos. Esses achados validam a hipótese ecológica inicial e posicionam essas cepas, sobretudo a SGA1, como candidatas promissoras para o desenvolvimento de aditivos enzimáticos ou consórcios microbianos voltados à nutrição em aquicultura.

7 – REFERÊNCIAS

Abril, Blanca et al. Role of enzymatic reactions in meat processing and use of emerging technologies for process intensification. **Foods**, v. 12, n. 10, p. 1940, 2023.

Anjani, Devi Oktavia; Setyati, Wilis Ari; Pringgenies, Delianis. Highlighting Protease-Producing Bacteria from The Shrimp Wastewater Treatment Plant as Potential Bioremediation Agents. **Jordan Journal of Biological Sciences**, v. 18, n. 3, 2025.

Anteneh, Yitayal Shiferaw; Franco, Christopher Milton Mathew. Whole cell actinobacteria as biocatalysts. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 77, 2019.

Arumugam, T. et al. Screening of novel actinobacteria and characterization of the potential isolates from mangrove sediment of south coastal India. **Microbial Pathogenesis**, v. 107, p. 225-233, 2017.

Asmild, Mette et al. Is economies of scale driving the development in shrimp farming from *Penaeus monodon* to *Litopenaeus vannamei*? The case of Indonesia. **Aquaculture**, v. 579, p. 740178, 2024.

Bahaddad, Shifa A. et al. *Bacillus* species as direct-fed microbial antibiotic alternatives for monogastric production. **Probiotics and antimicrobial proteins**, v. 15, n. 1, p. 1-16, 2023.

Baig, Ulfat et al. Phylogenetic diversity and activity screening of cultivable actinobacteria isolated from marine sponges and associated environments from the western coast of India. **Access Microbiology**, v. 3, n. 9, p. 000242, 2021.

Balagurunathan, R. et al. **Protocols in actinobacterial research**. New York: Springer US, 2020.

Barger, Sarah R. et al. Imaging secondary metabolism of *Streptomyces* sp. Mg1 during cellular lysis and colony degradation of competing *Bacillus subtilis*. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 102, n. 3, p. 435-445, 2012.

Barka, Essaid Ait et al. Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 80, n. 1, p. 1-43, 2016.

Bentley, S. D. et al. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). **Nature**, v. 417, p. 141-147, 2002.

Bernal, Milagro García et al. Isolation and in vitro selection of actinomycetes strains as potential probiotics for aquaculture. **Veterinary World**, v. 8, n. 2, p. 170, 2015.

Bhardwaj, Kamal Kumar; Gupta, Reena. Synthesis of chirally pure enantiomers by lipase. **Journal of Oleo Science**, v. 66, n. 10, p. 1073-1084, 2017.

Bibb, Maureen J. et al. Expression of the chaplin and rodlin hydrophobic sheath proteins in *Streptomyces venezuelae* is controlled by σ BldN and a cognate anti-sigma factor, RsbN. **Molecular Microbiology**, v. 84, n. 6, p. 1033-1049, 2012.

Binod, Parameswaran et al. Enzymes for second generation biofuels: recent developments and future perspectives. **Bioresource Technology Reports**, v. 5, p. 317-325, 2019.

Brandão, Hellyjúnyor et al. Growth performance of *Litopenaeus vannamei* under biofloc system using denitrified seawater. **Aquaculture International**, v. 32, n. 3, p. 3129-3145, 2024

Brown-Elliott, Barbara A.; Zelazny, Adrian M.; Conville, Patricia S. *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Gordonia*, *Actinomadura*, *Streptomyces*, and other aerobic actinomycetes. **ClinMicroNow**, p. 1-34, 2024.

Brzezinska, Maria Swiontek et al. Utilization of Shrimp-Shell Waste as a Substrate for the Activity of Chitinases Produced by Microorganisms. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 19, n. 1, 2010.

Bull, Alan T.; Stach, James EM. Marine actinobacteria: new opportunities for natural product search and discovery. **Trends in Microbiology**, v. 15, n. 11, p. 491-499, 2007.

Casas-Godoy, Leticia et al. Lipases: an overview. **Lipases and phospholipases: methods and protocols**, p. 3-38, 2018.

