



CLARIANE ARRUDA GONÇALVES

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ENZIMÁTICO DE
DIFERENTES CEPAS DE *Bacillus subtilis* GRUPO**

LAVRAS – MG

2022

CLARIANE ARRUDA GONÇALVES

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ENZIMÁTICO DE
DIFERENTES CEPAS DE *Bacillus subtilis* GRUPO**

Monografia apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Ciências Biológicas, para a obtenção do título de Bacharel.

Prof(a). Dr(a). Cristina Ferreira Silva e Batista

Orientadora

Me^a Clara Resende de Souza Castro

Coorientadora

LAVRAS – MG

2022

CLARIANE ARRUDA GONÇALVES

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ENZIMÁTICO DE
DIFERENTES CEPAS DE *Bacillus subtilis* GRUPO**

Monografia apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Graduação em Ciências Biológicas, para a obtenção do título de Bacharel.

APROVADA em 15 de setembro de 2022.

Dr^a Cristina Ferreira Silva e Batista

Dr^a Luciana Silva Ribeiro Martins

Me^a Clara Resende de Souza Castro

Me^a Tainá de Sousa Cearense

Prof(a). Dr(a). Cristina Ferreira Silva e Batista

Orientadora

Me^a Clara Resende de Souza Castro

Coorientadora

LAVRAS – MG

2022

DEDICATÓRIA

À alma da minha tia Geliany Gonçalves de Arruda Rangel,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me permitir a realização do curso e a São José Maria Escrivá que através da sua vida e obra, me fizeram ver o trabalho como um meio para adquirir virtudes.

Aos meus pais que sempre foram incentivadores da minha formação e por toda compreensão.

Ao meu marido, pelos momentos de acolhida e de carinho, me ajudando a ver as coisas por uma nova perspectiva.

A minha orientadora Cristina, por ter me concedido a oportunidade de aprendizado e a sua confiança.

A Clara que me coorientou durante os estágios e neste projeto, me ensinando o caminho das pedras da pesquisa,

A Lu, por ter nos sanando muitas dúvidas,

Aos membros do Nemaí, em especial a Nayara e a Tainá que tornaram possíveis esse trabalho.

A todos os funcionários da UFLA,

Ao CNPQ pelo concedimento da bolsa,

OBRIGADA!

“Que a tua vida não seja uma vida estéril. - Sê útil. - Deixa rasto.”

- São José Maria Escrivá

RESUMO

Enzimas microbianas são atualmente utilizadas em larga escala e as bactérias são preferencialmente utilizadas devido ao seu menor tempo de replicação e facilidade de manipulação genética. Uma das principais espécies utilizadas mundialmente na produção enzimática é *Bacillus subtilis*, que tem se destacado em diversas áreas. Diante disso, este trabalho teve como objetivo selecionar diferentes cepas de *Bacillus subtilis* para produção de enzimas de interesse industrial, tais como: celulase, xilanase, amilase, lacase e manganês peroxidase. Foram utilizadas 10 cepas de *Bacillus subtilis* (CCMA: 0081, 0051, 0054, 0087, 0136, 0401, 0658, 1228, 1287 e 1340) pertencentes à Coleção de Cultura de Microbiologia Agrícola (CCMA). Os inóculos foram padronizados de acordo com a escala de McFarland e o cultivo foi realizado pelo método de microgota, em meio Ágar Nutriente, acrescido dos seguintes marcadores enzimáticos (0,1%): guaiacol (lacase), xilana (xilanase), carboximetilcelulose (celulase) e amido (amilase) e dois tratamentos foram utilizados: com e sem adição de glicose (0,1%) ao meio. Este teste semiquantitativo demonstrou CCMA 0658 obteve os melhores resultados para índices enzimáticos. A fermentação submersa foi realizada para essa cepa, à 35°C por 24h em erlenmeyers com 10 ml de inóculo e 90ml de caldo nutriente, acrescido dos respectivos indutores (0,1%) com e sem glicose (0,1%) e foram mantidos sob agitação à 120 rpm. para obtenção dos extratos brutos enzimáticos, nos intervalos de tempo T0 (0 h), T1 (12 h), T2 (36 h), T3 (60 h), T4 (84 h), foram retiradas alíquotas de 1 mL referentes a cada amostra, centrifugadas a 10.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi retirado para determinação das atividades enzimáticas em espectrofotômetro com leitor de microplacas ELISA. As reações para leitura, seguiram metodologia específica para cada enzima. Os experimentos foram realizados em triplicata. Todas as enzimas apresentaram atividade, se destacando, no entanto, celulase e manganês peroxidase. Celulase apresentou seu pico de atividade no fator sem glicose as 36h com 0,4271 U/L e com glicose as 12h com 0,2583 U/L Já manganês peroxidase sem glicose a atividade máxima ocorreu às 84 h com 19,35 U/L. No fator com glicose o único tempo que apresentou atividade enzimática foi as 36h com 4,44 U/L. Possivelmente valores baixos das demais enzimas traduzem-se uma baixa concentração dos indutores utilizados. Dessa forma entende-se que seja necessário realizar tais análises com concentrações maiores como por exemplo a 1%.

Palavras-chave: *Bacillus subtilis*. Produção enzimática. Enzimas lignocelulíticas

ABSTRACT

Microbial enzymes are currently used on a large scale and as bacteria they are preferentially used due to their shorter replication time and ease of genetic manipulation. One of the main ones used worldwide in enzymatic production is *Bacillus subtilis*, which has stood out in several areas. Therefore, this work aimed to select different strains of *Bacillus* for the production of enzymes of industrial interest, such as: cellulase, xylanase, amylase, laccase and manganese peroxidase. Ten strains of *Bacillus subtilis* (CCMA: 0081, 0051, 0054, 0087, 0136, 0401, 0658, 1228, 1287 and 1340) belonging to the Agricultural Microbiology Culture Collection (CCMA) were used. Inoculums were changed according to the McFarland scale and the enzyme marker nutrition method (0.1%).) and amidoam (ilase) and two treatments were used: with and without addition of glucose (0.1%) to the medium. This semi-quantitative CC 065 enzymatic test obtained the best results indices for results. Submerged fermentation was carried out for this strain at 35°C for 24h in erlenmeyers with 10 ml of inoculum and 90 ml of nutrient broth, plus the respective inducers (0.1%) with and without glucose (0.1%) and were solution at 120 rpm to remove the crude enzymatic extracts, at time intervals T0 (0 h), T1 (12 h), T2 (36 h), T3 (60 h) T4 (84 h), aliquots of 1 mL references were taken centrifuged at 10,000 rpm for 5 minutes for each sample. The supernatant was removed for determination of enzymatic activities in a spectrophotometer with an ELISA microplate reader. As reactions for reading, they followed specific methodology for each enzyme. The experiments were performed in triplicate. All enzymes show activity, however, cellulase and manganese peroxidase stand out. glucose, the only time that showed enzymatic activity was at 36h with 4.44 U/L. Possibly low values of the other enzymes translate into a low concentration of the used inducers. Thus, it is understood that it is necessary to carry out such examples with 1%, which can be important.

Keywords: *Bacillus subtilis*. Glucose. Enzyme production. Quantification.

SUMÁRIO

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. Introdução | 9 |
| 2. Referencial teórico | 10 |
| 2.1. Enzimas de origem microbiana | 10 |
| 2.2. Amilase (E.C. 3.2.1.1) | 10 |
| 2.3. Celulase (EC 3.2.1.4) | 12 |
| 2.4. Lacase (E.C. 1.10.3.2) | 14 |
| 2.5. Manganês Peroxidase (E.C 1.11.1.13) | 15 |
| 2.6. Xilanase (E.C. 3.2.1.8) | 16 |
| 2.7. Métodos de produção de enzimas microbianas | 17 |
| 2.8. <i>Bacillus subtilis</i> | 18 |
| 2.9. Produção de enzimas por <i>Bacillus subtilis</i> | 19 |
| 3. Metodologia | 20 |
| 3.1.Reativação dos microrganismos e condições de cultivo | 20 |
| 3.2.Teste semiquantitativo para seleção do melhor microrganismo produtor de enzimas | 20 |
| 3.3.Quantificação enzimática para CCMA 0658..... | 21 |
| 3.4.Determinação da atividade enzimática | 22 |
| 3.4.1. Amilase | 22 |
| 3.4.2. Carboximetilcelulase | 22 |
| 3.4.3. Manganês peroxidase | 23 |
| 3.4.4. Xilanase | 24 |
| 3.5.Análises estatísticas | 24 |
| 4. Resultados | 25 |
| 4.1.Pré-teste para seleção dos microrganismos produtores de enzimas | 25 |
| 4.2. Determinação das atividades enzimáticas após fermentação submersa..... | 35 |
| 5. Conclusão | 39 |
| 6. Bibliografia | 40 |

1. INTRODUÇÃO

Enzimas são proteínas muito utilizadas na indústria, devido a sua alta especificidade com o substrato bem como a sua capacidade de acelerar reações, sendo os microrganismos preferencialmente utilizados para obtê-las (RIBEIRO et al., 2018). Elas podem ser obtidas de vegetais, vegetais e de fonte microbiana (MONTEIRO, 2009).

As enzimas microbianas têm sido vastamente utilizadas na indústria, como na produção de papel, indústria alimentícia, têxtil, em produtos como detergentes dentre outros. Os microrganismos são uma boa fonte de enzimas, pois possuem uma grande produção extracelular. Os principais produtores são bactérias e fungos, dentre os quais as bactérias são representadas principalmente por: *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* e várias espécies de *Streptomyces*. Já os fungos são frequentemente representados por: *Aspergillus*, *Mucor* e *Rhizopus* (SANCHES & DEMAIN, 2017).

Bacillus sp. se destaca na produção enzimática devido ao seu fácil cultivo, por ser suscetível a transformações genéticas e a sua grande distribuição. Esse gênero, apesar de ser bem conhecido e pesquisado, continua apresentando novas aplicações industriais e servindo como alicerce para o surgimento de novas biotecnologias (DANILOVA & SHARIPOVA, 2020; MIENDA et al, 2014; CUI et al, 2014, SHATEAVA et al 1973). Esses organismos apresentam uma distribuição por diferentes nichos com uma ampla aplicabilidade para controle biológico (DE MELO et al., 2021; ROMEIRO, 2007).

Bacillus subtilis é usada em escala mundial na produção de enzimas, é uma bactéria não patogênica, gram-positiva, com o status GRAS (Generally Recognized As Safe) pelo FDA (Food and Drug Administration) - EUA, (ALVES et al., 2018). É a espécie mais estudada do gênero *Bacillus sp.*, a princípio devido a sua propensão natural de captar DNA extracelular o que facilita modificações genética e a sua esporulação. Ela pode ser usada em diversas aplicações dentre as quais produções de enzimas, fermentação de alimentos e controle biológico para plantas (KOVÁCS, 2019).

Enzimas como amilases, celulasas, lacases, xilanases e manganês peroxidases apresentam uma enorme aplicabilidade na indústria. Diante disso, este trabalho teve como objetivo selecionar diferentes cepas de *Bacillus subtilis* para produção dessas enzimas, através de teste semiquantitativo e quantificar a produção das mesmas, para o melhor organismo produtor.

1. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Enzimas de origem microbiana

As enzimas podem ter diferentes origens: animal, vegetal e microbiana, sendo a última a obtenção mais vantajosa, devido a sua velocidade de crescimento, facilitando a alta produção enzimática e um curto espaço de tempo (CERQUEIRA, 2022; DE SOUZA, 2019).

A extração de enzimas por microrganismos não sofre influência por fatores sazonais, pode ser obtida por resíduos agroindustriais – sendo uma fonte barata de carbono - o rendimento pode ser elevado utilizando de otimizações nos processos fermentativos, através de mutações dos microrganismos, uso da tecnologia de DNA recombinante, temperatura e pH e tamanho do inóculo por exemplo (MUNHOZ, 2020; VILELA, 2015; BARBOSA et al, 2014). Essa extração, corre de duas formas principais: fermentação do estado sólido e fermentação submersa (OLIVEIRA et al, 2013).

Essas proteínas de origem microbiana apresentam características particulares para seu emprego em biotecnologias, em especial as conversões enzimáticas na indústria. Entretanto o seu uso ainda é considerado economicamente dispendioso, sendo necessário a obtenção de organismos que apresentem melhores potenciais de produção enzimática (MARTINS et al., 2014).

Elas são consideradas biocatalizadores e apresentam uma melhor performance quando comparado aos catalizadores químicos. Para sua produção são utilizados dois tipos de fermentação a submersa e a de estado sólido. (CARVALHO et al., 2020).

