

Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Bianca Aguiar Alves

Bioprospecção de bactérias produtoras de enzimas de interesse biotecnológico

Uberaba, MG

2018

Bianca Aguiar Alves

Bioprospecção de bactérias produtoras de enzimas de interesse biotecnológico

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas - Área de concentração: Parasitologia, Imunologia e Microbiologia.

Orientador: Profa. Dra. Aline Dias Paiva

Uberaba, MG

2018

Catálogo na fonte: Biblioteca da Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Alves, Bianca Aguiar  
A477b            Bioprospecção de bactérias produtoras de enzimas de interesse  
bio-                tecnológico / Bianca Aguiar Alves. -- 2018.    159 f. : il., fig.,  
graf., tab.

Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) -- Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2018  
Orientadora: Profa. Dra. Aline Dias Paiva

1. Bioprospecção. 2. *Bacillus* - Atividade enzimática. 3. Glicosídeo hidrolases. 4. Monoacilglicerol lipases. I. Paiva, Aline Dias. II. Universidade Federal do Triângulo Mineiro. III. Título.

CDU 579.6

BIANCA AGUIAR ALVES

**BIOPROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS PRODUTORAS DE ENZIMAS DE  
INTERESSE BIOTECNOLÓGICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, área de concentração II: Parasitologia, Imunologia e Microbiologia, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre (a) em Ciências Fisiológicas.

Aprovado em: 21 de junho de 2018 .

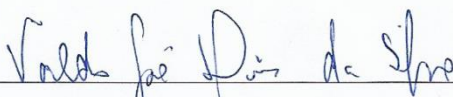
BANCA EXAMINADORA



Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Aline Dias Paiva – Orientadora  
Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM)



Prof. Dr.<sup>a</sup> Alessandra Barbosa Ferreira Machado  
Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM)



10/ Prof. Dr. Daniel Bonoto Gonçalves  
Universidade Federal de São João Del-Rei (UFSJ)

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por sempre guiar meu caminho e enviar as pessoas certas em cada momento da minha vida.

Aos meus pais Marisa e Emanuel, meus irmãos Bruno e Breno, e meu avô Mário, pelo incentivo, suporte e amor incondicional. Assim como toda minha família e amigos: obrigada pelo apoio!

À minha orientadora Aline Dias Paiva, por ter acreditado em mim e me dado a oportunidade de desenvolver um projeto maravilhoso. Muito obrigada pelo carinho, amizade, conversas, risadas e ensinamentos ao longo desses dois anos. Em você encontrei três qualidades que considero fundamentais na pesquisa: excelente professora, admirável orientadora e um ótimo ser humano. Fico muito feliz de ter cumprido essa etapa da minha vida ao seu lado!

À Universidade Federal do Triângulo Mineiro, pela oportunidade de vivenciar o ensino e a pesquisa.

À CAPES, pela concessão da bolsa.

Ao programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas e aos professores do programa, pela oportunidade de aprendizado e desenvolvimento profissional. Em especial à Bete, secretária do programa, por sempre nos ajudar em nossas dúvidas e problemas.

Aos alunos e colegas da Pós-Graduação, pela convivência e companheirismo.

À Professora Alessandra Barbosa Ferreira Machado, que foi praticamente uma co-orientadora para mim. Obrigada pela amizade, conversas, ensinamentos e toda sua ajuda com o projeto.

Aos demais professores do Laboratório de Microbiologia, Adriana Gonçalves de Oliveira e Anderson Assunção Andrade, pelo convívio e ensinamentos.

À todos os amigos do Laboratório de Microbiologia, em especial Aline, Amanda, Beatriz, Diego, Estela, Fábio, Fernanda, Isabela Rotta, Jacqueline, Jéssica Campos, Jéssica Lee, Luciano, Luíza, Mayra e Vinícius. Muito obrigada pelo convívio, amizade, risadas e ajuda nessa jornada.

À Luciene, técnica do Laboratório de Microbiologia, pela ajuda, amizade, almoços e risadas.

E aos demais colegas do Laboratório de Microbiologia, Kelly, Sueli, Sônia, Celso e Miguela, pelas conversas, risadas e amizade.