Castro, Aline M.; Castilho, Leda R.; Freire, Denise MG. An overview on advances of amylases production and their use in the production of bioethanol by conventional and non-conventional processes. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 1, n. 4, p. 245-255, 2011.

Chapman, Jordan; Ismail, Ahmed E.; Dinu, Cerasela Zoica. Industrial applications of enzymes: Recent advances, techniques, and outlooks. **Catalysts**, v. 8, n. 6, p. 238, 2018.

Chandra, Prem et al. Microbial lipases and their industrial applications: a comprehensive review. **Microbial Cell Factories**, v. 19, n. 1, p. 169, 2020.

Chater, Keith F. *Streptomyces* inside-out: a new perspective on the bacteria that provide us with antibiotics. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 361, n. 1469, p. 761-768, 2006.

Chen, Jianing et al. Natural products from actinomycetes associated with marine organisms. **Marine Drugs**, v. 19, n. 11, p. 629, 2021.

Chen, Qian et al. Microbial lipases in cheese production: an in-depth review of their role in quality, texture, and flavor. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, p. 1-18, 2025.

Chevrette, Marc G. et al. Evolutionary dynamics of natural product biosynthesis in bacteria. **Natural Product Reports**, v. 37, n. 4, p. 566-599, 2020.

Couri, S., & Farias, A. X. Genetic manipulation of *Aspergillus niger* for increased synthesis of pectinolytic enzymes. **Revista de Microbiologia**, p. 314-7, 1995.

De Souza Moreira, Leonora Rios; Sciuto, Débora Lo; Ferreira Filho, Edivaldo Ximenes. An overview of cellulose-degrading enzymes and their applications in textile industry. **New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering**, p. 165-175, 2016.

Del Sol, Ricardo et al. Characterization of changes to the cell surface during the life cycle of *Streptomyces coelicolor*: atomic force microscopy of living cells. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 6, p. 2219-2225, 2007.

Digital atlas of actinomycetes 2. Site. Disponível em: <https://atlas.actino.jp/>. Acesso em: 11 nov. 2025.

Doroghazi, James R.; Metcalf, William W. Comparative genomics of actinomycetes with a focus on natural product biosynthetic genes. **BMC genomics**, v. 14, n. 1, p. 611, 2013.

Ejaz, Uroosa; Sohail, Muhammad; Ghanemi, Abdelaziz. Cellulases: from bioactivity to a variety of industrial applications. **Biomimetics**, v. 6, n. 3, p. 44, 2021.

Eş, Ismail; Vieira, José Daniel Gonçalves; Amaral, André Corrêa. Principles, techniques, and applications of biocatalyst immobilization for industrial application. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 5, p. 2065-2082, 2015.

Evangelista-Martínez, Zahaed et al. Antibacterial activity of *Streptomyces* sp. Y15 against pathogenic bacteria and evaluation of culture media for antibiotic production. **TIP Revista Especializada em Ciências Químico-Biológicas**, v. 25, n. 1, p. 1-12, 2023.

Ezeobiora, Chijioko E. et al. Uncovering the biodiversity and biosynthetic potentials of rare actinomycetes. **Future Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 8, n. 1, p. 1-19, 2022.

Fang, Zhen et al. Keratinolytic protease: a green biocatalyst for leather industry. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, n. 21, p. 7771-7779, 2017.

Fernandez, R.; Ramachandran, R.; Nallakumar, K. Screening and characterization of protease producing marine actinobacteria *Streptomyces pactum* RA71 isolated from Pulicat Lake, Chennai, Tamil Nadu, India. **Asian Journal of Microbiology, Biotechnology, and Environmental Sciences**, v. 20, p. 618-625, 2018.

Fernández-Fernández, Álvaro Daniel; Stael, Simon; Van Breusegem, Frank. Mechanisms controlling plant proteases and their substrates. **Cell Death & Differentiation**, v. 30, n. 4, p. 1047-1058, 2023.

Gajdács, M.; Urbán, E. The Pathogenic Role of Actinomyces spp. and Related Organisms in Genitourinary Infections: Discoveries in the New, Modern Diagnostic Era. **Antibiotics (Basel)**, v. 9, n. 8, p. 524, 2020.

Ghai, R. et al. Metagenomics uncovers a new group of low GC and ultra-small marine Actinobacteria. **Scientific Reports**, v. 3, n. 2471, 2013.