2.1.1 Amilase (E.C. 3.2.1.1)

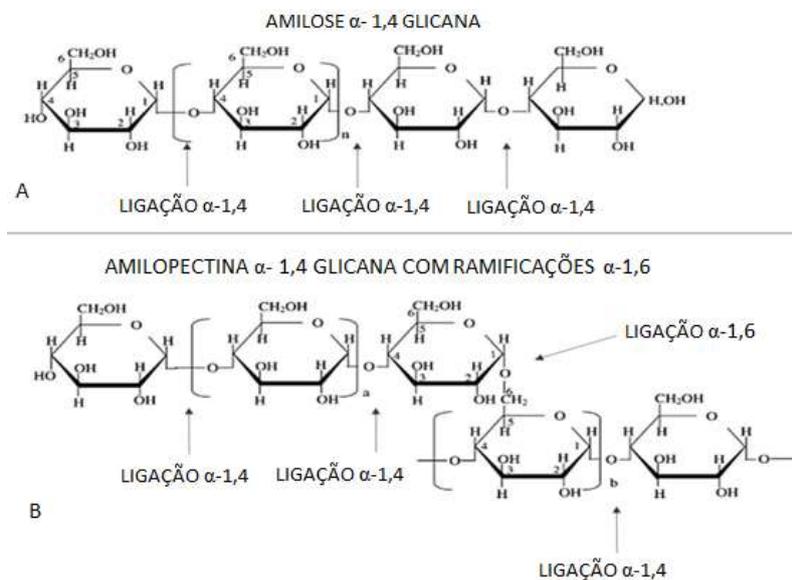
As amilases são enzimas que catalisam a hidrólise (quebra por adição de água) do amido. O amido é um polissacarídeo, presente em grande quantidade na natureza. Nas plantas ele que desenvolve o papel de reserva energética, se encontrado na forma de glicogênio. Ele é encontrado em batatas trigo, mandioca, cereais e farinhas (CARVALHO, 2020).

O amido como demonstrado na Figura 1, é um polímero semicristalino, constituído por dois polissacarídeos a amilose e a amilopectina. A amilose é uma cadeia principalmente linear, consistida normalmente em até 3000 moléculas de glicose interligadas por ligações glicosídicas 1,4 e é relatado para conter algumas redes ramificadas. A amilopectina já é um polímero

ramificado com ligações 1,4 que servem como pontes 1,6 nos pontos de ramificações (BENINCA et al, 2013).

As amilases podem ser divididas em dois grupos endoamilases e as exoamilases. As endoamilases catalizam a hidrólise do amido de forma aleatória, resultando em oligossacarídeos lineares e ramificados de vários comprimentos. As exoamilases catalizam pela extremidade não redutora resultando em produtos finais curtos (GUPTA, 2003).

Figura 1: Representação da constituição do amido. Amilose (A) Amilopectina (B).



Fonte: Silva Neto (2020).

As formas mais usadas para engomar o algodão na indústria têxtil são através do amido. Ele pode ser removido por amilases bacterianas, ou com processo químico combinado com um detergente alcalino e um produto de oxidação. Esse processo com a enzima vem sendo aplicado desde 1912. (PETERS, 1963; CAVACO- PAULO, 1968; MARROQUES et al, 2020).

As amilases provenientes de fungos e bactérias, também vêm sendo amplamente utilizadas na indústria da panificação, são uma alternativa natural ao uso de emulsificantes sintéticos e ajudam a manter as características de frescor do produto por mais tempo (VENANCIO, 2022).

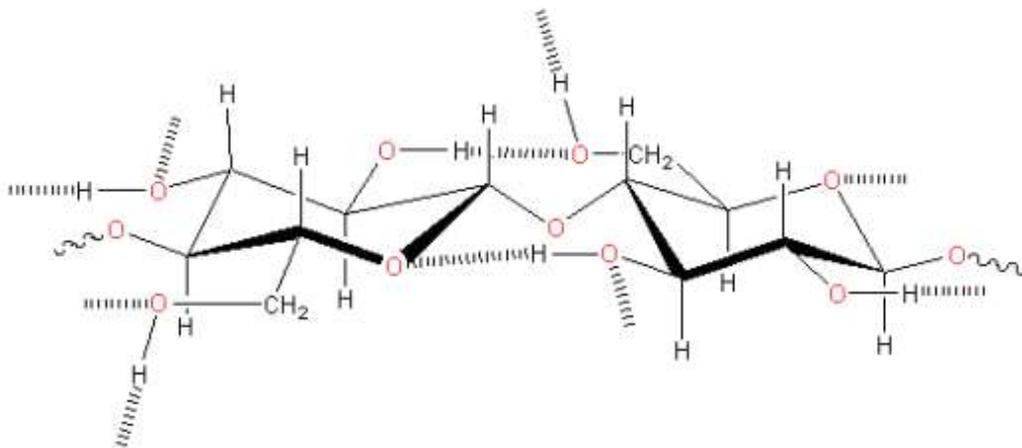
Essa enzima tem sido utilizada também como complemento de extratos (*Aspergillus oryza* e alfa-amilase – Amaize®, Alltech, Inc), utilizados na alimentação de ruminantes com

alto teor de amido. O uso de extrato aumenta a digestibilidade, assim como o peso do animal e características de qualidade da carne (DO NASCIMENTO, 2018).

2.1.2 Celulase (EC 3.2.1.4)

A celulose ($C_6H_{10}O_5$), como demonstrado na figura 2, é um dos três constituintes do complexo lignocelulolítico, juntamente com a xilose e lignina. Ela é um polímero de glicoses quimicamente simples, mas fisicamente complexa, devido as ligações β -1,4 conforme demonstrado na Figura 3. É o biopolímero mais abundante no mundo com uma produção estimada de 14^{10} toneladas por ano e de grande importância econômica, ela pode ser encontrada em diferentes formas de vida como em plantas verdes, fungos, protozoários e procariontes. As celulases possuem o papel de quebra das ligações β -1,4 glicosídicas, através da hidrólise. Elas são divididas em três classes, endoglucanases, exoglucanases e β glicosidases. Todas as classes clivam as ligações da mesma forma, a diferença na hidrólise se dá, a atuação no substrato (KNOWLES et al, 1987; DONINI et al, 2010).

Figura 2: Estrutura linear da celulose.

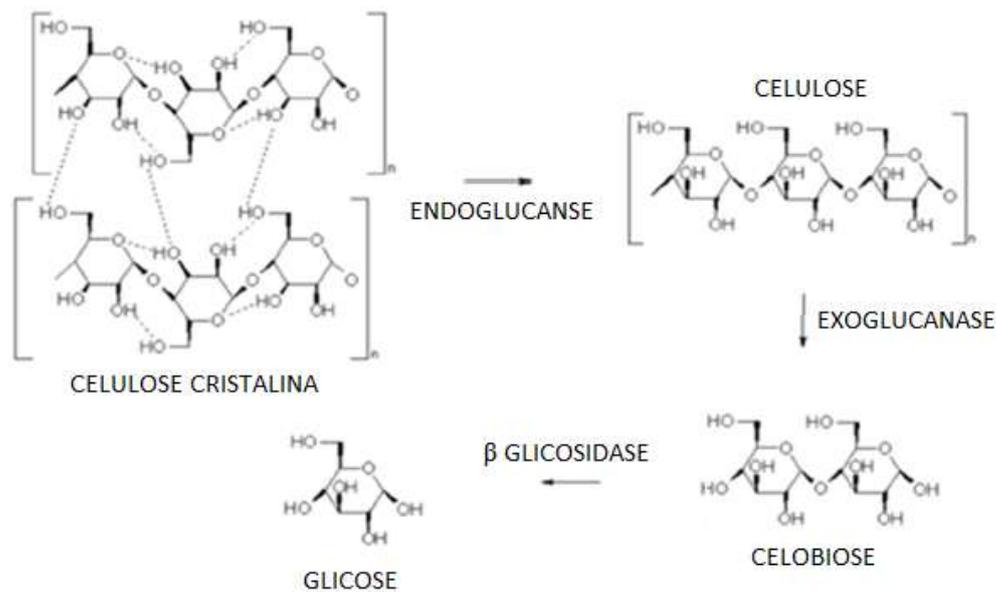


Fonte: Donini et al (2010)

A hidrólise da celulose ocorre de forma sinérgica e exige a participação dos três tipos de celulase (CHAN et al, 2018). As endoglucanases atuam em regiões de ataque de baixa

cristalinidade na fibra de celulose e criam extremidades de cadeia livre, exoglucanases ou que degradam ainda mais a molécula removendo as unidades de celobiose nas extremidades da cadeia livre geradas pelas endoglucanases e β -glicosidases que realizam a hidrólise da celobiose para produzir glucose livre, conforme demonstrado na Figura 3 (BEHERA et al, 2017).

Figura 3: Mecanismo de ação do complexo enzimático sobre a molécula de celulose.



Fonte: Adaptado de Moretti (2013)

A carboximetilcelulose é um produto industrial hidrossolúvel, que é formado a partir da suspensão da celulose, hidróxido de sódio e ácido monocloroacético, assim, sendo obtido através de transformações da celulose (CARACHI; CAMPANA FILHO, 1999). Esse produto é comumente utilizado como substrato para endoglucanases, devido ao seu grande potencial de polimerização e baixa cristalinidade, portanto essa enzima atua na clivagem do da carboximetilcelulose (CAO E TAN, 2002; ZHANG et al., 2006; SÁ et al, 2007).

A busca por celulasas mais adequadas para aplicação nas indústrias tem aumentado nos últimos anos. Na indústria de panificação estas enzimas agem sobre a massa alterando características físico-químicas e sensoriais, assim melhorando o produto final (RIBEIRO et al, 2020).

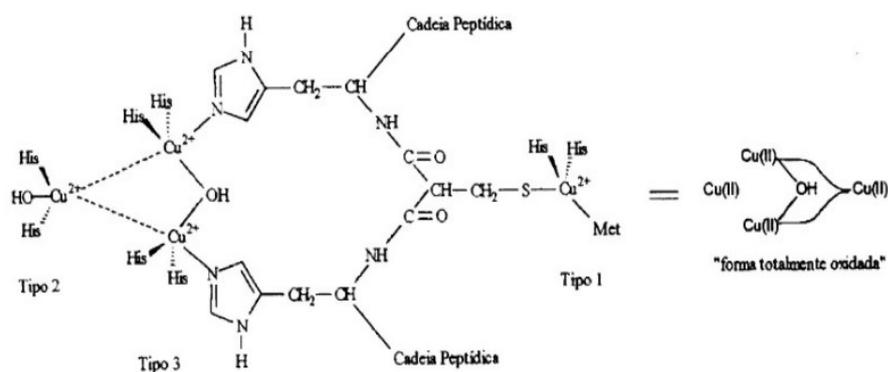
Elas são empregadas na indústria têxtil, sendo usadas para criar por exemplo uma aparência desbotada no jeans (bioestonagem) e remover microfibrilas salientes na superfície de tecidos para reduzir a formação de pilling (LIMA et al, 2020).

Apresentam uma ampla gama de aplicações nas indústrias de produção de biocombustíveis, produção de ração animal, fermentação de álcool de grãos, malte e fabricação de cerveja (SRIVASTAVA, 2018; VERMA, 2018; KARMACAR,2011; SULYMAN et al., 2020).

2.1.3 Lacase (E.C. 1.10.3.2)

As lacases fazem parte do grupo de enzimas multicobre. Essa enzima foi descrita pela primeira vez por Yoshida em 1883 e caracterizada como oxidase contendo metal em 1985 por Bertrand. Elas possuem uma vasta área de ataque a substratos, não tendo um em específico (MAYER, 2002). São glicoproteínas diméricas ou tetraméricas com quatro átomos de cobre por monômero. A sua função catalítica é controlada pelos átomos deste metal distribuídos em três centros diferentes. Tipo1 - centro de cobre azul; Tipo 2 – cobre; Tipo 3 – cobre bi nuclear, como demonstrado na Figura 4 em seu sítio ativo (DWIVEDI, 2011).

Figura 4: Representação do sítio ativo da lacase.



Fonte: Duran et al (2022).

O mecanismo geral de atuação das lacases é a oxidação do substrato com a eliminação de um elétron de um composto fenólico formando um radical fenoxila (HIGUCHI,1990). Esse mecanismo compreende em três etapas principais: a) redução do cobre tipo I por ação do substrato, b) transferência interna de elétrons do cobre tipo I para os do tipo II e III, c) redução

do oxigênio molecular da água através da sua interação para os tipos II e III (GIANFREDA et al, 1999).

O uso industrial de lacases para tratamento de efluentes (degradação de corantes e pigmentos), bem como para a clarificação de sucos de laranja e maçã é muito difundido. Ela também vem sendo usada para a remoção seletiva de compostos fenólicos e aromáticos indesejados, principalmente os taninos dos vinhos brancos. Sendo assim, também são uma alternativa para clarificação de vinhos base para espumantes (MARTINI et al., 2020).