## RESUMO

Os microrganismos apresentam grande diversidade metabólica, sendo capazes de produzir diferentes metabólitos de interesse biotecnológico. Dentre tais compostos, podemos destacar as enzimas, as quais possuem grande versatilidade de aplicação em diversos setores industriais, como farmacêutico, ambiental, bioenergia, têxtil, cosmético e alimentício. O solo representa um ambiente ideal para bioprospecção de microrganismos produtores de enzimas devido à grande biodiversidade microbiana naturalmente existente. Esse trabalho descreve o isolamento de bactérias produtoras de celulases, amilases, xilanases ou lipases, a partir de amostras de solo coletadas em regiões de mata preservada no bioma Cerrado, em Uberaba, MG. A atividade enzimática foi confirmada em 85 das 376 bactérias isoladas em meios contendo quatro diferentes substratos, carboximetilcelulose, amido, xilano e tween 80. Baseado na quantificação enzimática, cinco linhagens foram selecionadas como melhores produtores de celulases (AB-9 (5,0 U/mL), AB-1 (4,630 U/mL), MB-3 (4,236 U/mL), MP-7 (4,282 U/mL) e ME-2 (4,444 U/mL)), cinco de amilases (AP-14 (2,506 U/mL), AE-2 (2,452 U/mL), MB-1 (1,417 U/mL), MB-18 (2,443 U/mL) e MB-22 (1,816 U/mL)), cinco de xilanases (AP-6 (5,093 U/mL), MP-9 (5,028 U/mL), ME-1 (2,870 U/mL), ME-16 (2,986 U/mL) e ME-20 (4,630 U/mL)) e cinco de lipases (AB-2 (10,064 U/mL), AB-3 (9,722 U/mL), AP-4 (2,934 U/mL), MB-7 (2,387 U/mL) e MB-4 (3,140 U/mL)). De acordo com o sequenciamento parcial do gene 16S RNAr, dos 20 isolados selecionados como melhores produtores de enzimas, 19 pertencem ao gênero *Bacillus* e um pertence ao gênero *Lysinibacillus*. Além disso, 10 espécies distintas foram identificadas, compreendendo *B. siamensis*, *B. toyonensis*, *B. methylotrophicus*, *B. pseudomycooides*, *B. thuringiensis*, *B. drentensis*, *B. subtilis*, *B. velezensis*, *L. macroides* e *B. wiedmannii*. A caracterização parcial das enzimas resultou em grande diversidade. Celulases de *B. methylotrophicus* MP-7 e *B. methylotrophicus* MB-3 apresentaram máxima atividade em pH neutro (7 e 8), enquanto o extrato obtido a partir de *B. toyonensis* MB-1 mostrou alta atividade amilolítica em pH neutros a básicos (6-10). O isolado celulolítico *B. siamensis* AB-9 e o amilolítico *B. methylotrophicus* AP-14, bem como os isolados xilanolíticos e lipolíticos produziram enzimas com máxima atividade em todos os pHs avaliados (2-12). Em relação à temperatura, *B. drentensis* ME-2 apresentou alta atividade celulolítica a 60 °C, mesma temperatura ótima para amilases de *B. methylotrophicus* AP-14, *B. subtilis* AE-2, *B. toyonensis* MB-18 e *B. pseudomycooides* MB-22. *B. toyonensis* MB-1 apresentou máxima atividade amilolítica entre 40-70 °C; e os demais isolados apresentaram atividade enzimática máxima em todas as temperaturas avaliadas (10-80 °C). Apenas as xilanases produzidas por *B. toyonensis* MP-9 foram induzidas na presença de Fe<sup>2+</sup>, sendo as demais atividades enzimáticas não influenciadas pela presença de íons metais. O Cerrado é um bioma que abriga grande diversidade microbiana e esse estudo foi o primeiro passo para a exploração do potencial enzimático de bactérias de solo do Cerrado brasileiro.

**Palavras-chave:** bioprospecção, *Bacillus*, *Lysinibacillus*, atividade enzimática, glicosilhidrolases, lipases.

## ABSTRACT

The microorganisms show great metabolic diversity, being able to produce different metabolites of biotechnological interest. Among these compounds, we can highlight the enzymes, which have great versatility of application in various industrial sectors, such as pharmaceutical, environmental, bioenergy, textile, cosmetic and food. The soil represents an ideal environment for bioprospecting of enzyme-producing microorganisms due to the great microbial biodiversity naturally existent. This work describes the isolation of cellulase, amylase, xylanase or lipase producing bacteria from soil samples collected in regions of preserved forest in the Cerrado biome, in Uberaba, MG. The enzymatic activity was confirmed in 85 of the 376 bacteria isolated in agar media containing four different substrates, carboxymethylcellulose, starch, xylan and tween 80. Based on the enzymatic quantification, five strains were selected as the best producers of cellulases (AB-9 (5.0 U/mL), AB-1 (4.630 U/mL), MB-3 (4.236 U/mL), MP-7 (4.282 U/mL) and ME-2 (4.444 U/mL)), five of amylases (AP-14 (2.506 U/mL), AE-2 (2.452 U/mL), MB-1 (1.417 U/mL), MB-18 (2.443 U/mL) and MB-22 (1.816 U/mL)), five of xylanases (AP-6 (5.093 U/mL), MP-9 (5.028 U/mL), ME-1 (2.870 U/mL), ME-16 (2.986 U/mL) and ME-20 (4.630 U/mL)), and five of lipases (AB-2 (10.064 U/mL), AB-3 (9.722 U/mL), AP-4 (2.934 U/mL), MB-7 (2.387 U/mL) and MB-4 (3.140 U/mL)). According to the partial sequencing of the 16S rRNA gene, of the 20 isolates selected as the best producers of enzymes, 19 belong to the genus *Bacillus*, and one belongs to the genus *Lysinibacillus*. In addition, 10 distinct species were identified, comprising *B. siamensis*, *B. toyonensis*, *B. methylotrophicus*, *B. pseudomycooides*, *B. thuringiensis*, *B. drentensis*, *B. subtilis*, *B. velezensis*, *L. macroides* and *B. wiedmannii*. The partial characterization of the enzymes resulted in great enzymatic diversity. Cellulases of *B. methylotrophicus* MP-7 and *B. methylotrophicus* MB-3 showed maximum activity at neutral pH (7 and 8), while *B. toyonensis* MB-1 showed high amylolytic activity at neutral to basic pH (6-10). The cellulolytic isolate *B. siamensis* AB-9 and amylolytic *B. methylotrophicus* AP-14, along with the other xylanolytic and lipolytic isolates produced enzymes with maximum activity over the entire pH range evaluated (2-12). Regarding the temperature, *B. drentensis* ME-2 showed high cellulolytic activity at 60 °C, the same optimum temperature for amylases of *B. methylotrophicus* AP-14, *B. subtilis* AE-2, *B. toyonensis* MB-18 and *B. pseudomycooides* MB-22. *B. toyonensis* MB-1 showed maximum amylolytic activity in the range of 40-70 °C; and the other isolates showed maximum enzymatic activity at all evaluated temperatures (10-80 °C). Only the xylanases produced by *B. toyonensis* MP-9 were induced in the presence of Fe<sup>2+</sup>, and the other enzymatic activities were not influenced by the presence of metal ions. The Cerrado is a reservoir of microbial diversity and this study was the first step for the exploration of the enzymatic potential of soil bacteria from Brazilian Cerrado.