Gibb, Gregory D.; Ordaz, Donald E.; Strohl, William R. Overproduction of extracellular protease activity by *Streptomyces* C5-A13 in fed-batch fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 31, n. 2, p. 119-124, 1989.

Goldbeter, Albert. Oscillatory enzyme reactions and Michaelis–Menten kinetics. **FEBS letters**, v. 587, n. 17, p. 2778-2784, 2013.

Gomaa, A. Application of enzymes in Brewing. **Journal of Nutrition and Food Science Forecast**, v. 1, n. 5, 2018.

Gonçalves, A. A. **Tecnologia do Pescado: Ciência, Tecnologia, Inovação e Legislação**. São Paulo: Editora Atheneu, 2011.

Goodfellow, M. et al. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 5 – The Actinobacteria**. Springer, 2012.

Grand View Research. Enzymes Market Size, Share & Trends Analysis Report. 2024. Disponível em: <https://www.grandviewresearch.com/>. Acesso em: 25 nov. 2025.

Greenfield, E. A. Protein quantitation. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2018, n. 6, p.480-483, 2018.

Grigorev, I. P.; Korzhevskii, D. E. Current technologies for fixation of biological material for immunohistochemical analysis. **Современные технологии в медицине**, v. 10, n. 2 (eng), p. 156-164, 2018.

Guerra, N. P. et al. Use of amylolytic enzymes in brewing. In: Beer in health and disease prevention. **Academic Press**, 2009. p. 113-126.

Hasan, Fariha; Shah, Aamer Ali; Hameed, Abdul. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial technology**, v. 39, n. 2, p. 235-251, 2006.

Harz, C. O. *Actinomyces bovis, ein neuer Schimmel in den Geweben des Rindes*. **Deutsche Zeitschrift für Tiermedizin**, 1877-1878; vol. 5: 125–140.

Hazarika, Shabiha Nudrat; THAKUR, Debajit. Actinobacteria. In: Beneficial microbes in agro-ecology. **Academic Press**, 2020. p. 443-476.

Hankin, L.; Anagnostakis, S. L. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. **Mycologia**, v. 67, n. 3, p. 597-607, 1975.

Horii, Shumpei et al. Mycelial differentiation linked avermectin production in *Streptomyces avermitilis* studied with Raman imaging. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 107, n. 1, p. 369-378, 2023.

Hunt, Alison C. et al. **The bldC developmental locus of *Streptomyces coelicolor* encodes a member of a family of small DNA-binding proteins related to the DNA-binding domains of the MerR family**. *Journal of Bacteriology*, v. 187, n. 2, p. 716-728, 2005.

IEA – **International Energy Agency. World Energy Outlook 2022**. Paris: IEA Publications, 2022.

Imran, Muhammad et al. Role of enzymes in animal nutrition: a review. **PSM Veterinary Research**, v. 1, n. 2, p. 38-45, 2016.

IPCC. **Climate Change and Land: an IPCC Special Report on climate change, desertification, land degradation, sustainable land management, food security, and**

greenhouse gas fluxes in terrestrial ecosystems. Geneva: Intergovernmental Panel on Climate Change, 2019.

Isabela Avila-Rodríguez, María et al. Practical context of enzymatic treatment for wound healing: A secreted protease approach. **Biomedical Reports**, v. 13, n. 1, p. 3-14, 2020.

James, Greeshma et al. Applications of Actinobacteria in aquaculture: prospects and challenges. **3 Biotech**, v. 13, n. 2, p. 42, 2023.

Jami, Mansooreh et al. Phylogenetic diversity and biological activity of culturable Actinobacteria isolated from freshwater fish gut microbiota. **Microbiological Research**, v. 175, p. 6-15, 2015.

Javahery, Susan; Noori, Ahmad; Hoseinifar, Seyed Hossein. Growth performance, immune response, and digestive enzyme activity in Pacific white shrimp, *Penaeus vannamei* Boone, 1931, fed dietary microbial lysozyme. **Fish & shellfish immunology**, v. 92, p. 528-535, 2019.

Jensen, Paul R.; Moore, Bradley S.; Fenical, William. The marine actinomycete genus *Salinispora*: a model organism for secondary metabolite discovery. **Natural Product Reports**, v. 32, n. 5, p. 738-751, 2015.