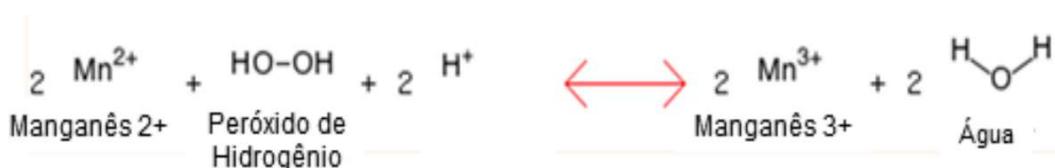
Lacases foram testadas para o uso em curativos, devido as suas atividades antibacterianas. Para gram-positivas o efeito antibacteriano foi de 92% e gram-negativas 26%, com citotoxicidade aceitável para tal aplicação (SAMPAIO et al., 2016).

Essa enzima também pode ser utilizada para a produção de café descafeinado, a forma tradicional utilizada pela maioria das indústrias é por meio do uso de solventes, como diclorometano que afeta as características sensoriais do produto, além de ser danoso ao meio ambiente. O uso de enzimas, como a lacase no processo de descafeinização é uma alternativa viável por ser um processo natural, onde se utiliza enzimas de alta atividade, estabilidade e com possibilidade recuperação (TORRES et al., 2021).

2.1.4 Manganês Peroxidase (E.C 1.11.1.13)

A manganês peroxidase (MnP) constitui juntamente com a Lignina Peroxidase (LiP) o grupo das peroxidases. São enzimas oxidativas extracelulares degradadoras de lignina, necessitando do peróxido de hidrogênio para oxidar. Para a manganês peroxidase Mn (II) é o melhor substrato redutor (TIEN & KIRK, 1983; LEISOLA et al., 1987; BORGAN & LAMAR 1995; JOHANSSON et al, 2002; TEM HAVE & TEUNISSEN, 2001). A manganês peroxidase atua como uma fenoloxidase em substratos fenólicos, oxidando Mn^{2+} em Mn^{3+} (PASZCZYNSKI, 1985). A atuação da Mnp é demonstrada na figura 5.

Figura 5: Ilustração da reação enzimática reversível mediada pela MnP



Fonte: Reação Kegg 00011

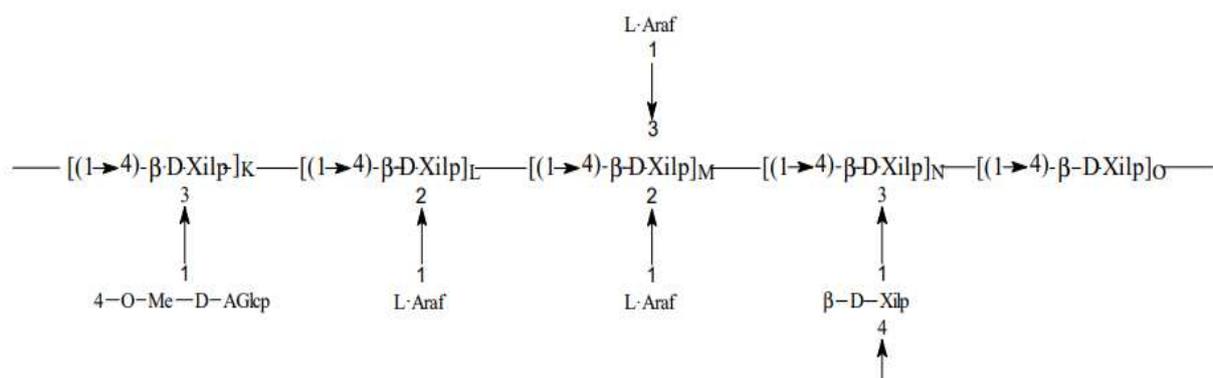
São capazes de catalisar reações redox para muitos substratos, por esse motivo são consideradas importantes catalisadores para diversas aplicações industriais, medicinais e biotecnológicas, principalmente como remediadoras de solos e águas residuais e ainda podem apresentar função de controle biológico, como bioherbicidas. (COPINI, 2022).

Essas enzimas são eficientes na biorremediação de resíduos têxteis como com as tintas; na polpação de branqueamento da celulose para produção de papel; na fabricação de cosméticos para a produção de cremes clareadores; na degradação de resíduos lignocelulósicos para produção de etanol, na indústria alimentícia com potencial para a produção de flavorizantes entre outras aplicações ((BARBOSA et al., 2008; FALADE et al., 2017; KUMAR; CHANDRA, 2020; PERALTA-ZAMORA et al., 1997).

2.1.5 Xilanase (E.C. 3.2.1.8)

A xilana é um polímero heterogêneo, altamente ramificado e de estrutura amorfa, portanto, mais fácil de ser hidrolisada que a celulose que possui estrutura cristalina. A xilana (Figura 6) é o principal polissacarídeo estrutural constituinte da hemicelulose, principalmente em gramíneas, e o segundo polissacarídeo mais abundante da natureza (PRADE,1996).

Figura 6: Estrutura química da xilana



Fonte: Silva (1998)

A enzima xilanase (endo-1,4-β-xilanase) atua na hidrólise da xilana, são enzimas que quebram as ligações β-1,4-xilosídicas entre dois resíduos D-xilopiranosídeo. Elas formam o maior grupo de enzimas hidrolíticas envolvidas na degradação da cadeia principal da xilana,

reduzindo o seu grau de polimerização e liberando oligossacarídeos solúveis e β -D-xilosidases (EC 3.2.1.37), que são responsáveis pela liberação de monômeros de xilose originários da parte não redutora de xilo-oligossacarídeos. (MEAGHER et al., 1988; Li et al., 2000; COLLINS et al., 2005; POLIZELI et al., 2005).

Endo-1,4- β -xilanases, são subdivididas em dois grupos principais: família 10 e família 11 que são os mais estudados. As diferenças se encontram em diferenças físico – químicas e estrutura, tendo a família 10 uma conformação na forma de um barril e a família 11 uma conformação globular (KOLENOVÁ, 2006, DUMON et al., 2011).

As xilanases de origem bacteriana se destacam devido a característica de serem termoestáveis-alcálicas com um pH ótimo um pouco maior do que a enzima de origem fúngica, essa característica é relevante para a maioria das aplicações industriais, principalmente na indústria de papel e celulose, onde é usada como agente de branqueamento, sendo uma forma biologicamente correta (MOTTA et al., 2013; ALBAR et al., 2022). Por serem termoestáveis e por terem o pH alcalino, participam de processos exotérmicos onde não há a necessidade de resfriamento, o que é um fator benéfico quando levado em conta processos industriais.

O uso de xilanases em indústrias começou em 1980, e cresceu consideravelmente com o passar dos anos. Suas aplicações são na preparação de ração animal, na indústria alimentícia, indústria têxtil, em biorrefinarias e na indústria de papel e celulose e (BHARDWAJ et al 2019). A enzima xilanase quando adicionada nas dietas para suínos, promove melhor aproveitamento da fibra bruta (ABREU et al., 2018).

2.2 Métodos de produção de enzimas microbianas

As enzimas microbianas podem ser obtidas por 2 principais meios: por fermentação submersa e estado sólido. A principal forma de obtenção de enzimas, em escala industrial, no entanto, é a fermentação submersa. Ela apresenta vantagens como: maior controle do processo fermentativo e consequente reprodução da cinética microbiana, além de maiores rendimentos (WANDERLEY et al, 2011).

A fermentação em estado sólido é considerada uma ferramenta relevante na produção de enzimas de origem microbiana (CHAVES, 2018). Ela consiste em um método de produção de microrganismos sobre substratos sólidos, na ausência de água livre (RODRIGUES, 2022).

A fermentação submersa ocorre com o meio fermentativo líquido, com os nutrientes dissolvidos, havendo a ocorrência de água livre. Em laboratório geralmente são realizadas em erlenmeyers e em escala industrial, grandes fermentadores (FEITOSA, 2009;

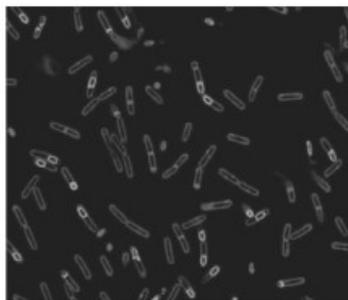
WOICIECHOWSI, 2009; RODRIGUES, 2001; ELLAIAH et al, 2004; ORLANDEI et al, 2012). Esse tipo promove a fácil recuperação de enzimas extracelulares micélios ou esporos. (PANDEY et al., 2000b; ELLAIAH et al., 2002; SANDHYA et al., 2005). Envolve um sistema homogêneo e certos parâmetros podem ser controlados facilmente como pH, trocas de calor e oxigênio dissolvido (VINIEGRA-GONZÁLEZ et al., 2002).

2.3 *Bacillus subtilis*

Ferdinand Cohn na década de 1970, isolou uma pequena bactéria móvel e aeróbica através de feno. Ele a chamou de *Bacillus subtilis*, que significa “vara fina” em referência a sua morfologia, concedendo a ela a primeira descrição do seu ciclo de vida além de destacado a resistência ao calor, germinação e a formação de esporos (GOLDMAN & GREEN, 2008).

É um modelo para estudos de bactérias gram-positivas (ERRINGTON et al., 2020). Essa sua capacidade de formar esporos de resistência e a grande quantidade de compostos antimicrobianos que produzem, geram grande interesse industrial por exemplo para produção de biopesticidas, conservantes de alimentos e agentes terapêuticos (CAULIER, 2019). Os esporos também vêm sendo usados na fabricação de bioconcretos. São incluídos em cápsulas, e ao entrarem em contato com água, secretam carbonato de cálcio, que preenchem fissuras que naturalmente surgem pela dilatação do material (ZAKRZEWSKI, 2022).

Figura 7: Representação da formação de esporos em *Bacillus subtilis*.



Fonte: Silvaggi et al. (2004).

Essa espécie também tem sido utilizada para produção de biofilmes, processo pelo qual células microbianas se agregam e formam aglomerados incorporados a uma matriz extracelular autoproduzida. Devido a sua maquinaria amilóide, ela vem quebrando uma das dificuldades neste campo, a limitação da secreção de proteínas. Esse novo uso promove aplicações potenciais

para biomateriais, biotecnologia e biomedicina (HUANG et al., 2019; ARNAOUTELI et al., 2021).

Também são comumente utilizadas para a produção de biossurfactantes, usando óleo residual como substrato para sua produção por exemplo. Essas substâncias podem ser utilizadas para reduzir a viscosidade e como biodispersor implicando a sua utilização para biorremediação ou indústria do petróleo (MAIA et al., 2022).

Dessa forma, *Bacillus subtilis* se apresenta como uma espécie promissora para aplicação em diferentes setores industriais.

2.4 Produção de enzimas por *Bacillus subtilis*

HECK et al (2022) relata a produção de celulasas e xilanasas por *Bacillus subtilis*, no entanto entre a produção das duas enzimas, esta espécie já foi apontada como melhor produtora para celulase. Neste estudo foi realizado a fermentação em estado semi sólido, utilizando como fonte de carbono subprodutos do processo de produção da proteína de soja.

Também já foi relatada sua produção positiva para amilases por SANTOS (2021), em um estudo com oito isolados de *Bacillus subtilis* na influência do crescimento em plantas de milho, onde todos oito produziam. Foi utilizado testes em placa com cultivo em meio acrescido de amido e revelação feita com lugol, observando-se a mudança da coloração do meio de opaco para azul e a formação de um halo ao redor da colônia. Também foi analisada a produção de celulase, com revelação de halo por lugol, na qual também, apresentou-se positiva.

Lacases originárias desta espécie foram estudadas na formação de corantes azo por BAPTISTA (2018), por meio da oxidação de aminas aromáticas selecionadas da sua estrutura e do uso de ABTS como mediador para substratos que não são oxidados pela enzima. A lacase neste estudo desenvolveu-se bem como um catalizador, sendo apontada como uma boa substituta para oxidantes químicos.

Até onde sabemos não existem literaturas que tratem da produção de manganês peroxidase pela espécie em questão, no entanto existem trabalhos relacionados a *Bacillus pumilus*, que foi estudada na ausência e presença de indutores. As MnP obtidas em fermentação submersa foram purificadas eluídas em duas frações, onde as primeiras apresentaram atividade para essa enzima (OLIVEIRA, 2008).

3. METODOLOGIA

3.1 Reativação dos microrganismos e condições de cultivo

Foram selecionadas 10 cepas de *Bacillus subtilis* pertencentes à Coleção de Culturas da Microbiologia Agrícola (CCMA) da Universidade Federal de Lavras (UFLA), cujos códigos correspondentes são: CCMA 0081, CCMA 0051, CCMA 0054, CCMA 0087, CCMA 0136, CCMA 401, CCMA 0658, CCMA 1228, CCMA 1287, CCMA 1340.

Todas as cepas foram reativadas em meio Ágar Nutriente (3 g L⁻¹ de extrato de carne, 5 L⁻¹ de peptona e 15 L⁻¹ de ágar) a 35 °C por 24 horas.