**Keywords:** bioprospecting, *Bacillus*, *Lysinibacillus*, enzymatic activity, glycosylhydrolases, lipases.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> - Hidrólise da ligação peptídica. ....	7
<b>Figura 2</b> - Subgrupos de celulases envolvidas na hidrólise da celulose. ....	9
<b>Figura 3</b> - Tipos de amilases envolvidas na hidrólise do amido.....	11
<b>Figura 4</b> - Subgrupos de xilanases envolvidas na hidrólise do xilano.....	14
<b>Figura 5</b> - Hidrólise de triacilglicerol. ....	16
<b>Figura 6</b> – Etapas dos experimentos realizados.....	19
<b>Figura 7</b> - Bactérias produtoras de enzimas extracelulares de interesse biotecnológico, isoladas a partir de amostras de solo preservado no bioma Cerrado, na cidade de Uberaba, MG. A atividade enzimática foi confirmada através da formação de zonas de hidrólise ao redor das colônias bacterianas após cultivo em meio ágar CMC (A), ágar amido (B), ágar xilano (C) e ágar tween 80 (D), para detectar a produção de celulases, amilases, xilanases e lipases, respectivamente. ....	29
<b>Figura 8</b> - Atividade enzimática dos isolados celulolíticos, após 72 h de crescimento bacteriano. O ensaio enzimático foi realizado em meio líquido, utilizando CMC como substrato, e a atividade foi expressa em U/mL. Os resultados mostram a média das análises em triplicata e as barras de erro indicam $\pm$ desvio padrão das médias.....	34
<b>Figura 9</b> - Atividade enzimática dos isolados amilolíticos, após 48 ou 72 h de crescimento bacteriano. O ensaio enzimático foi realizado em meio líquido, utilizando amido como substrato, e a atividade foi expressa em U/mL. Os resultados mostram a média das análises em triplicata e as barras de erro indicam $\pm$ desvio padrão das médias.....	36
<b>Figura 10</b> - Atividade enzimática dos isolados xilanolíticos, após 48 h de incubação. O ensaio enzimático foi realizado em meio líquido, utilizando xilano como substrato, e a atividade foi expressa em U/mL. Os resultados mostram a média das análises em triplicata e as barras de erro indicam $\pm$ desvio padrão das médias.....	38
<b>Figura 11</b> - Atividade enzimática dos isolados lipolíticos, após 72 h de incubação. O ensaio enzimático foi realizado em meio líquido, utilizando pNPP como substrato, e a atividade foi expressa em U/mL. Os resultados mostram a média das análises em triplicata e as barras de erro indicam $\pm$ desvio padrão das médias.....	40
<b>Figura 12</b> - Árvore filogenética molecular de bactérias celulolíticas isoladas de amostras de solo preservado do bioma Cerrado. A árvore foi baseada na sequência parcial do gene 16S RNAr e reconstruída com o programa MEGA 7.0, utilizando o método de Máxima Verosimilhança baseado no modelo Kimura 2-parâmetros. A medida do comprimento dos	



ramos indica o número de substituições por sítio e a confiabilidade foi avaliada com *bootstrap* de 1000 repetições. *Brevibacillus brevis* YNP-1 foi utilizado como grupo externo. A escala indica o número de substituições por sítio..... 42

**Figura 13** - Árvore filogenética molecular de bactérias amilolíticas isoladas de amostras de solo preservado do bioma Cerrado. A árvore foi baseada na sequência parcial do gene 16S RNAr e reconstruída com o programa MEGA 7.0, utilizando o método de Máxima Verossimilhança baseado no modelo Kimura 2-parâmetros. A medida do comprimento dos ramos indica o número de substituições por sítio e a confiabilidade foi avaliada com *bootstrap* de 1000 repetições. *Brevibacillus brevis* YNP-1 foi utilizado como grupo externo. A escala indica o número de substituições por sítio..... 44

**Figura 14** - Árvore filogenética molecular de bactérias xilanolíticas isoladas de amostras de solo preservado do bioma Cerrado. A árvore foi baseada na sequência parcial do gene 16S RNAr e reconstruída com o programa MEGA 7.0, utilizando o método de Máxima Verossimilhança baseado no modelo Kimura 2-parâmetros. A medida do comprimento dos ramos indica o número de substituições por sítio e a confiabilidade foi avaliada com *bootstrap* de 1000 repetições. *Brevibacillus brevis* YNP-1 foi utilizado como grupo externo. A escala indica o número de substituições por sítio..... 46

**Figura 15** - Árvore filogenética molecular de bactérias lipolíticas isoladas de amostras de solo preservado do bioma Cerrado. A árvore foi baseada na sequência parcial do gene 16S RNAr e reconstruída com o programa MEGA 7.0, utilizando o método de Máxima Verossimilhança baseado no modelo Kimura 2-parâmetros. A medida do comprimento dos ramos indica o número de substituições por sítio e a confiabilidade foi avaliada com *bootstrap* de 1000 repetições. *Brevibacillus brevis* YNP-1 foi utilizado como grupo externo. A escala indica o número de substituições por sítio. .... 48