Jones, Kenneth L. Fresh isolates of actinomycetes in which the presence of sporogenous aerial mycelia is a fluctuating characteristic. **Journal of Bacteriology**, v. 57, n. 2, p. 141-145, 1949.

Jose, Polpass Arul; Maharshi, Anjisha; Jha, Bhavanath. Actinobacteria in natural products research: Progress and prospects. **Microbiological Research**, v. 246, p. 126708, 2021.

Kasar, Sainath S.; Maheshwari, Vijay L.; Pawar, Pankaj K. Bioactive α -amylase inhibitors: Sources, mechanism of action, biochemical characterization, and applications. **Natural Products as Enzyme Inhibitors: An Industrial Perspective**, p. 59-104, 2022.

Kern, Martha E.; Blevins, Kathleen S. **Micologia médica: texto e atlas. 2. ed.** Porto Alegre: Artmed, 1999.

Korsa, Gamachis et al. Microbial cellulase production and its potential application for textile industries. **Annals of Microbiology**, v. 73, n. 1, p. 13, 2023.

Koshland, D. E.; Némethy, G.; Filmer, D. Comparison of experimental binding data and theoretical models in proteins containing subunits. **Biochemistry**, v. 5, n. 1, p. 365-386, 1966.

Kraut, D. A.; Carroll, K. S.; Herschlag, D. **The role of enzymes in transition state stabilization.** In: Schowen, R. L. (Ed.). *Enzymatic Transition State Stabilization*. Wiley, 2007. p. 1-42.

Kuhad, Ramesh Chander; Gupta, Rishi; Singh, Ajay. Microbial cellulases and their industrial applications. **Enzyme Research**, v. 2011, n. 1, p. 280696, 2011.

Kurtböke, D. İ. Ecology and habitat distribution of actinobacteria. **Biology and Biotechnology of Actinobacteria**, p. 123-149, 2017.

Kusuma, Ali B.; Nouioui, Imen; Goodfellow, Michael. Genome-based classification of the *Streptomyces violaceusniger* clade and description of *Streptomyces sabulosicollis* sp. nov. from an Indonesian sand dune. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 114, n. 6, p. 859-873, 2021.

Kuyukina, Maria S.; Ivshina, Irena B. Application of *Rhodococcus* in bioremediation of contaminated environments. In: **Biology of Rhodococcus**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2010. p. 231-262.

Küster, E.; Williams, S. T. *Selection of media for isolation of streptomycetes*. In: **Society for Applied Bacteriology. Journal of Applied Bacteriology**, v. 31, p. 13–27, 1968.

Le, My Hanh; Wang, Daryi. Structure and membership of gut microbial communities in multiple fish cryptic species under potential migratory effects. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 7547, 2020.

Lewin, Gina R. et al. Evolution and ecology of Actinobacteria and their bioenergy applications. **Annual Review of Microbiology**, v. 70, n. 1, p. 235-254, 2016.

Lewis, Theodore; Stone, William L. **Biochemistry, Proteins, Enzymes**. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2023. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554481>. Acesso em: 04 de novembro de 2025.

Li, Erchao et al. Gut microbiota and its modulation for healthy farming of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Reviews in Fisheries Science & Aquaculture**, v. 26, n. 3, p. 381-399, 2018.

Li, Qinyuan et al. Morphological identification of actinobacteria. **Actinobacteria-basics and biotechnological applications**, p. 59-86, 2016.

Lu, Chun-Yan et al. *Salinibacterium sedimenticola* sp. nov., isolated from tidal flat sediment. **Current Microbiology**, v. 80, n. 5, p. 142, 2023.

Madigan, Michael T. et al. **Microbiologia de Brock. 15. ed.** Porto Alegre: Artmed, 2018.

Maldonado, Luis A. et al. *Salinispora arenicola* gen. nov., sp. nov. and *Salinispora tropica* sp. nov., obligate marine actinomycetes belonging to the family Micromonosporaceae. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, n. 5, p. 1759-1766, 2005.

Manage, Pathmalal M. Heavy use of antibiotics in aquaculture: Emerging human and animal health problems—A review. **Sri Lanka Journal of Aquatic Sciences**, v. 23, n. 1, 2018.