3.2 Teste semiquantitativo para seleção do melhor microrganismos produtor de enzimas

Todas as cepas foram cultivadas em meio sólido indicativo para produção de celulase, xilanase, lacase, amilase e manganês peroxidase. O meio base para cada enzima foi o Ágar Nutriente acrescido dos respectivos indutores (0,1%) de cada enzima: guaiacol (lacase), carboximetilcelulose (celulase), xilana (xilanase), amido (amilase) e vermelho de fenol (manganês peroxidase). Foram considerados dois tratamentos: meio com adição de glicose (0,1%) e meio sem adição de glicose. Também foram estabelecido um controle para cada meio de cultivo, acrescido de cada indutor com e sem glicose.

Para padronização dos inóculos (1x10⁶ UFC/ml), porções celulares foram transferidos com o auxílio de uma alça de inoculação para tubos contendo 10 mL de solução salina (0,85%), homogeneizados e diluídos – conforme necessidade – até atingir a turbidez padrão de acordo com o padrão número 1 da escala de McFarland (Biomérieux®). Posteriormente, o plaqueamento foi realizado através da técnica de microgota (10 µL), em três pontos equidistantes da placa. Todas as placas foram incubadas em BOD a 35 °C durante 24 horas.

Para revelação do halo enzimático, as placas de amido, xilana e carboximetilcelulose foram inundadas com uma solução de lugol. A presença de um halo hialino ao redor das colônias confirma a produção enzimática. Para lacase e manganês peroxidase, a presença de um halo marrom e avermelhado ao redor das colônias confirmam a produção enzimática, respectivamente (HANKING, 1975; BERNAL, 2020).

Figura 8: Exemplificação do uso do padrão segundo o protocolo McFarland.



Fonte: Do autor (2022)

Para o cálculo do índice enzimático (IE), o diâmetro da colônia e o halo enzimático foram medidos com o auxílio de um paquímetro (HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, 1975). O cálculo foi realizado seguindo a Equação 1. Foi considerado então os valores dos índices enzimáticos para a cepa a ser quantificada.

$$(IE) = \frac{\text{diâmetro do halo}}{\text{diâmetro da colônia}} \quad (1)$$

3.3 Quantificação enzimática para CCMA 0658

Os microrganismos foram inoculados (10 mL do inóculo), em caldo nutriente (90 mL) cuja a constituição foi de 3 g L⁻¹ de extrato de carne, 5 L⁻¹ de peptona, acrescidos dos respectivos indutores (0,1 %) de cada enzima: guaiacol (lacase), carboximetilcelulose (celulase), xilana (xilase), amido (amilase) e vermelho de fenol (manganês peroxidase). Foram considerados dois tratamentos: meio com adição de glicose (0,1%) e meio sem adição de glicose. A

fermentação ocorreu em Erlenmeyers de 250 mL e os frascos foram incubados a 35 °C sob agitação constante a 120 rpm. Os extratos foram congelados para posterior análise e quando necessário descongelados em banho de gelo para minimizar a perda da atividade enzimática. Para cada enzima foi construída uma curva padrão específica.

3.4 Determinação da atividade enzimática

Para obtenção dos extratos brutos enzimáticos, nos intervalos de tempo T0 (0 h), T1 (12 h), T2 (36 h), T3 (60 h), T4 (84 h), foram retiradas alíquotas de 1 mL referentes a cada amostra, centrifugadas a 10.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi retirado para determinação das atividades enzimáticas em espectrofotômetro com leitor de microplacas ELISA.

Todos os valores obtidos para atividade enzimática foram obtidos de T 0h, no momento da montagem do experimento, pois apresentavam atividades diferentes de 0, que foram atribuídas a extremidades redutoras já presentes.

3.4.1 Amilase

A dosagem enzimática foi realizada com 100 µL de amido a 1% tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,5 com 50 µL da enzima. A solução foi incubada a 37° C por 30 minutos. A reação foi interrompida com 150 µL de DNS e fervida por 5 minutos a 100°C. Depois adicionou-se 100 µL de H2O destilada. A leitura foi no comprimento de onda de λ 540 nm. Para o branco foi usada a mesma solução sem a solução enzimática (COMPTON; JONES, 1985).

Para a curva padrão foi utilizado o método de dosagem para açúcares redutores segundo Soccol,1992. Para dosagem, as amostras foram diluídas de modo a se obter um teor equivalente em maltose inferior a 1 g/l em, sendo utilizado 6 pontos. Adicionou-se 0,5 ml da amostra convenientemente diluída a 0,5 ml do reagente DNS e posteriormente 2 ml de água destilada. As incubações foram realizadas como nas amostras. A mistura foi homogeneizada e uma reta padrão elaborada a partir de uma leitura à 540 nm. Os teores de maltose – equivalente (g/l) são obtidos por projeção sobre a reta padrão.

3.4.2 Carboximetilcelulase

A dosagem enzimática foi feita com 50 µL de CMC a 1% com tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0 e 50 µL de extrato enzimático pH 6,0. A solução foi incubada a 50 °C por 30

minutos. A reação foi interrompida com 100 μL de ácido dinitrosalicílico (DNS) (MILLER, 1959). Em seguida foi fervida por 5 minutos a 100 $^{\circ}\text{C}$. Adicionou-se 750 μL de H_2O destilada. O branco da análise continha 50 μL do substrato, 100 μL de DNS e 750 μL de água destilada. A leitura foi realizada em espectrofotômetro comprimento de onda de $\lambda 540 \text{ nm}$ (GHOSE, 1987).

A curva padrão foi realizada seguindo a metodologia proposta por Miller, 1959. Foram utilizados 0,5 ml de DNS, em conjunto com diferentes volumes (0ml à 0,5ml) de glicose 10 mM. Essas misturas eram agitadas e levadas em banho maria por 100 $^{\circ}\text{C}$ por 5 min. Deixou-se esfriar a temperatura ambiente e completou-se o volume para 5ml com água destilada. A leitura foi realizada a $\lambda 540 \text{ nm}$.

3.4.3 Manganês peroxidase

A atividade de manganês peroxidase foi determinada pela oxidação de 0,5 mL de vermelho de fenol 0,1 % (a dissolução do vermelho de fenol em água foi feita pelo ajuste continuado do pH em 7,4) em 1,5 mL de tampão succinato de sódio 20 mM (pH 4,5), 1,5 mL de lactato de sódio 50 mM, 0,25 mL de albumina 1%, 0,5 mL de MnSO_4 1 mM, 0,5 mL de extrato e 0,25 mL de peróxido de hidrogênio 2 mM. Após 5 minutos, 1 mL da mistura contida no tubo de ensaio foi removida e a esse volume foi feita a adição de 65 μL de hidróxido de sódio 6,5 M para interromper a reação. A atividade de MnP foi calculada com base na absorvidade molar do vermelho de fenol oxidado ($\lambda 610\text{nm}$). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como 1 μmol do produto formado por minuto, segundo equação 2 (KHINDARIA; GROVER; AUST, 1994; LUNDELL et al., 1990).

$$U/L = \frac{abs \times 10^6}{\epsilon \times R \times t} \quad (2), \text{ onde}$$

ϵ = coeficiente de absorção molar

R= quantidade da solução

abs= absorbância

t= tempo

3.4.4 Xilanase

A quantificação das enzimas xilanolíticas com o substrato 75 μL de xilose 1% (tampão acetato de sódio pH 5,0 a 50 mM) com 50 μL da enzima. A solução foi incubada por 10 minutos a 50 °C. Interrompeu-se a reação com 125 μL de DNS. Após, a mistura foi fervida por 5 minutos a 100 °C. Adicionou-se 500 μL de H_2O , e leu-se a $\lambda 540$ nm. Foi usado como branco o substrato sem a enzima. O branco foi uma solução preparada com o intuito de medir a quantidade de açúcares redutores já presentes, para assim determinar a atividade exata da enzima através da quebra da xilose.

Para a curva padrão foi utilizado o método de dosagem para açúcares redutores segundo Soccol, 1992. Para dosagem, as amostras foram diluídas de modo a se obter um teor equivalente em xilose inferior a 1 g/l em, sendo utilizado 6 pontos. Adicionou-se 0,5 ml da amostra convenientemente diluída a 0,5 ml do reativo DNS e posteriormente 2 ml de água destilada. As incubações foram realizadas como as amostras. A mistura foi homogeneizada e uma reta padrão elaborada a partir de uma leitura à 540 nm. Os teores de maltose – equivalente (g/l) são obtidos por projeção sobre a reta padrão.

3.5 Análises estatísticas

O experimento foi conduzido em um delineamento inteiramente casualizado (DIC). Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), utilizando o software SISVAR (Ferreira, 2000). As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade. A normalidade dos resíduos foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk a 5% de significância e a homogeneidade da variância avaliada pelo teste de Bartlett a mesma significância.

4 RESULTADOS

4.1 Teste semiquantitativo para a seleção dos melhores microrganismos produtores de enzimas

Foi observado a capacidade ou não das dez cepas produzirem as cinco enzimas: amilase, lacase, celulase, manganês peroxidase e xilanase.

Nenhum isolado produziu lacase nas condições testadas. Contudo, para as demais enzimas, foi observada a capacidade de produção por todas as cepas testadas.

Tabela 1. Produção de amilase por diferentes cepas de *Bacillus subtilis*, em meio sem/com adição de glicose, avaliada por índice enzimático (IE).

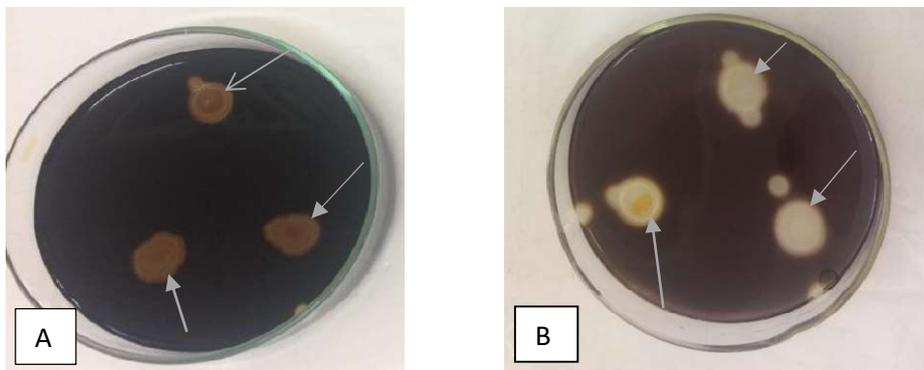
| Cepa/CCMA | IE sem glicose | IE com glicose |
|-----------|-------------------|-------------------|
| 51 | 1,90 a* | 1,30 c* |
| 54 | 1,73 a | 1,30 c |
| 81 | 1,33 c | 1,16 c |
| 87 | 1,26 c | 1,16 c |
| 136 | 1,23 c | 0,00 d |
| 401 | 1,60 b | 2,00 a |
| 658 | 1,40 c | 1,56 b |
| 1228 | 1,56 b | 1,60 b |
| 1287 | 1,53 b | 1,23 c |
| 1340 | 1,36 c | 1,36 c |

** CV (%) = 9,78
 *** p= 0,2758 resíduos
 **** p= 0 homogeneidade

Legenda: * Teste Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. Letras diferentes indicam diferenças estatística entre as cepas em cada tratamento. **CV= Coeficiente de variação, mede a dispersão dos dados em relação a média aritmética, quanto menor melhor a precisão dos dados. ***Teste de Shapiro-Wilk a 5%, teste para determinação de normalidade resíduos, se $p > 0,05$ os dados seguem uma distribuição normal. **** Teste de Bartlett a 5% para avaliação da homogeneidade das variâncias, se $p > 0,05$, as variâncias são consideradas homogêneas.

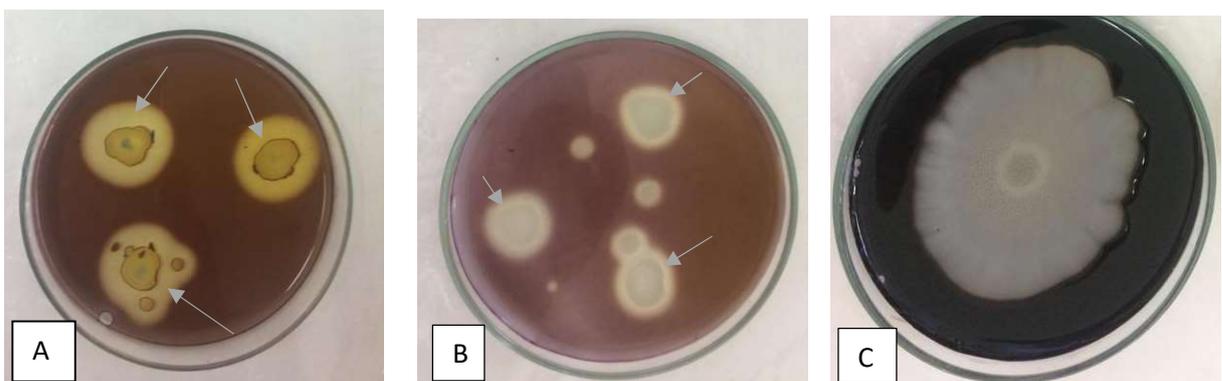
Abaixo na Figura 9, estão ilustradas duas cepas estudadas, no fator com ausência de glicose e na Figura 10, estão ilustradas três cepas com o com a presença de glicose (0,1%):

Figura 9. Teste semiquantitativo de produção para enzima amilase, após revelação com lugol, pelos microrganismos: A) CCMA 0051 B) CCMA 0054. As setas indicam os halos formados, inferindo a produção da enzima.