**Figura 16** - Árvore filogenética molecular das bactérias produtoras de enzimas de interesse biotecnológico, isoladas de amostras de solo preservado do bioma Cerrado. A árvore foi baseada na sequência parcial do gene 16S RNAr e reconstruída com o programa MEGA 7.0, utilizando o método de Máxima Verossimilhança baseado no modelo Kimura 2-parâmetros. A medida do comprimento dos ramos indica o número de substituições por sítio e a confiabilidade foi avaliada com *bootstrap* de 1000 repetições. *Brevibacillus brevis* YNP-1 foi utilizado como grupo externo. A escala indica o número de substituições por sítio..... 49

**Figura 17** - Efeito do pH (2-12) sobre a atividade celulolítica (U/mL) de extratos enzimáticos obtidos a partir de bactérias celulolíticas isoladas de solo preservado no bioma cerrado. (A) *B. siamensis* AB-9; (B) *B. toyonensis* AB-1; (C) *B. methylotrophicus* MP-7; (D) *B.*

*methylophilus* MB-3; (E) *B. drentensis* ME-2. Os resultados mostram a média de duplicatas biológicas e as barras de erro indicam  $\pm$  o desvio padrão das médias. Asteriscos indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ); quanto maior o número de asteriscos, maior a diferença estatística em relação à máxima atividade enzimática. .... 53

**Figura 18** - Efeito da temperatura (10-80 °C) sobre a atividade celulolítica (U/mL) de extratos enzimáticos obtidos a partir de bactérias celulolíticas isoladas de solo preservado no bioma cerrado. (A) *B. siamensis* AB-9; (B) *B. toyonensis* AB-1; (C) *B. methylophilus* MP-7; (D) *B. methylophilus* MB-3; (E) *B. drentensis* ME-2. Os resultados mostram a média de duplicatas biológicas e as barras de erro indicam  $\pm$  o desvio padrão das médias. Asteriscos indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ); quanto maior o número de asteriscos, maior a diferença estatística em relação à máxima atividade enzimática. .... 55

**Figura 19** - Efeito de íons metálicos ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  e  $\text{Fe}^{2+}$ ; 5 mM) sobre a atividade celulolítica (U/mL) de extratos enzimáticos obtidos a partir de bactérias celulolíticas isoladas de solo preservado no bioma cerrado. (A) *B. siamensis* AB-9; (B) *B. toyonensis* AB-1; (C) *B. methylophilus* MP-7; (D) *B. methylophilus* MB-3; (E) *B. drentensis* ME-2. Os resultados mostram a média de duplicatas biológicas e as barras de erro indicam  $\pm$  o desvio padrão das médias. Asteriscos indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ); quanto maior o número de asteriscos, maior a diferença estatística em relação à máxima atividade enzimática. .... 56

**Figura 20** - Efeito do pH (2-12) sobre a atividade amilolítica (U/mL) de extratos enzimáticos obtidos a partir de bactérias amilolíticas isoladas de solo preservado no bioma cerrado. (A) *B. methylophilus* AP-14; (B) *B. subtilis* AE-2; (C) *B. toyonensis* MB-1; (D) *B. toyonensis* MB-18; (E) *B. pseudomycooides* MB-22. Os resultados mostram a média de duplicatas biológicas e as barras de erro indicam  $\pm$  o desvio padrão das médias. Asteriscos indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ); quanto maior o número de asteriscos, maior a diferença estatística em relação à máxima atividade enzimática .... 58

**Figura 21** - Efeito da temperatura (10-80 °C) sobre a atividade amilolítica (U/mL) de extratos enzimáticos obtidos a partir de bactérias amilolíticas isoladas de solo preservado no bioma cerrado. (A) *B. methylophilus* AP-14; (B) *B. subtilis* AE-2; (C) *B. toyonensis* MB-1; (D) *B. toyonensis* MB-18; (E) *B. pseudomycooides* MB-22. Os resultados mostram a média de duplicatas biológicas e as barras de erro indicam  $\pm$  o desvio padrão das médias. Asteriscos indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ); quanto maior o número de asteriscos, maior a diferença estatística em relação à máxima atividade enzimática. .... 60

**Figura 22** - Efeito de íons metálicos ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  e  $\text{Fe}^{2+}$ ; 5 mM) sobre a atividade amilolítica (U/mL) de extratos enzimáticos obtidos a partir de bactérias amilolíticas isoladas de solo preservado no bioma cerrado. (A) *B. methylotrophicus* AP-14; (B) *B. subtilis* AE-2; (C) *B. toyonensis* MB-1; (D) *B. toyonensis* MB-18; (E) *B. pseudomycoides* MB-22. Os resultados mostram a média de duplicatas biológicas e as barras de erro indicam  $\pm$  o desvio padrão das médias. Asteriscos indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ); quanto maior o número de asteriscos, maior a diferença estatística em relação à máxima atividade enzimática.