Manivasagan, Panchanathan et al. Marine actinobacteria: an important source of bioactive natural products. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 38, n. 1, p. 172-188, 2014.

Market US. **Global Enzymes Replacement Therapy Market Size Analysis Report. 2025.** Disponível em: <https://www.market.us/>. Acesso em: 25 nov. 2025.

Martin, M. F.; Okpo, E. A.; Andy, I. E. Production of amylase by the intestinal microflora of cultured freshwater fishes (*Oreochromis niloticus* and *Clarias gariepinus*) reared locally in Calabar, south Nigeria. **World News of Natural Sciences**, n. 23, p. 13-23, 2019.

Matos Neto, João Moreira de. **Bioprospecção de enzimas de interesse biotecnológico a partir de actinobactérias isoladas do semiárido nordestino**. 2022.

Mazón-Suástegui, José Manuel et al. Growth, survival, and modulation of the intestinal microbiota of shrimp *Penaeus vannamei* fed with probiotic actinomycetes and highly diluted bioactive compounds. **Latin american journal of aquatic research**, v. 53, n. 2, p. 242-254, 2025.

Melani, Natália B.; Tambourgi, Elias B.; Silveira, Edgar. Lipases: from production to applications. **Separation & Purification Reviews**, v. 49, n. 2, p. 143-158, 2020.

MESQUITA, Ariel de Figueiredo Nogueira. **Isolamento e caracterização de actinobactérias do intestino de camarões (*Penaeus vannamei*) cultivados com potencial antimicrobiano contra bactérias patogênicas**. 2025.

Miller, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

Mohammadipanah, Fatemeh; Dehghani, Mona. Classification and taxonomy of Actinobacteria. In: **Biology and biotechnology of Actinobacteria**. Cham: Springer International Publishing, 2017. p. 51-77.

Mondal, Subhadeep et al. Microbial Amylase: Old but still at the forefront of all major industrial enzymes. **Biocatalysis and agricultural biotechnology**, v. 45, p. 102509, 2022.

Monod, J.; Wyman, J.; Changeux, J. P. On the nature of allosteric transitions: a plausible model. **Journal of Molecular Biology**, v. 12, n. 1, p. 88-118, 1965.

Monteiro, Rodolpho RC et al. Biocatalytic production of biolubricants: Strategies, problems and future trends. **Biotechnology Advances**, v. 68, p. 108215, 2023.

Mordor Intelligence. **Industrial Enzymes Market Size (2023-2028)**. 2023. Disponível em: <https://www.mordorintelligence.com/>. Acesso em: 25 nov. 2025.

Mouri, Yoshihiro et al. Regulation of sporangium formation by BldD in the rare actinomycete *Actinoplanes missouriensis*. **Journal of Bacteriology**, v. 199, n. 12, p. 10.1128/jb.00840-16, 2017.

Narsing Rao, Manik Prabhu; Li, Wen-Jun. Diversity of actinobacteria in various habitats. In: *Actinobacteria: Microbiology to Synthetic Biology*. Singapore: Springer Nature Singapore, 2022. p. 37-58.

Naveed, Sehrish; Zahid, Bilal. Optimizing denim washing with cellulase enzymes eco-friendly method to reduce pumice consumption. **Pigment & Resin Technology**, 2025.

Nicosia, Fabrizio Domenico et al. Plant milk-clotting enzymes for cheesemaking. **Foods**, v. 11, n. 6, p. 871, 2022.