Fonte: Do autor (2022)

Figura 10. Teste semiquantitativo de produção para enzima amilase na presença de glicose (0,1%), após revelação com lugol, pelos microrganismos: A) CCMA 0401 B) CCMA 1228 e C) CCMA 0136. As setas indicam os halos formados, inferindo a produção da enzima.



Fonte: Do autor (2022)

Conforme os resultados da Tabela 1, as cepas apresentam variação quanto ao potencial de produção da enzima amilase se destacando CCMA 0051 (IE = 1,90), CCMA 0054 (IE = 1,73) no fator sem glicose e CCMA 0401 (IE= 2,0), CCMA 1228 (IE= 1,60) no fator com glicose. Segundo Fernandes (2009), $IE \geq 2$ são indicativos de bom potencial de produção enzimática. Assim, CCMA 0401 com glicose apresentou-se como melhor produtora, devido ao índice enzimático (IE =2,0).

Foi constatado que, para o fator sem glicose, CCMA 0054 (IE=1,73), CCMA 0401 (IE=1,60) CCMA 1228 (IE=1,56), CCMA 1287 (IE=1,53) e para o fator com glicose CCMA 0658 (IE=1,56) e 1228 (IE=1,60) apresentaram-se com produção intermediária, apesar de não possuírem $IE \geq 2$, seus valores se aproximam deste parâmetro. Assim, CCMA1228 apresentou para ambos os fatores produção intermediária. Para as demais cepas considerou-se uma produção enzimática inferior.

Para a cepa CCMA 0136 não houve formação de halo enzimático (IE = 0), ocorrendo, no entanto, a formação de exsudato. Segundo Lee (2000), quando há suprimento de carbono suficiente, mas o meio se torna pobre em nutriente, *Bacillus subtilis* se torna capaz de secretar tais compostos orgânicos, sendo que a fonte de carbono provavelmente se torna células bacterianas mortas. Esses compostos são formados na maior parte por polissacarídeos e ácidos orgânicos.

De Jesus (2013), relata a produção de amilases por uma cepa de *Bacillus subtilis* oriunda de cacau (2c). Essa cepa foi avaliada para índice enzimático em diferentes intervalos de tempo e em 24 h apresentou IE=1,3. Tal estudo não foi realizado com o acréscimo de glicose, no entanto percebe-se uma proximidade com os dados apresentados na Tabela 1, para ambos os fatores.

Tabela 2. Produção de celulase por diferentes cepas de *Bacillus subtilis*, em meio sem/com adição de glicose, avaliada por índice enzimático (IE).

| Cepa/CCMA | IE sem glicose | IE com glicose |
|-----------|----------------|----------------|
| 51 | 1,6 c* | 1,2 d* |
| 54 | 1,5 c | 1,5 c |
| 81 | 1,3 c | 1,3 d |

| | | |
|------|--------------|-------|
| 87 | 2,0 b | 1,5 c |
| 136 | 0,4 d | 1,3 d |
| 401 | 2,6 a | 2,2 a |
| 658 | 1,5 c | 1,6 c |
| 1228 | 1,4 c | 1,6 c |
| 1287 | 1,3 c | 1,8 b |
| 1340 | 1,3 c | 1,5 c |

** CV (%) = 19,02

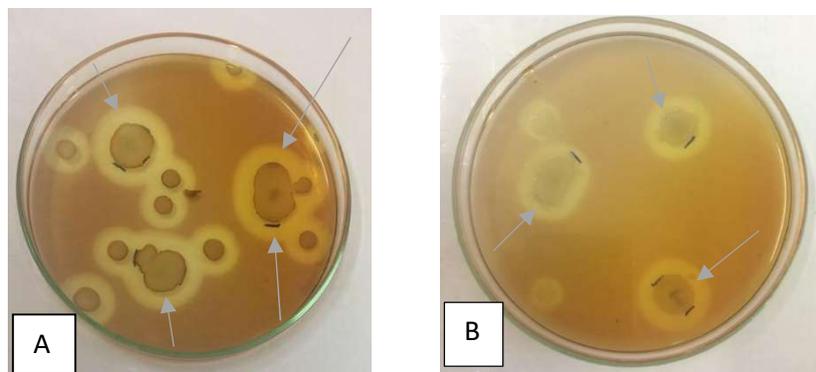
*** p= 0,005 resíduos

**** p= 0 homogeneidade

Legenda: * Teste Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. Letras diferentes indicam diferenças estatística entre as cepas em cada tratamento. **CV= Coeficiente de variação, mede a dispersão dos dados em relação a média aritmética, quanto menor melhor a precisão dos dados. ***Teste de Shapiro-Wilk a 5%, teste para determinação de normalidade resíduos, se $p > 0,05$ os dados seguem uma distribuição normal. **** Teste de Bartlett a 5% para avaliação da homogeneidade das variâncias, se $p > 0,05$, as variâncias são consideradas homogêneas.

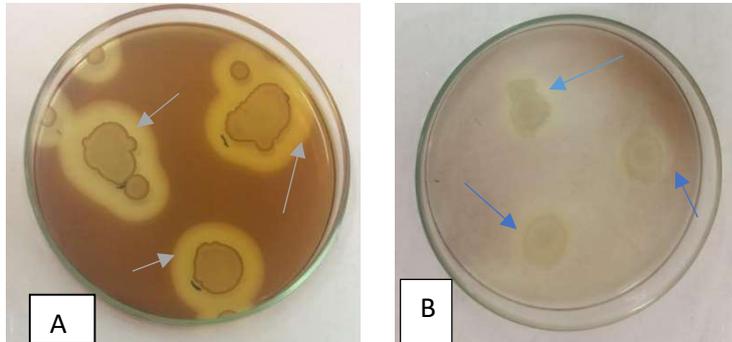
Abaixo na Figura 11 estão ilustradas duas das cepas estudadas, para o fator sem glicose e na Figura 12, estão ilustradas duas das cepas estudadas para o fator com glicose.

Figura 11. Teste semiquantitativo de produção para enzima amilase na presença de glicose (0,1%), após revelação com lugol, pelos microrganismos: A) CCMA 0401, B) CCMA 0087. As setas indicam os halos formados



Fonte: Do autor (2022)

Figura 12. Teste semiquantitativo de produção para enzima amilase na presença de glicose (0,1%), após revelação com lugol, pelos microrganismos. A) cepa CCMA 0401, B) cepa CCMA 1287. As setas indicam os halos formados, inferindo a produção da enzima.



Fonte: Do autor (2022)

Conforme os resultados da Tabela 2, somente duas cepas apresentaram bons potenciais de produtividade para enzima celulase. A CCMA 0401 no fator sem glicose apresenta o melhor índice enzimático (IE=2,6), seguida por esta mesma cepa, entretanto na ausência de glicose (IE= 2,2) e por último CCMA 0087 na ausência de glicose (IE=2,0).

Na presença de glicose CCMA 0051 (IE=1,2) e CCMA81 (IE=1,3) não se apresentam como boas produtoras, as demais enzimas encaixam-se em um padrão de produção intermediário. Na ausência de glicose a cepa CCMA 0051(IE=1,6), CCMA 0054 (IE=1,5), CCMA 0658 (IE=1,5) apresentaram produção intermediária e demais cepas baixa produtividade.

Cotta (2021), relata a atividade positiva de celulase para três isolados de *Bacillus subtilis* 9C1 (IE=5,66), 16C2 (IE= 5,84) e 19C2 (IE=5,88), em um estudo de microrganismos termo resistentes isolados de compostagem. Esses resultados apresentam-se em um padrão muito acima dos índices enzimáticos obtidos pelas 10 cepas como demonstrado na Tabela 2, como já citado o maior índice foi A CCMA 0401 no fator sem glicose IE= 2,6. Tal discrepância pode estar relacionada ao a uma adaptação na metodologia para a quantidade de indutor utilizada (0,1%), o que normalmente se utiliza à 1%.

Tabela 3. Produção de manganês peroxidase por diferentes cepas de *Bacillus subtilis*, em meio sem/com adição de glicose, avaliada por índice enzimático IE.

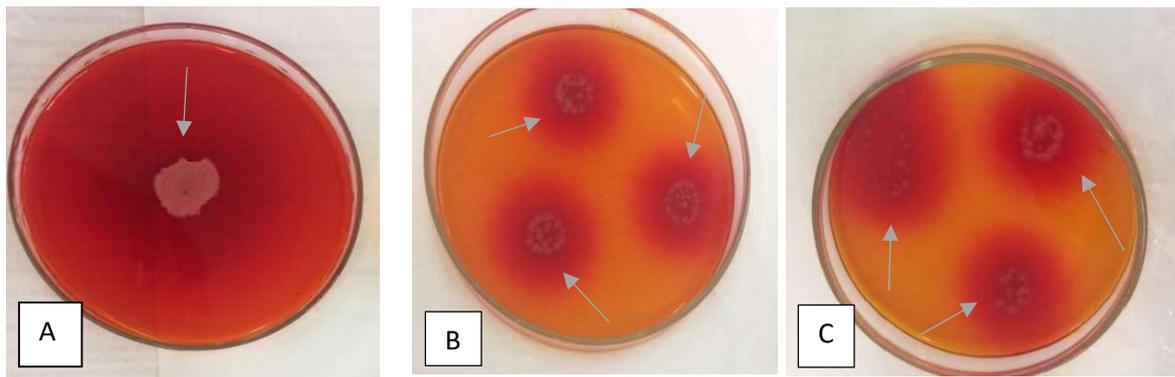
| Cepa/CCMA | IE sem glicose | IE com glicose |
|-----------|-------------------|-------------------|
| 51 | 0,0 e* | 0,0 b* |
| 54 | 0,0 e | 0,7 b |
| 81 | 1,5 d | 2,0 a |
| 87 | 2,6 a | 1,7 a |
| 136 | 2,3 b | 2,1 a |
| 401 | 0,0 e | 0,0 b |
| 658 | 2,0 c | 2,2 a |
| 1228 | 1,6 d | 1,5 a |
| 1287 | 1,5 d | 1,8 a |
| 1340 | 1,6 d | 1,9 a |

** CV (%) = 9,51
*** p= 2,584 resíduos
**** p=0 homogeneidade

Legenda: * Teste Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. Letras diferentes indicam diferenças estatística entre as cepas em cada tratamento. **CV= Coeficiente de variação, mede a dispersão dos dados em relação a média aritmética, quanto menor melhor a precisão dos dados. ***Teste de Shapiro- Wilk a 5%, teste para determinação de normalidade resíduos, se $p > 0,05$ os dados seguem uma distribuição normal. **** Teste de Bartlett a 5% para avaliação da homogeneidade das variâncias, se $p > 0,05$, as variâncias são consideradas homogêneas.

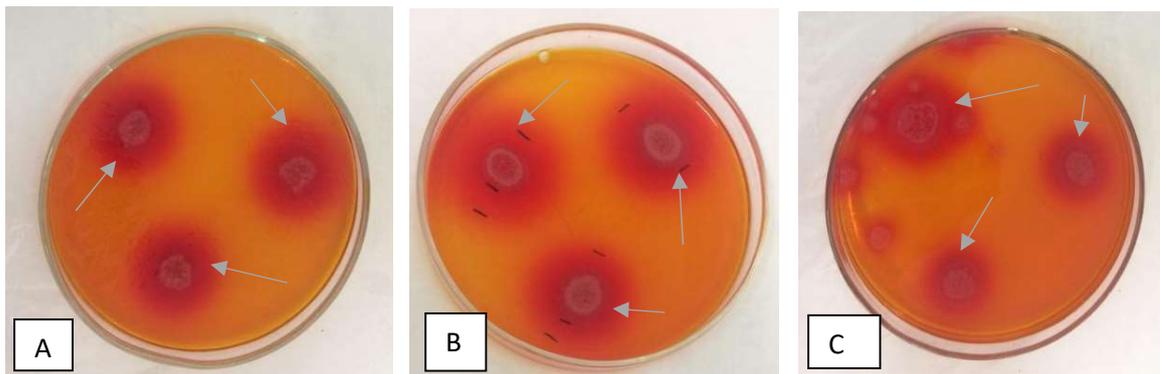
Abaixo na Figura 12 estão ilustradas três das cepas estudadas para o fator sem glicose e na Figura 13 três cepas estudadas, para o fator com glicose.

Figura 13. Teste semiquantitativo de produção para enzima manganês peroxidase na ausência de glicose (0,1%), pelos microrganismos. A) CCMA 87, B) CCMA 136 e C) CCMA 658, as setas indicam os halos formados, inferindo a produção da enzima.