..... 61

**Figura 23** - Efeito do pH (2-12) sobre a atividade xilanolítica (U/mL) de extratos enzimáticos obtidos a partir de bactérias xilanolíticas isoladas de solo preservado no bioma cerrado. (A) *B. velezensis* AP-6; (B) *B. toyonensis* MP-9; (C) *B. thuringiensis* ME-1; (D) *B. pseudomycoides* ME-16; (E) *B. thuringiensis* ME-20. Os resultados mostram a média de duplicatas biológicas e as barras de erro indicam  $\pm$  o desvio padrão das médias. Asteriscos indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ); quanto maior o número de asteriscos, maior a diferença estatística em relação à máxima atividade enzimática. .... 63

**Figura 24** - Efeito da temperatura (10-80 °C) sobre a atividade xilanolítica (U/mL) de extratos enzimáticos obtidos a partir de bactérias xilanolíticas isoladas de solo preservado no bioma cerrado. (A) *B. velezensis* AP-6; (B) *B. toyonensis* MP-9; (C) *B. thuringiensis* ME-1; (D) *B. pseudomycoides* ME-16; (E) *B. thuringiensis* ME-20. Os resultados mostram a média de duplicatas biológicas e as barras de erro indicam  $\pm$  o desvio padrão das médias. Asteriscos indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ); quanto maior o número de asteriscos, maior a diferença estatística em relação à máxima atividade enzimática. .... 64

**Figura 25** - Efeito de íons metálicos ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  e  $\text{Fe}^{2+}$ ; 5 mM) sobre a atividade xilanolítica (U/mL) de extratos enzimáticos obtidos a partir de bactérias xilanolíticas isoladas de solo preservado no bioma cerrado. (A) *B. velezensis* AP-6; (B) *B. toyonensis* MP-9; (C) *B. thuringiensis* ME-1; (D) *B. pseudomycoides* ME-16; (E) *B. thuringiensis* ME-20. Os resultados mostram a média de duplicatas biológicas e as barras de erro indicam  $\pm$  o desvio padrão das médias. Asteriscos indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ); quanto maior o número de asteriscos, maior a diferença estatística em relação à máxima atividade enzimática.

..... 65

**Figura 26** - Efeito do pH (2-12) sobre a atividade lipolítica (U/mL) de extratos enzimáticos obtidos a partir de bactérias lipolíticas isoladas de solo preservado no bioma cerrado. (A) *B. siamensis* AB-2; (B) *B. methylotrophicus* AB-3; (C) *L. macroides* AP-4; (D) *B. thuringiensis* MB-7; (E) *B. wiedmannii* MB-4. Os resultados mostram a média de duplicatas biológicas e as

barras de erro indicam  $\pm$  o desvio padrão das médias. Asteriscos indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ); quanto maior o número de asteriscos, maior a diferença estatística em relação à máxima atividade enzimática. .... 67

**Figura 27** - Efeito da temperatura (10-80 °C) sobre a atividade lipolítica (U/mL) de extratos enzimáticos obtidos a partir de bactérias lipolíticas isoladas de solo preservado no bioma cerrado. (A) *B. siamensis* AB-2; (B) *B. methylotrophicus* AB-3; (C) *L. macroides* AP-4; (D) *B. thuringiensis* MB-7; (E) *B. wiedmannii* MB-4. Os resultados mostram a média de duplicatas biológicas e as barras de erro indicam  $\pm$  o desvio padrão das médias. Asteriscos indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ); quanto maior o número de asteriscos, maior a diferença estatística em relação à máxima atividade enzimática. .... 68

**Figura 28** - Efeito de íons metálicos ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  e  $\text{Fe}^{2+}$ ; 5 mM) sobre a atividade lipolítica (U/mL) de extratos enzimáticos obtidos a partir de bactérias lipolíticas isoladas de solo preservado no bioma cerrado. (A) *B. siamensis* AB-2; (B) *B. methylotrophicus* AB-3; (C) *L. macroides* AP-4; (D) *B. thuringiensis* MB-7; (E) *B. wiedmannii* MB-4. Os resultados mostram a média de duplicatas biológicas e as barras de erro indicam  $\pm$  o desvio padrão das médias. Asteriscos indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ); quanto maior o número de asteriscos, maior a diferença estatística em relação à máxima atividade enzimática. .... 69

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Isolamento de bactérias a partir de solo do bioma Cerrado.....	28
<b>Tabela 2</b> - Atividade enzimática de bactérias isoladas a partir de amostras de solo do bioma Cerrado. A atividade enzimática foi confirmada após cultivo das bactérias em meio sólido, utilizando substratos específicos para cada uma das enzimas avaliadas. ....	30
<b>Tabela 3</b> - Caracterização das bactérias isoladas a partir de amostras de solo do bioma Cerrado, com atividade enzimática confirmada em meio sólido, contendo os substratos específicos para cada enzima.....	30
<b>Tabela 4</b> - Índice Enzimático (EI) obtido para bactérias isoladas de solo, selecionadas como produtoras de enzimas de interesse biotecnológico. O EI foi calculado pela relação entre o diâmetro da zona de hidrólise e o diâmetro da colônia, em meio sólido.....	32
<b>Tabela 5</b> - Atividade celulolítica ao longo do crescimento bacteriano. A densidade óptica das culturas foi determinada ao longo de 96h (DO <sub>600nm</sub> ) e o sobrenadante das culturas foi avaliado em relação à atividade celulolítica, pelo método de difusão em meio sólido. ....	33
<b>Tabela 6</b> - Atividade amilolítica ao longo do crescimento bacteriano. A densidade óptica das culturas foi determinada ao longo de 96h (DO <sub>600nm</sub> ) e o sobrenadante das culturas foi avaliado em relação à atividade amilolítica, pelo método de difusão em meio sólido. ....	35
<b>Tabela 7</b> - Atividade xilanolítica ao longo do crescimento bacteriano. A densidade óptica das culturas foi determinada ao longo de 96h (DO <sub>600nm</sub> ) e o sobrenadante das culturas foi avaliado em relação à atividade xilanolítica, pelo método de difusão em meio sólido. ....	37
<b>Tabela 8</b> - Atividade lipolítica ao longo do crescimento bacteriano. A densidade óptica das culturas foi determinada (DO <sub>600nm</sub> ) ao longo de 96 h e o sobrenadante das culturas foi avaliado em relação à atividade lipolítica, pelo método de difusão em meio sólido. ....	39
<b>Tabela 9</b> - Identificação molecular das bactérias celulolíticas selecionadas. As sequências parciais do gene 16S RNAr foram alinhadas com sequências disponíveis no GenBank, utilizando a ferramenta Blastn.....	41
<b>Tabela 10</b> - Identificação molecular das bactérias amilolíticas selecionadas. As sequências parciais do gene 16S RNAr foram alinhadas com sequências disponíveis no GenBank, utilizando a ferramenta Blastn.....	43
<b>Tabela 11</b> - Identificação molecular das bactérias xilanolíticas selecionadas. As sequências parciais do gene 16S RNAr foram alinhadas com sequências disponíveis no GenBank, utilizando a ferramenta Blastn.....	45