- Nishina, Hironobu et al. Karnovsky's fixative prevents artifacts appearing as vacuolation derived from tissue processing in kidneys treated with antisense oligonucleotide. **Journal of Toxicologic Pathology**, v. 34, n. 4, p. 367-371, 2021.
- Nouioui, Imen et al. Genome-based taxonomic classification of the phylum Actinobacteria. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 355158, 2018.
- Olano, Carlos; Rodríguez, Miriam. Actinomycetes associated with arthropods as a source of new bioactive compounds. **Current Issues in Molecular Biology**, v. 46, n. 5, p. 3822-3838, 2024.
- Oliveira, J. P. et al. Use of *Calotropis procera* cysteine peptidases (CpCPs) immobilized on glyoxyl-agarose for cheesemaking. **Food Chemistry**, v. 403, p. 134319, 2023.
- Pandey, Ashok et al. Advances in microbial amylases. **Biotechnology and applied biochemistry**, v. 31, n. 2, p. 135-152, 2000.
- Parés Viader, Raimon et al. Optimization of beer brewing by monitoring α -amylase and β -amylase activities during mashing. **Beverages**, v. 7, n. 1, p. 13, 2021.
- Pauling, L. Molecular architecture and biological reactions. **Chemical & Engineering News**, v. 24, n. 10, p. 1375-1377, 1946.
- Phukon, Loreni Chiring et al. Production and characterisation of lipase for application in detergent industry from a novel *Pseudomonas helmanticensis* HS6. **Bioresource Technology**, v. 309, p. 123352, 2020.
- Ramesh, Subramani; Mathivanan, Narayanasamy. Screening of marine actinomycetes isolated from the Bay of Bengal, India for antimicrobial activity and industrial enzymes. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, n. 12, p. 2103-2111, 2009.
- Rai, Nandini et al. Symbiotic strategies: deciphering the role of gut microbiota in the nutrition and metabolism of fish and shellfish. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 15, p. 1639426, 2025.
- Rathore, Dalip Singh; Sheikh, Mahejbin; Singh, Satya P. Marine Actinobacteria: New horizons in bioremediation. In: **Recent developments in microbial technologies**. Singapore: Springer Nature Singapore, 2020. p. 425-449.
- Remonatto, Daniela et al. Applications of immobilized lipases in enzymatic reactors: A review. **Process Biochemistry**, v. 114, p. 1-20, 2022.
- Rossi, Nicola; Grosso, Clara; Delerue-Matos, Cristina. Shrimp waste upcycling: unveiling the potential of polysaccharides, proteins, carotenoids, and fatty acids with emphasis on extraction techniques and bioactive properties. **Marine Drugs**, v. 22, n. 4, p. 153, 2024.
- Roy, Jetendra K.; Mukherjee, Ashis K. Applications of a high maltose forming, thermo-stable α -amylase from an extremely alkalophilic *Bacillus licheniformis* strain AS08E in food and laundry detergent industries. **Biochemical Engineering Journal**, v. 77, p. 220-230, 2013.

Rozanov, A. S. et al. Production of subtilisin proteases in bacteria and yeast. **Vavilov Journal of Genetics and Breeding**, v. 25, n. 1, p. 125, 2021.

Salwan, Richa; Sharma, Vivek. The role of actinobacteria in the production of industrial enzymes. In: **New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering**. Elsevier, 2018. p. 165-177.

Selvam, K.; Vishnupriya, B.; Bose, V. Subhash Chandra. Screening and quantification of marine actinomycetes producing industrial enzymes amylase, cellulase and lipase from south coast of India. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, v. 2, p. 1481-1487, 2011.

Septianingrum, Wildanna Rohma et al. Optimization of Protease Activity by *Bacillus haynesii* BK1H Using Response Surface Methodology. In: E3S Web of Conferences. **EDP Sciences**, 2024. p. 05002.

Shaik, Mobeen et al. Isolation and characterization of bioactive metabolites producing marine *Streptomyces parvulus* strain sankarensis-A10. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 15, n. 1, p. 87-94, 2017.

Sheldon, R. A.; Woodley, J. M. Role of biocatalysis in sustainable chemistry. **Chemical Reviews**, v. 118, n. 2, p. 801-838, 2018.

Shirling, Eb T.; Gottlieb, D. Methods for characterization of *Streptomyces* species. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 16, n. 3, p. 313-340, 1966.

Stackebrandt, E.; Rainey, F. A.; Ward-Rainey, N. L. Proposal for a new hierarchic classification system, Actinobacteria classis nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 47, n. 2, p. 479-491, 1997.

Subramani, Ramesh; Aalbersberg, William. Marine actinomycetes: an ongoing source of novel bioactive metabolites. **Microbiological Research**, v. 167, n. 10, p. 571-580, 2012.

Subramani, Ramesh; Sipkema, Detmer. Marine rare actinomycetes: a promising source of structurally diverse and unique novel natural products. **Marine Drugs**, v. 17, n. 5, p. 249, 2019.

Sun, Yang et al. Application of cofactors in the regulation of microbial metabolism: a state of the art review. **Frontiers in Microbiology**, v. 14, p. 1145784, 2023.