Fonte: Do autor (2022)

Figura 14. Teste semiquantitativo de produção para enzima manganês peroxidase na presença de glicose (0,1%), pelos microrganismos. A) CCMA 658, B) CCMA 136 e C) CCMA 81, as setas indicam os halos formados, inferindo a produção da enzima.



Fonte: Do autor (2022)

Conforme a tabela 5 CCMA 0051 e CCMA 0401 não apresentaram produtividade para manganês peroxidase em ambos os fatores, além de CCMA 0054 não ter apresentado produtividade para o fator se glicose.

Os maiores produtores no fator sem glicose foram CCMA0087 (IE=2,6) CCMA 0136 (IE=2,3) seguidas por CCMA 0658 (IE=2,0), as demais cepas que apresentaram produtividade, demonstraram um padrão de produção intermediário.

Para o fator com glicose CCMA 0658(IE=2,2) apresentou a melhor produtividade seguida por CCMA 136 (IE=2,1), CCMA 0081 (IE=2,0). A demais cepas apresentaram-se como

produtoras intermediárias, exceto CCMA 0054 (IE= 0,7), que se apresenta como uma má produtora.

Não foram encontrados na literatura, relatos de estudos envolvendo testes semiquantitativos para *Bacillus sp.* ou *Bacillus subtilis* para a atividade enzimática de manganês peroxidase.

Tabela 4. Produção de xilanase por diferentes cepas de *Bacillus subtilis*, em meio sem/com adição de glicose, avaliada por índice enzimático IE.

| Cepa/CCMA | IE sem glicose | IE com glicose |
|-----------|----------------|----------------|
| 51 | 2,1 a* | 1,3 c* |
| 54 | 1,7 a | 1,2 c |
| 81 | 1,4 a | 1,1 c |
| 87 | 1,5 a | 1,2 c |
| 136 | 1,5 a | 1,3 c |
| 401 | 1,3 a | 1,4 b |
| 658 | 1,7 a | 1,6 a |
| 1228 | 1,3 a | 1,2 c |
| 1287 | 1,6 a | 1,3 c |
| 1340 | 1,8 a | 1,4 b |

** CV (%) = 14,63

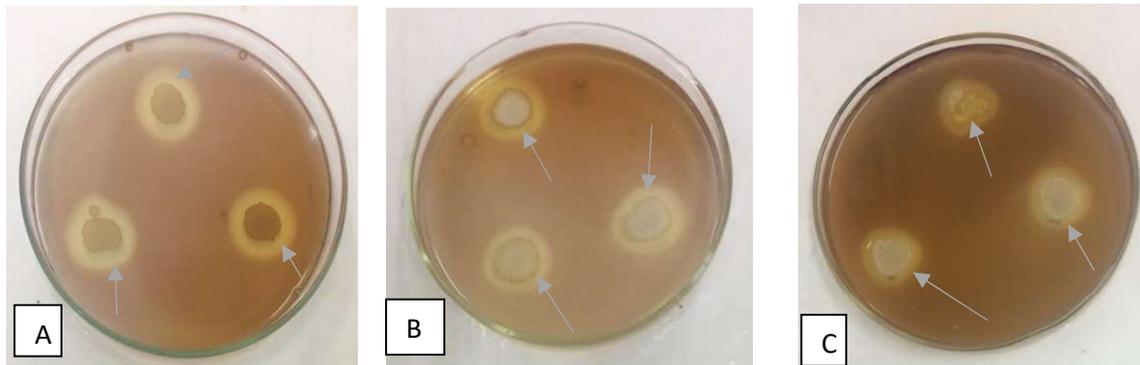
*** p=0,4332 resíduos

**** p= 0,1661 homogeneidade

Legenda: * Teste Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. Letras diferentes indicam diferenças estatística entre as cepas em cada tratamento. **CV= Coeficiente de variação, mede a dispersão dos dados em relação a média aritmética, quanto menor melhor a precisão dos dados. ***Teste de Shapiro wilk a 5%, teste para determinação de normalidade resíduos, se $p > 0,05$ os dados seguem uma distribuição normal. **** Teste de Bartlett a 5% para avaliação da homogeneidade das variâncias, se $p > 0,05$, as variâncias são consideradas homogêneas.

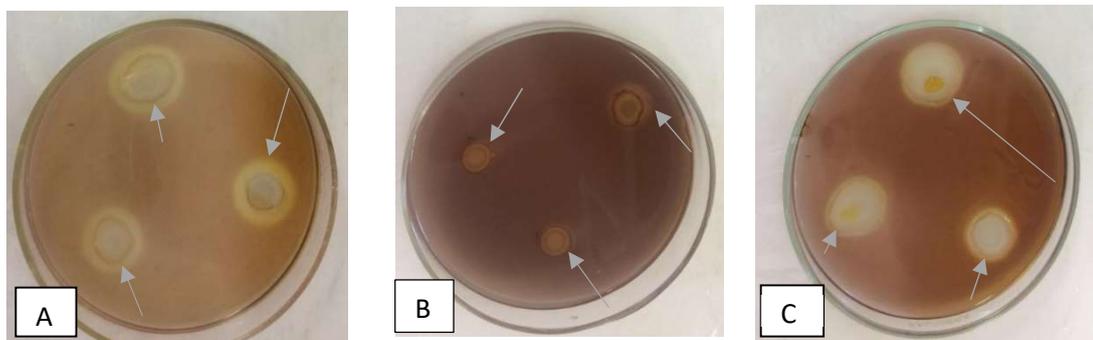
Abaixo na Figura 14 estão ilustradas três das cepas estudadas para o fator sem glicose e na Figura 15, estão ilustradas três cepas com o fator glicose:

Figura 15: Teste semiquantitativo de produção para enzima xilanase na ausência de glicose (0,1%), após revelação com lugol, pelos microrganismos A) CCMA 51, B) CCMA 658 e C) CCMA 81, as setas indicam os halos formados, inferindo a produção da enzima.



Fonte: Do autor (2022)

Figura 16: Teste semiquantitativo de produção para enzima xilanase na presença de glicose (0,1%), após revelação com lugol, pelos microrganismos. A) CCMA 658, B) CCMA 401 e C) CCMA 81, as setas indicam os halos formados, inferindo a produção da enzima.



Fonte: Do autor (2022)

CCMA 0051 (IE=2,1) sem glicose se apresentou como a melhor cepa produtora, quando comparado ambos os fatores. Para o fator sem glicose, CCMA0081(IE=1,4) CCMA0401(IE=1,3) e CCMA1228(IE=1,3) apresentaram produtividade intermediária sendo todas outras boas produtoras, pois possuem valores próximos de IE=2.

No fator com glicose a melhor cepa produtora foi a CCMA 0658 (IE= 1,6), sendo classificada como uma produtora intermediária. Todas outras cepas apresentaram valores de índices enzimáticos distantes de IE=2, portanto foram classificadas como más produtoras.

Alves et al (2017), relata a produção em testes semiquantitativos para produção de xilanase em bactérias e leveduras oriundas do coco verde, dentre as quais está *Bacillus* sp. (código: B2). Apesar de ser produtora, ele retrata que não houve uma produtividade acentuada. O que condiz com os dados da Tabela 4, uma vez que grande parte das cepas para ambos os tratamentos não se apresentaram como boas produtoras.

4. Determinação das atividades enzimáticas após fermentação submersa

A cepa cuja produção se deu melhor, de uma forma geral para todas as enzimas, foi a CCMA 0658. Foi realizado o cultivo em meio líquido e retirado as alíquotas (1 mL) referentes a cada amostra, nos tempos de T0 (0 h), T1 (12 h), T2 (36 h), T3 (60 h), T4 (84 h). Então centrifugadas e o sobrenadante retirado para determinação das atividades enzimáticas em espectrofotômetro com leitor de microplacas ELISA, para cada enzima com metodologia específica.

Para a enzima lacase não houve quantificação, uma vez que nenhuma cepa foi produtora desta enzima nas condições testadas.

Tabela 9. Atividade da amilase em U/L por tempo, na ausência e presença de glicose.

| Tempo (h) | A(U/L) | AG (U/L) |
|-----------|---------|----------|
| 12 | 0,00005 | 0,000216 |
| 36 | 0,00027 | 0,000243 |
| 60 | 0,00027 | 0,000039 |
| 84 | 0,00009 | 0,000055 |

Legenda: A: meio acrescido de amido 0,1%; AG: Meio acrescido de glicose e amido ambos 0,1%

Para amilase, a curva padrão apresentou o valor de $R^2 = 0,9749$ e a equação 3.

$$y = 0,0014x - 0,0163 \quad (3)$$

Para a enzima amilase, ambos os fatores apresentaram produção. Na ausência de glicose o pico de produtividade (fase log) ocorre as 36h e segue por uma fase de estabilização até as 60 h com 0,00027 U/L. No fator com glicose o pico também ocorre às 36 h com 0,000243U/L, no entanto há um declínio na atividade enzimática até as 60h.

Silva (2012) relata a produção de amilase oriundas de *Bacillus amyloliquefaciens* por fermentação submersa em um estudo utilizando as tortas de macaúba, torta de dendê, farinha de pupunha, torta de tremoço e torta de mamona como substrato. Os valores quando comparados com os da Tabela 9, são muito maiores comparando todos os substratos.

Essa discrepância nos resultados pode estar relacionada a quantidade de indutor utilizado assim como nos testes semiquantitativos.

Tabela 10. Atividade da celulase em U/L por tempo, na ausência e presença de glicose.

| Tempo (h) | CMC(U/L) | CMCG(U/L) |
|-----------|----------|-----------|
| 12 | 0,19144 | 0,258308 |
| 36 | 0,427196 | -0,289590 |
| 60 | 0,243777 | -0,404120 |
| 84 | 0,105336 | -0,42335 |

Legenda: CMC: meio acrescido de carboximetilcelulose 0,1%; CMCG: Meio acrescido de glicose e carboximetilcelulose ambos 0,1%.

Para celulase a curva padrão apresentou o valor de $R^2 = 0,985$ e a equação conforme a equação 4.

$$y = 1,672x - 0,0178 \quad (4)$$

As atividades para celulase foram positivas, e apresentaram um padrão de produção. Para o fator sem glicose, a CCMA 0658 obteve um pico de produção as 36h (fase log) com 0,4271 U/L e rápida reprodução bacteriana e intensa atividade bacteriana, seguido por um declínio. A queda pode ter sido provocada pelo decréscimo de organismos, originando um processo de feedback negativo (TORTORA et al., 2012; CASTRO et al., 2010; INFORSATO,2010).

Quando considerado o fator com glicose o pico de produtividade ocorre às 12 h com 0,2583 U/L e após a atividade enzimática sofre um grande declínio. Possivelmente isso se deve ao mesmo motivo do declínio no fator sem glicose, entretanto ocorrendo de uma forma mais brusca.

Scherer (2020), conduziu um estudo com *Bacillus subtilis* utilizando isolada do pó do tabaco, seguindo também metodologia de Miller, 1959 para açúcares redutores. Os valores da Tabela 10, no entanto se encontram maiores. Isso pode ser explicado devido a diferença do substrato, a pesquisa realizada por Scherer não utiliza carboximetilcelulose como

substrato, podendo ser um fator da discrepância dos dados, uma vez que interação entre enzima e substrato é um fator determinante na atividade enzimática.

Santos (2020), apresenta um estudo da otimização da produção e modelagem in silico de celulase de uma linhagem marinha de *Bacillus subtilis* halotolerante em que um dos microrganismos identificados como *Bacillus subtilis* SR22 apresenta uma atividade enzimática para celulase sem glicose de 0,31880 U/L, em que condiz com os dados deste estudo. O substrato para SR22, neste estudo foi utilizado carboximetilcelulose, o que reforça a hipótese para as discrepâncias dos dados com Scherer (2020).

Tabela 11. Atividade da xilanase em U/L por tempo, na ausência e presença de glicose.

| Tempo (h) | X(U/L) | XG(U/L) |
|-----------|-----------|----------|
| 12 | 0,000230 | -0,00040 |
| 36 | -0,000139 | -0,00046 |
| 60 | -0,000146 | -0,00034 |
| 84 | 0,000156 | 0,00012 |

Legenda: X: meio acrescido de xilana 0,1%; XG: Meio acrescido de glicose e xilana ambos 0,1%.

Para xilanase a curva padrão apresentou o valor de $R^2= 0,986$ e a equação conforme a equação 5.

$$y = 0,0036x - 0,4379 \quad (5)$$

Para o fator sem glicose o máximo de produtividade ocorreu às 12 h com 0,000230 U/L e para o fator com glicose o máximo foi em 84h com 0,00012 U/L, como demonstrado na Tabela 11. Assim, para xilanase foi considerado que houve produção enzimática para ambos fatores, sendo o fator sem glicose um produtor melhor. Como citado anteriormente HECK et al (2022) relata a produção de celulases e xilanases por *Bacillus subtilis*, no entanto ressaltando que são melhores produtoras para celulase. O que é percebido, de forma parecida, para a CCMA 0658 é uma boa produtora para celulase, mas não apresenta atividades tão semelhantes para xilanase.