**Tabela 12** - Identificação molecular das bactérias lipolíticas selecionadas. As sequências parciais do gene 16S RNAr foram alinhadas com sequências disponíveis no GenBank, utilizando a ferramenta Blastn..... 47

**Tabela 13** - Atividade enzimática dos 20 isolados selecionados como melhores produtores das enzimas de interesse biotecnológico avaliadas. Cada isolado foi cultivado em meio sólido, contendo diferentes substratos para detecção de atividade das enzimas celulasas, amilases, xilanases e lipases. Foi considerado resultado positivo a presença de zonas claras ao redor das colônias..... 51

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**16S RNAr** - Subunidade 16 do ácido ribonucleico ribossomal  
**ANOVA** –Análise de variância  
**BHI** –MeioBrain Heart Infusion  
**BLASTn**- *Basic Local Alignment Search Tool* para nucleotídeos  
**CAGR** - Taxa de crescimento anual composta  
**CDB**: Convenção sobre a Diversidade Biológica  
**CMC**– Carboximetilcelulose  
**CMCase** -Carboximetilcelulase  
**DNA** - Ácido desoxirribonucleico  
**DNS** - 3,5-ácido dinitrosalicílico  
**dNTP's** - Desoxirribonucleotídeos Fosfatados  
**EDTA** - Ácido etilenodiamino tetra-acético  
**EI** – Índice Enzimático  
**GenBank** –Banco de dados de sequências genéticas  
**GHs** - Glicosilhidrolases  
**MEGA** – Molecular Evolutionary Genetics Analysis  
**NCBI** - National Center for Biotechnology Information  
**PCR** - Reação em cadeia da polimerase  
**pNPP** - p-nitrofenilpalmitato  
**pNP** - p-nitrofenol  
**RNA** - Ácido ribonucleico  
**TAE** - Tampão tris/ácido acético/EDTA  
**TE** - Tampão Tris/EDTA  
**Tris-HCl** - Tris base- ácido clorídrico

## LISTA DE SÍMBOLOS

**%** - Porcento  
**°C** - Grau Celsius  
**>** - Maior  
**<** - Menor  
**≥** - Maior ou igual  
**±** - Mais ou menos  
**µg/mL** - Micrograma por mililitro  
**µL** - Microlitro  
**µmol** - Micromolar  
**µmol/mL** –Micromolar por mililitro  
**A** - Adenina  
**A<sub>420</sub>** - Absorbância em comprimento de onda 420  
**Asp** - Ácido aspártico  
**C** - Citosina  
**Ca<sup>2+</sup>** - Cálcio divalente  
**CaCl<sub>2</sub>** - Cloreto de cálcio  
**cm** - Centímetro  
**Fe<sup>2+</sup>** - Ferro divalente  
**FeSO<sub>4</sub>** –Sulfato de ferro  
**g** - Grama  
**G** - Guanina  
**g/L** - Grama por litro  
**Glu** - Ácido glutâmico  
**Gly** - Glicina  
**h** - Hora  
**HCl** –Ácido clorídrico  
**His** - Histidina  
**I<sub>2</sub>** - Iodo  
**KI** - Iodeto de potássio  
**KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>**- Dihidrogenofosfato de potássio  
**Km<sup>2</sup>** - Quilômetro quadrado  
**M** - Molar  
**Mg<sup>2+</sup>** - Magnésio divalente  
**mg/mL** - Miligrama por mililitro  
**MgCl<sub>2</sub>**- Cloreto de magnésio  
**MgSO<sub>4</sub>**- Sulfato de magnésio  
**min** - Minuto  
**mg** –Miligrama  
**mL** - Mililitro  
**mM** - Milimolar  
**mm** – Milímetro  
**Na<sup>+</sup>** - Sódio monovalente  
**NaCl**- Cloreto de sódio