Swarna, Dhavala; Gnanadoss, J. Joel. Screening and molecular characterization of actinomycetes from mangrove soil producing industrially important enzymes. **Journal of Scientometric Research**, v. 64, n. 2, p. 87-95, 2020.

Tavano, Olga Luisa et al. Biotechnological applications of proteases in food technology. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 17, n. 2, p. 412-436, 2018.

Topatan, Zeynep Şule; Hatice, K. A. T. I. Screening of actinomycetes from *Cystoseira barbata* (Stackhouse) C. Agardh compost for their enzyme and antibacterial activities. **Trakya University Journal of Natural Sciences**, 2022.

Tzuc, Jaqueline Tuyub et al. Microbiota from *Litopenaeus vannamei*: digestive tract microbial community of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **SpringerPlus**, v. 3, n. 1, p. 280, 2014.

UNFCCC. COP29 UN **Climate Conference Agrees to Triple Finance to Developing Countries, Protecting Lives and Livelihoods**. Bonn: UNFCCC, 2024. Disponível em: <https://unfccc.int/news/cop29-un-climate-conference-agrees-to-triple-finance-to-developing-countries-protecting-lives-and-livelihoods>. Acesso em: 26 nov. 2025.

Velázquez-de Lucio, Brianda Susana et al. Exogenous enzymes as zootechnical additives in animal feed: a review. **Catalysts**, v. 11, n. 7, p. 851, 2021.

Van der Heul, Helga U. et al. Regulation of antibiotic production in Actinobacteria: new perspectives from the post-genomic era. **Natural Product Reports**, v. 35, n. 6, p. 575-604, 2018.

Verma, Mansi et al. Phylogenetic analyses of phylum Actinobacteria based on whole genome sequences. **Research in Microbiology**, v. 164, n. 7, p. 718-728, 2013.

Vojvonic, Sandra et al. Bacillus and Streptomyces spp. as hosts for production of industrially relevant enzymes. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 108, n. 1, p. 185, 2024.

Waksman, Selman A.; Woodruff, H. Boyd. The soil as a source of microorganisms antagonistic to disease-producing bacteria. **Journal of Bacteriology**, v. 40, n. 4, p. 581-600, 1940.

Weeraphan, Trinset et al. Microbiome profiling and Actinomycetes isolation from tropical marine sponges. **AIMS Microbiology**, v. 11, n. 1, p. 182, 2025.

Whitehurst, Robert J.; Van Oort, Maarten (Ed.). **Enzymes in food technology**. Singapore: Wiley-Blackwell, 2010.

WOLFENDEN, Richard. Transition state analogues for enzyme catalysis. **Nature**, v. 223, n. 5207, 1969.

Wolfenden, Richard; Snider, Mark J. The depth of chemical time and the power of enzymes as catalysts. **Accounts of Chemical Research**, v. 34, n. 12, p. 938-945, 2001.

Xie, Feiyang; Pathom-Aree, Wasu. Actinobacteria from desert: diversity and biotechnological applications. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 765531, 2021.

Yang, Desirée C.; Blair, Kris M.; Salama, Nina R. Staying in shape: the impact of cell shape on bacterial survival in diverse environments. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 80, n. 1, p. 187-203, 2016.

Yepes-García, Jeferyd et al. Morphological differentiation of *Streptomyces clavuligerus* exposed to diverse environmental conditions and its relationship with clavulanic acid biosynthesis. **Processes**, v. 8, n. 9, p. 1038, 2020.

Zhang, Meiling et al. Characterization of the intestinal microbiota in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, fed diets with different lipid sources. **Aquaculture**, v. 434, p. 449-455, 2014.

Zhang, Qiaoge; Han, Ye; Xiao, Huazhi. Microbial α -amylase: a biomolecular overview. **Process Biochemistry**, v. 53, p. 88-101, 2017.

Zhang, Y.-H. Percival; Himmel, Michael E.; Mielenz, Jonathan R. Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies. **Biotechnology Advances**, v. 24, n. 5, p. 452-481, 2006.

Zhou, Zijie et al. Segmental variations in intestinal microbiota composition and functional capacity along the digestive tract of *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture Reports**, v. 34, p. 101922, 2024.