Segundo Deschamps et al. (1882) duas espécies de *Bacillus* sp. apresentam padrões de atividades enzimáticas de acordo com: *Bacillus coagulans* (250 U/L) e *Bacillus pumilus*

(1250 U/L). Quando comparado com os valores para as atividades de xilanases oriundas de *Bacillus subtilis* conforme na Tabela 11, é possível observar uma enorme discrepância. Esse estudo apresentou valores cerca de 10^6 vezes menores, do que retratado na literatura. Algum fator desconhecido pode ter ocasionado inibição da atividade enzimática, a fisiologia do microrganismo pode ter influenciado ou até mesmo a concentração do indutor ter sido muito baixa.

Tabela 12. Atividade da manganês peroxidase em U/L por tempo, na ausência e presença de glicose.

| Tempo (h) | V(U/L) | VG(U/L) |
|-----------|--------|---------|
| 12 | 3,38 | -18,65 |
| 36 | 0,16 | 4,44 |
| 60 | -2,65 | -30,51 |
| 84 | 19,35 | -30,55 |

Legenda: V: meio acrescido de vermelho de fenol 0,1%; VG: Meio acrescido de glicose e vermelho de fenol ambos 0,1%.

Para a manganês peroxidase foram obtidas as atividades presentes na Tabela 12. Para o fator sem glicose a atividade máxima para enzima manganês peroxidase ocorreu as 84 h com 19,35 U/L, tendo anteriormente baixos valores ou valores negativos. É possível que algum fator desconhecido possa ter influenciado a inibição da enzima em questão.

No fator com glicose o único tempo que apresentou atividade enzimática foi as 36h com 4,44 U/L. Para manganês peroxidase, não existe curva padrão sendo considerado a atividade de MnP foi calculada com base na absortividade molar do vermelho de fenol oxidado (λ 610nm). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como 1 μ mol do produto formado por minuto, segundo equação 2 (KHINDARIA; GROVER; AUST, 1994; LUNDELL et al., 1990).

Oliveira (2008), retrata a atividade de *B. pumilus* e apresenta sua máxima atividade em 29,9 U/L, considerando que o experimento foi conduzido sem adição de glicose, os valores desta quantificação para MnP não se encontram discrepantes. Vale ressaltar que pela concentração do indutor utilizada ter sido baixa, valores menores para as atividades já são esperados.

4 CONCLUSÃO

Considerando todas as cepas e suas capacidades de produção enzimática, foi possível observar que CCMA 0658, apresentou uma melhor produção geral de enzimas em teste semiquantitativo realizado. Dessa forma, buscou-se então quantificar a suas produções enzimáticas, para uma análise mais exata do seu potencial industrial e biotecnológico.

Para quantificação dessa cepa, para a enzima a celulase foram observadas atividades enzimáticas, sendo o seu pico de produtividade no fator sem glicose as 36h com 0,4271 U/L e no fator com glicose as 12h com 0,2583 U/L. Para amilase ambos os fatores apresentaram produção. Na ausência de glicose o pico de produtividade ocorre as 36h com 0,00027 U/L e segue por uma fase de estabilização até as 60 h. No fator com glicose o pico também ocorre às 36 h com 0,00024 U/L, no entanto há um declínio na atividade enzimática até as 60h.

Para xilanase o fator sem glicose o máximo de produtividade ocorreu às 12 h com 0,000230 U/L e para o fator com glicose o máximo foi em 84h com 0,00012 U/L, sendo os valores não entrando em consenso do encontrado na literatura. Para manganês peroxidase com o fator sem glicose a atividade máxima para enzima ocorreu às 84 h com 19,35 U/L, tendo anteriormente baixos valores ou valores negativos. No fator com glicose o único tempo que apresentou atividade enzimática foi as 36h com 4,44 U/L.

Possivelmente valores baixos e em desconformidade com a literatura traduzem em uma baixa concentração de indutores utilizados. Dessa forma entende-se que seja necessário realizar tais análises com concentrações maiores como por exemplo de 1%.

5 BIBLIOGRAFIA

ALBAR, Rahmat et al. Analisis Potensi Enzim Xilanase sebagai Pemutih Kertas-Mini. In: **Prosiding Seminar Nasional Biologi**. 2022. p. 442-453.

ABREU, M. T. et al. Complexo enzimático à base de xilanase, β -glucanase e fitase em rações para poedeiras comerciais leves em pico de produção. **Boletim de Indústria Animal**, v. 75, 2018.

ALVES, Kessia Caroline Souza et al. Bacillus subtilis: uma versátil ferramenta biotecnológica. **Scientia Amazonia**, v. 7, n. 2, p. 15-23, 2018.

ALVES, Maurício Marcelino de Sousa et al. Potencial biotecnológico de bactérias e leveduras isoladas da casca do Coco-verde (Cocos Nucifera) em fermentação. 2017.

ARNAOUTELI, Sofia et al. Bacillus subtilis biofilm formation and social interactions. **Nature Reviews Microbiology**, v. 19, n. 9, p. 600-614, 2021.

BARBOSA, E. Dos S. et al. Vanillin production by phanerochaete chrysosporium grown on green coconut agro- industrial husk in solid state fermentation. **BioResources**, 2008. v. 3, n. 4, p. 1042–1050.

BARBOSA, I. M. V. et al. Otimização das condições da fermentação de soro para produção de probiótico de Lactobacillus acidophilus: condições de ph, tamanho do inóculo e concentração do soro no crescimento celular. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v. 1, n. 1, p. 639-644, 2014.

BAPTISTA, Sara Raquel Tavares. Síntese verde de corantes azo utilizando lacases. 2018. **Tese de Doutorado. Instituto Superior de Engenharia de Lisboa.**

BHARDWAJ, N; KUMAR, B; VERMA, P. A detailed overview of xylanases: anemerging biomolecule for current and future prospective. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 6, n. 1, p. 1-36, 2019.

BEHERA, B. C. et al. Microbial cellulases – Diversity & biotechnology with reference to mangrove environment: **A review. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 15, n. 1, p. 197–210, jun. 2017.

BENINCA, Cleoci et al. The thermal, rheological and structural properties of cassava starch granules modified with hydrochloric acid at different temperatures. **Thermochimica Acta**, v. 552, p. 65-69, 2013.

BERNAL, Suzan Prado Fernandes. **Avaliação do potencial Biotecnológico de bactérias e fungos isolados de uma estação de tratamento de Industria Têxtil**. 2020. Dissertação de Mestrado.

BOGAN, B.W., Lamar, R.T., 1995. One-electron oxidation in the 1352 degradation of creosote polycyclic aromatic hydrocarbons by 1353 *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 1354 2631–2635

CAO, Y.; TAN, H. Effects of cellulase on the modification of cellulose. *Carbohydrate Research*. v. 337, p. 1291-1296, 2002.

CARASCHI, José Cláudio; CAMPANA FILHO, Sérgio P. Influência do grau de substituição e da distribuição de substituintes sobre as propriedades de equilíbrio de carboximetilcelulose em solução aquosa. **Polímeros**, v. 9, p. 70-77, 1999.

CARVALHO, de Lara Thaís. O que são amilases? **Bioblog Novozymes**, 2020. Disponível em: <https://www.bioblog.com.br/o-que-sao-amilases/>. Acesso em : 10/08/2022.

CARVALHO, Jéssyca Ketterine et al. Isolamento e seleção de leveduras de ambiente continental lótico com capacidade de produção enzimática. 2020.

CAVACO-PAULO, Artur. Processing textile fibers with enzymes: an overview. 1998.

CERQUEIRA, Keilla Santos et al. Isolamento e seleção de microrganismos produtores de enzimas elulolíticas Isolation and selection of cellulolytic enzyme-producing microorganisms. **Brazilian Journal of Development**, v. 8, n. 4, p. 28693-28699, 2022.

CASTRO, A. M. DE; PEREIRA JUNIOR, N. Produção, propriedades e aplicação de celulasas na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 181-188, 2010.

CHAN, Anthony KN et al. Cloning and characterization of two novel β -glucosidase genes encoding isoenzymes of the cellobiase complex from *Cellulomonas biazotea*. **Gene**, v. 642, p. 367-375, 2018.

CHANDRA, R.; CHOWDHARY, P. Properties of bacterial laccases and their application in bioremediation of industrial wastes. **Environmental Science: Processes & Impacts**, 2015. v. 17, n. 2, p. 326–342.

COPINI, Daniele Vania. Peroxidases: obtenção, recuperação e aplicação na área ambiental. 2022.

COLLINS, T.; Gerday, C.; Feller, G; Xylanases, xylanases families and extremophilic xylanases. **FEMS Microbiology reviews** 29(3-23),2005.

COMPTON, Steve J.; JONES, Clive G. Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. **Analytical biochemistry**, v. 151, n. 2, p. 369-374, 1985.

COTTA, S. P. M. et al. Thermo-resistant enzyme-producing microorganisms isolated from composting. **Brazilian Journal of Biology**, v. 83, 2021.

CUI, W., Han, L., Suo, F., Liu, Z., Zhou, L., and Zhou, Z. Exploitation of *Bacillus subtilis* as a robust workhorse for production of heterologous proteins and beyond. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 34:145, 2018.

DANILOVA, Iuliia; SHARIPOVA, Margarita. The practical potential of bacilli and their enzymes for industrial production. **Frontiers in microbiology**, v. 11, p. 1782, 2020.

DE MELO, Thiago Anchieta et al. O gênero *Bacillus* aplicado ao controle biológico de doenças de plantas. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 9, p. e18110917817-e18110917817, 2021.

DE JESUS A, J. G. R., de Sousa Lessaa, G., Rodriguesa, T. B., Ferrão-Gonzalesa, A. D., Freire, E., Hannab, S. A., & Moreaua, V. H. **Diálogos & Ciência.**, 2013.

DE SOUZA OLIVEIRA, Ricardo Pinheiro. Purificação de enzimas e peptídeos antimicrobianos: suas aplicações. **Biotecnologia Industrial-Vol. 3: Processos fermentados e enzimáticos**, v. 3, p. 333, 2019.

DO NASCIMENTO, cleisy ferreira. utilização de extrato de aspergillusoryzae contendo alfa-amilase em dietas de confinamento para bovinos nellore. **Plataforma Sucupira**, 2018.

DUMON, C.; Song, L.; Bonzonnet, S.; Fauré, R.; O'Donohue, M.J;Progress and future prospective for pentose-specific biocatalysts in biorefining. *Process Biochemistry*, 2011.

DURÁN N., Esposito E., Appf. CatalysisB: **Environ.**; 714:1-17,2000.

ELLIAIAH, P.; ADINARAYANA, K.; BHAVANI, Y.; PADMAJA, P.; SRINIVASULU, B. Optimization of process parameters for glucoamylase production under solid state fermentation by a newly isolated Aspergillus species. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 615-620, 2002.

ELLIAIAH, P.; PRABHAKAR, T.; RAMAKRISHNA, B.; THAER TALEB, A.; ADINARAYANA, K. Production of lipase by immobilized cells of Aspergillus niger.**Process Biochemistry**, London, v. 39, n. 5, p. 525-528, jan. 2004.

FALADE, A. O. et al. Lignin peroxidase functionalities and prospective applications. *MicrobiologyOpen*, fev. 2017. v. 6, n. 1, p. e00394.

FEITOSA, I. C. Produção de enzimas lipolíticas utilizando bactéria isolada de solo com histórico de contato com petróleo em fermentação submersa. 2009. 104 f. **Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos) – Universidade Tiradentes**, Aracaju, 2009.

FERREIRA, Daniel Furtado. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. **Reunião anual da região brasileira da sociedade internacional de biometria**, v. 45, n. 2000, p. 235, 2000.

FERNANDES, A. P. Avaliação do potencial enzimático de fungos filamentosos isolados de diferentes fontes. **Lavras: Curso de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos–UFLA**, 2009.

GHOSE, T.K. Measurement of cellulase activities. **Pure and Applied Chemistry**, v. 59, p. 257-268, 1987.

GIANFREDA, Liliana; XU, Feng; BOLLAG, Jean-Marc. Laccases: a useful group of oxidoreductive enzymes. **Bioremediation Journal**, v. 3, n. 1, p. 1-26, 1999.

GUPTA, R; GIGRAS, P.; HARAPRYA, M.; GOSWAMIR, V, K; CHAUHAN, B; Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. **Process biochemistry** v.38, p. 1599-1616, 2003.

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

HECK, Júlio X.; HERTZ, Plinho F.; AYUB, Marco AZ. Cellulase and xylanase productions by isolated Amazon Bacillus strains using soybean industrial residue based solid-state cultivation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, p. 213-218, 2002.

HIGUCHI, T. Lignin biochemistry: biosynthesis and biodegradation. **Wood Science and Technology**, v. 24, n. 1, p. 23-63, 1990.

HUANG, Jiaofang et al. Programmable and printable Bacillus subtilis biofilms as engineered living materials. **Nature chemical biology**, v. 15, n. 1, p. 34-41, 2019.