**NaOH** – Hidróxido de sódio

**ng/μL** - Nanograma por microlitro

**nm** - Nanômetros

**pH** - Potencial hidrogeniônico

**pM/μL** - Picomol por microlitro

**(p/v)** –Peso/volume

**rpm** – Rotações por minuto

**Ser** - Serina

**T** - Timina

**U** - Unidade de atividade enzimática

**U/μL** - Unidade de atividade enzimática por microlitro

**U/mL** - Unidade de atividade enzimática por mililitro

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
1. 1 BIOPROSPECÇÃO.....	1
1. 2 BIOPROSPECÇÃO DE ENZIMAS NO SOLO.....	2
1.3 GÊNEROS <i>BACILLUS</i> E <i>LYSINIBACILLUS</i> .....	3
1. 4 ENZIMAS DE INTERESSE BIOTECNOLÓGICO.....	4
<b>1. 4. 1 Proteases</b> .....	6
<b>1. 4. 2 Glicosilhidrolases (GHs)</b> .....	8
1. 4. 2. 1 <i>Celulases</i> .....	8
1. 4. 2. 2 <i>Amilases</i> .....	10
1. 4. 2. 3 <i>Xilanases</i> .....	13
<b>1. 4. 3 Lipases</b> .....	15
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	18
2. 1 GERAL.....	18
2. 2 ESPECÍFICOS.....	18
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	19
3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	19
3. 2 COLETA DE AMOSTRAS E SELEÇÃO DE BACTÉRIAS PRODUTORAS DE CELULASE, AMILASE, XILANASE OU LIPASE.....	19
3. 3PRODUÇÃO ENZIMÁTICA AO LONGO DO CRESCIMENTO BACTERIANO.....	21
3. 4QUANTIFICAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	21
3. 5EXTRAÇÃO DE DNA DAS BACTÉRIAS PRODUTORAS DE ENZIMAS.....	23
3. 6IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR.....	24
3. 7PURIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DO 16S RNAr.....	24
3. 8ANÁLISE FILOGENÉTICA.....	25
3. 9CAPACIDADE DE PRODUÇÃO DE MÚLTIPLAS ENZIMAS PELAS BACTÉRIAS SELECIONADAS.....	25
3. 10CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA.....	25

<b>3.10.1 Efeito do pH sobre a atividade enzimática</b> .....	26
<b>3.10.2 Efeito da temperatura sobre a atividade enzimática</b> .....	26
<b>3.10.3 Efeito de íons metais sobre a atividade enzimática</b> .....	26
3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	27
<b>4 RESULTADOS</b> .....	28
4.1 ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE BACTÉRIAS PRODUTORAS DE CELULASE, AMILASE, XILANASE OU LIPASE.....	28
4.2 PRODUÇÃO ENZIMÁTICA AO LONGO DO CRESCIMENTO BACTERIANO.....	33
<b>4.2.1 Bactérias celulolíticas</b> .....	33
<b>4.2.2 Bactérias amilolíticas</b> .....	34
<b>4.2.3 Bactérias xilanolíticas</b> .....	36
<b>4.2.4 Bactérias lipolíticas</b> .....	38
4.3 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DAS BACTÉRIAS PRODUTORAS DE CELULASE, AMILASE, XILANASE OU LIPASE.....	40
<b>4.3.1 Bactérias celulolíticas</b> .....	40
<b>4.3.2 Bactérias amilolíticas</b> .....	42
<b>4.3.3 Bactérias xilanolíticas</b> .....	44
<b>4.3.4 Bactérias lipolíticas</b> .....	46
<b>4.3.5 Análise filogenética dos 20 isolados selecionados como melhores produtores de celulase, amilase, xilanase ou lipase</b> .....	48
4.4 CAPACIDADE DE PRODUÇÃO DE MAIS DE UMA CLASSE DE ENZIMA PELOS ISOLADOS SELECIONADOS.....	50
4.5 CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA.....	52
<b>4.5.1 Bactérias celulolíticas</b> .....	52
<b>4.5.2 Bactérias amilolíticas</b> .....	57
<b>4.5.3 Bactérias xilanolíticas</b> .....	62
<b>4.5.4 Bactérias lipolíticas</b> .....	66
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	70
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	79
<b>7 REFERÊNCIAS</b> .....	80
APÊNDICE A (artigo submetido).....	98
APÊNDICE B (comprovante de submissão do artigo).....	124
APÊNDICE C (lista de participação de co-autores).....	129

<b>ANEXO</b> .....	130
--------------------	-----

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 BIOPROSPECÇÃO

Os microrganismos são os seres vivos mais abundantes no planeta, correspondendo a 60% da biomassa total (Dionisi HM, Lozada M, Olivera NL, 2012). A grande diversidade observada entre os procariotos provavelmente deve-se ao acúmulo de características fisiológicas heterogêneas ao longo de 3,8 bilhões de anos de evolução, cerca de 2 bilhões de anos a mais quando comparado aos organismos eucariotos (Torsvik V, Ovreas L, Thingstad TF, 2002).

Os procariotos são fundamentais para a manutenção da biosfera, pois monitoram a composição da atmosfera, reciclam nutrientes, interferem no clima e são os responsáveis pela decomposição de matéria orgânica (Huse SM *et al.*, 2008), estando diretamente envolvidos com os ciclos biogeoquímicos na Terra (Beloqui A *et al.*, 2008).

A versatilidade metabólica observada entre membros do Domínio *Bacteria* torna possível a prospecção de compostos com as mais variadas aplicações industriais. A descoberta de compostos bioativos obtidos a partir de fontes biológicas, que tenham valor econômico e que possam levar ao desenvolvimento de um produto é denominado bioprospecção (Vester JK, Glaring MA, Stougaard P, 2015). A bioprospecção pode ser aplicada em diversas áreas, como farmacêutica, agricultura, aquicultura, biorremediação, bioenergia e nanotecnologia (Beattie AJ *et al.*, 2011).