JESUS, J. G. R. et al. Seleção e identificação de micro-organismos produtores de amilases isolados da microbiota associada a resíduos agrícolas de cacau e dendê. **Diálogos & Ciência**, v. 11, n. 33, p. 7-12, 2013.

JOHANSSON, T., Nyman, P.O., Cullen, D., 2002. Differential regulation 1653 of *mnp2*, a new manganese peroxidase-encoding Gene from the 1654 ligninolytic fungus *Trametes versicolor* PRL 572. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 2077–2080.

LEE, Jong-Un; FEIN, Jeremy B. Experimental study of the effects of *Bacillus subtilis* on gibbsite dissolution rates under near-neutral pH and nutrient-poor conditions. **Chemical Geology**, v. 166, n. 3-4, p. 193-202, 2000.

LEISOLA, M.S., Kozulic, B., Meussdoerffer, F., Fiechter, A., 1987. 1713 Homology among multiple extracellular peroxidases from 1714 *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Biol. Chem.* 262, 419–424.

Li, K.; Azadi, P.; Collins, R.; Tolan, J.; Kim, J.S.; Eriksson, Karl-Erik, L. Relationships between activities of xylanases and xylan structures. *Enzyme Microb Technol.* v. 27, p.89-94, 2000.

LIMA, Janaina de Souza et al. Imobilização de celulase em caulim e sua aplicação em processos de acabamento têxtil. 2020.

LUNDELL, T. et al. Formation and action of lignin-modifying enzymes in cultures of *Phlebia radiata* supplemented with veratric acid. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, p. 2623-2629, 1990.

KARMAKAR, M.; RAY, R. R. Current trends in research and application of microbial cellulases. *Research Journal of Microbiology*, v. 6, p. 41-53, 2011.

KHINDARIA, A., GROVER, T.A.; AUST, S.D. Oxalate-dependent reductive activity of Manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 314, p. 301-306, 1994.

KUMAR, A.; CHANDRA, R. Ligninolytic enzymes and its mechanisms for degradation of lignocellulosic waste in environment. **Heliyon**, fev. 2020. v. 6, n. 2, p. e03170.

KNOWLES, Jonathan; LEHTOVAARA, Päivi; TEERI, Tuula. Cellulase families and their genes. **Trends in Biotechnology**, v. 5, n. 9, p. 255-261, 1987.

KOLENOVÁ, K.; Vršanská, M.; Biely, P.; Mode of action of endo- β -1,4-xylanases of families 10 and 11 on acidic xylooligosaccharides **J. Biotechnol.** 121 (338-345),2006.

KOVÁCS, Ákos T. Bacillus subtilis. **Trends in Microbiology**, v. 27, n. 8, p. 724-725, 2019.

MAIA, Patricia Cristina de Veras Souza et al. Production of biosurfactant by Bacillus subtilis UCP 0999 using cassava wastewater (CWW) and waste frying oil (WFO) as renewable substrates. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 6, p. e17011628805-e17011628805, 2022.

MARROQUES, Julia Cruz et al. Aplicação de enzimas na indústria têxtil. **Repositório UFU**, 2020.

MARTINI, Giulia Valar et al. Clarificação de mostos base para espumante usando lacase como agente de clarificação seletiva. 2020.

MARTINS, Alex Gabriel Rodrigues et al. Utilização de resíduos agroindustriais para produção de tanase por Aspergillus sp isolado do solo da caatinga de Pernambuco, Brasil. **e-xacta**, v. 7, n. 1, p. 95-103, 2014.

MAYER, Alfred M.; STAPLES, Richard C. Laccase: new functions for an old enzyme. **Phytochemistry**, v. 60, n. 6, p. 551-565, 2002.

MEAGHER, M.M.; Tao, B. Y.; Chow, J.M.; Reilly, P.J. kinetics and subsite mapping of a Dxylobiose and D-xylose producing Aspergillus niger endo-(1,4)- β -D-xylanase. **Carbohydrate Research**. v. 173, p. 273-283, 1988.

MIENDA, B. S., Yahya, A., Galadima, I. A., and Shamsir, M. S. An overview of microbial proteases for industrial applications. *Res. J. Pharm. Biol. Chem. Sci.* 5, 388–396, 2014.

MILLER G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, v. 31, p. 426, 1959.

MONTEIRO, V. N., & Silva, R. do N. Aplicações Industriais da Biotecnologia Enzimática. *Revista Processos Químicos*, 3(5), 9-23, 2009.

MUNHOZ, Mariane Daniele. Enzimas: da obtenção a aplicação. **Laboratório de bioquímica de alimentos**, 2020. Disponível em: www.bioquimicadealimentosunicamp.com/post/enzimas-da-obtenção-à-aplicação. Acesso em: 09/08/2022.

OLIVEIRA, Patricia Lopes de. Purificação e caracterização bioquímica de manganês peroxidase de *Bacillus pumilus* e *Paenibacillus* sp. e sua atuação na remoção da cor do efluente da indústria papelreira. São Paulo, Brasil, 69 p. **São Paulo, Brasil:(M. Sc. Dissertation. Faculdade de Engenharia de Alimentos. UNICAMP)**, p. 69, 2008.

ORLANDELLI, Ravelly Casarotti et al. Enzimas de interesse industrial: produção por fungos e aplicações. *SaBios-Revista de Saúde e Biologia*, v. 7, n. 3, 2012.

PASZCZYŃSKI, Andrzej; HUYNH, Van-Ba; CRAWFORD, Ronald. Enzymatic activities of an extracellular, manganese-dependent peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *FEMS Microbiology Letters*, v. 29, n. 1-2, p. 37-41, 1985.

PANDEY, A; NIGAM, P.; SOCCOL, C. R.; SOCCOL, V. T.; SINGH, D.; MOHAN, R. Advances in microbial amylases: review. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, v. 31, p. 135-152, 2000b.

PERALTA-ZAMORA, P. et al. Remediação de efluentes derivados da indústria de papel e celulose: tratamento biológico e fotocatalítico. *Química Nova*, abr. 1997. v. 20, n. 2, p. 186–190.

PETERS, R., Textile Chemistry, **Elsevier Ed.**, Amsterdam, London, New York, Vol.1-2, 1963.

PRADE, R. Xylanases: from biology and biotechnology. *Biotechnology & Genetic Engineering Reviews*, Newcastle Upon Tyne, v.13, p. 101-131, 1996.

POLIZELI M.L.T.M.; Pizzatti A.C.S.; Monti, R.; Terenzi, H.F.; Jorge, J.A.; Amorim, J.D.S; Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Appl.Microbiol.Biotechnol.** 67(577-591),2005.

REAÇÃO KEGG 00011, KEEG, disponível em: <https://www.kegg.jp/entry/R00011>, acesso em: 16/08/2022.

RIBEIRO, Bruna Catarina et al. Isolamento e seleção de micro-organismos produtores de enzimas de interesse comercial. **Scientia Plena**, v. 14, n. 2, 2018.

RODRIGUES, A. M.; SANTANA, E. S. Efeito do cloreto de sódio na produção de proteínas (*Saccharomyces cerevisiae*) em fermentação semi-sólida. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 21, n.1, p. 57-62, jan./abr. 2001.

RODRIGUES, Eliana Maria Gonçalves. Produção de amilase por fermentação em estado sólido utilizando o fungo *Aspergillus niger* e determinação do pH e temperatura ótimos na atividade enzimática. **Bioenergia em Revista: Diálogos (ISSN: 2236-9171)**, v. 12, n. 1, p. 08-20, 2022.

ROMEIRO, R. D. S. Controle biológico de doenças de plantas: fundamentos. **Universidade Federal de Viçosa**, 2007.

SÁ, ALB; DIAS, ACF; DE MELO, I. S. Atividade celulolítica de rizobactérias associadas a *Rhizophora mangle*. 2007.

SAMPAIO, Liliana MP et al. Laccase immobilization on bacterial nanocellulose membranes: Antimicrobial, kinetic and stability properties. **Carbohydrate polymers**, v. 145, p. 1-12, 2016.

SANCHEZ, S.; DEMAIN, A. L. Useful Microbial Enzymes: An Introduction. **Biotechnology of Microbial Enzymes**, 2017.

SANDHYA, C.; SUMANTHA, A.; SZAKACS, G.; PANDEY, A. Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2689–2694, 2005.

SANTOS, Bianca de Melo Silveira dos. Estudo da variabilidade de bactérias promotoras de crescimento de plantas da espécie *Bacillus Subtilis*. **Repositório UNESP**, 2021.

SHATAEVA, L. K., Orlievskaia, O. V., Chichkovskaia, G. V., and Samsonov, G. V. Enzymatic activity of terrilytin. **Biokhimiia** 38, 1169–1174, 1973.

SILVA, C. S.; Durão, P.; Fillat, A.; Lindley, P. F.; Martins, L. O.; Bento, I. **Metallomics** 2012, 4 (1), 37–47.

SILVA, Isadora Ferreira da. Produção de amilase por *Bacillus amyloliquefaciens* utilizando torta de macaúba (*Acrocomia aculeata*) e farinha de pupunha (*Bactris gasipaes*) como substratos. **Repositório ufvm**, 2012.

SILVAGGI, J.M., D.L. Popham, A. Driks, P. Eichenberger, and R. Losick.. Unmasking novel sporulation genes in *Bacillus subtilis*. **J. Bacteriol.**, 186:8089–8095, 2004.

SILVA NETO, Mario Pereira da. Expressão heteróloga e caracterização bioquímica de amilases putativas de bactérias termófilas. **Repositório unb**, 2020.

SOCCOL, Carlos Ricardo. Physiologie et métabolisme de *Rhizopus* en culture solide et submergée en relation avec la dégradation d'amidon cru et la production d'acide L (+) lactique. **Tese de Doutorado. Compiègne**, 1992.

SRIVASTAVA, N; SRIVASTAVA, M; MISHRAB, P. K.; GUPTAD, V. K.; MOLINA, G.; RODRIGUEZ-COUTO, S.; MANIKANTA, A; RAMTEKE, P. W. Applications

of fungal cellulases in biofuel production: Advances and limitations. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v.82, p. 2379–2386, 2018.

SULYMAN, A. O.; IGUNNU, A.; MALOMO, S. O. Isolation, purification and characterization of cellulase produced by *Aspergillus niger* cultured on *Arachis hypogaea* shells. *Heliyon*, v. 6, 2020

TEN HAVE, R., Teunissen, P.J.M., 2001. Oxidative mechanisms involved in lignin degradation by white-rot fungi. *Chem. Rev.* 101, 3397–341

TIEN, M., Kirk, T.K., 1983. Lignin-degrading enzyme from the 1964 hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium* Burds. *Science* 1965 (Washington) 221, 661–662

TORRES, Bruno Henrique Czelusniak et al. **Degradação de cafeína por lacase de *Trametes villosa***. 2021. Dissertação de Mestrado. Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10 ed. Porto Alegre: Artmed, 2012, cap. 6: Crescimento microbiano, p. 156-174.

VENENCIO, Gaspar. Utilização de amilases em pão de forma branco de trigo: tendências e perspectivas em um mundo pós-pandêmico. **Repositório uninter**, 2022.

VERMA, N.; KUMAR, V.; BANSAL, M. C. Utility of *Luffa cylindrica* and *Litchi chinensis* peel, an agricultural waste biomass in cellulase production by *Trichoderma reesei* under solid state cultivation. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 16, p. 483-492, 2018.

VILELA, Paulo Roberto Chiarolanza. **Modelagem, simulação e otimização dinâmica aplicada a um processo de fermentação alcoólica em batelada alimentada**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 2015

VINIEGRA-GONZÁLEZ, G.; FAVELA-TORRES, E.; AGUILAR, C. N.; RÓMERO-GOMES, S. J.; DÍAZ-GODÍNEZ, G.; AUGUR, C. Advantages of fungal enzyme production in

solid state over liquid fermentation systems. **Biochemical Engineering Journal**, v. 3643, p. 1-11, 2002.

WANDERLEY, Marcel Duarte; NEVES, Etney; ANDRADE, Cristiano José de. Aspectos da produção industrial de enzimas. **Revista Citino**, v. 1, n. 1, p. 44-50, 2011.

WOICIECHOWSKI, A. L. Bioconversão de hidrolisado hemicelulósico de Pinus taeda obtido pelo processo de explosão a vapor, na produção de ácido L [+] láctico pelo fungo *Rhizopus oryzae*. 1997. 101 f. **Dissertação (Mestrado em Tecnologia Química) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1997.**

ZAKRZEWSKI, Mariana Balvedi. Propriedades e autocicatrização do bioconcreto por meio da incorporação de bactérias do gênero *Bacillus subtilis* encapsuladas em argila expandida. **Repositório institucional da universidade fronteira do sul**, 2022.

ZHANG, Y.H.P.; HIMMEL, M.E.; MIELENZ, J.R. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. *Biotechnology Advances*, v. 24, n.5, p. 452-481, 2006.