Existem múltiplos ambientes a partir dos quais se podem isolar microrganismos produtores de metabólitos de interesse biotecnológico, tais como: solos de florestas, onde foram encontrados microrganismos mesófilos produtores de celulases (Zhao S *et al.*, 2016); ambientes marinhos, a partir dos quais bactérias halófilas produtoras de lipases foram isoladas (Peng Q *et al.*, 2014); sedimentos da Antártida, onde foram identificadas bactérias psicrófilas produtoras de proteases ativas (Martínez-Rosales C, Castro-Sowinski S, 2011); solos de vulcão, de onde foi possível isolar bactérias hipertermófilas capazes de produzir catalase (Srinivas TNR *et al.*, 2011).

Com a criação da Convenção sobre a Diversidade Biológica (CDB) em 1993, os recursos biológicos deixaram de ser considerados patrimônio da humanidade para dar o

direito a cada país em usufruir seus próprios recursos, assim como a responsabilidade sobre sua conservação. Hoje, a CDB conta com vários países signatários incluindo o Brasil que possui uma das maiores biodiversidades do planeta (Brasil MMA, 2018). Porém, apesar desse grande potencial ainda existe pouca exploração dos recursos brasileiros.

Dentre os compostos bioativos possíveis de serem encontrados pela bioprospecção podemos destacar as enzimas, devido à grande importância e versatilidade de aplicação em vários setores industriais.

## 1.2 BIOPROSPECÇÃO DE ENZIMAS NO SOLO

Microrganismos produtores de enzimas de interesse biotecnológico podem ser isolados a partir de diversos ambientes. O solo é um ambiente ideal para bioprospecção devido à grande biodiversidade bacteriana naturalmente presente.

Grande parte da Terra é composta por áreas terrestres, as quais têm fundamental participação ecológica nos ciclos do carbono, nitrogênio e enxofre. As interações que ocorrem entre os microrganismos que habitam o solo acarretam importantes impactos na agricultura, pois promove o crescimento de plantas como fertilizantes biológicos, atuam como indicador da qualidade do solo e promovem a biorremediação de solos contaminados (Singh JS, Pandey VC, Singh DP, 2011).

Dentre essas áreas terrestres podemos destacar o cerrado. O cerrado brasileiro, uma vegetação do tipo savana, é o segundo maior bioma do Brasil, cobrindo uma área de cerca de 2 milhões de Km<sup>2</sup>, o que corresponde à 22 % da área do país (Quirino BF *et al.*, 2009). A cidade de Uberaba, em Minas Gerais, está situada nesse bioma e apresenta, em certas regiões, uma flora e fauna ainda inexploradas. Todo esse solo também abriga uma grande diversidade de microrganismos com inúmeros potenciais biotecnológicos.

A composição bacteriana do solo é bastante diversificada e pode ser influenciada por fatores ambientais, como a localização geográfica (Lauber CL *et al.*, 2009), textura (Sessitsch A *et al.*, 2001), pH (Cho SJ, Kim MH, Lee YO, 2016) e nutrientes disponíveis (Brackin R *et al.*, 2013).

Visando explorar essa biodiversidade existente nos solos, a busca por novos microrganismos produtores de enzimas tem crescido. Em 2015, Gaur R e Tiwari S isolaram uma celulase termo-solvente tolerante produzida por bactérias isoladas de solo. Essa enzima apresentou temperatura ótima em 65 °C e sua atividade aumentou até 30 % na presença de solventes orgânicos, como tolueno, n-butanol, n-dodecano e ciclohexano, características consideradas vantajosas para aplicação em diferentes setores industriais.

Burhan A *et al.* (2003) identificaram uma linhagem de *Bacillus* sp., isolada de amostras de solo, produtora de  $\alpha$ -amilase com atividade acima de 80 % nas temperaturas de 40-100 °C e pH entre 9,6-13, sendo, portanto, ideal para uso na indústria de detergentes, pois a utilização de amilases alcalinas e termoestáveis gera redução de custos durante a fabricação.

Os microrganismos que habitam o solo também são capazes de produzir mais de um tipo de enzima, como um mecanismo de adaptação às diferentes condições que este *habitat* oferece. Saravanan D, Radhakrishnan M e Balagurunathan R (2015), por exemplo, isolaram 32 linhagens bacterianas capazes de produzir mais de um tipo de enzima de interesse biotecnológico: dentre essas bactérias, 62,5 % produziram proteases, 28,1 % apresentaram atividade amilolítica e 12 % foram produtoras de lipases. Além dessas enzimas, algumas linhagens ainda produziram glutaminase, urease, agarase, pectinase e invertase.

Apesar da variedade de espécies encontradas em cada região, existem alguns filos de bactérias que são mais prevalentes no solo, como *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroides* e *Firmicutes* (Jung J, Philippot L, Park W, 2016). Essa diversidade microbiana pode ser avaliada por técnicas dependentes de cultivo como contagem, análise macroscópica em placa, perfil molecular analisando a região conservada da subunidade 16 do ácido ribonucleico ribossomal (16S RNAr) e composição de ácidos graxos da membrana (Nannipieri P *et al.*, 2003).

### 1.3 GÊNEROS *BACILLUS* E *LYSINIBACILLUS*

Atualmente, existem cerca de 377 espécies de *Bacillus* e 26 de *Lysinibacillus* que habitam diversos ambientes (LPSN, 2018). De acordo com sua classificação taxonômica, esses dois gêneros bacterianos pertencem ao filo *Firmicutes*, a classe *Bacilli*, a ordem *Bacillales* e a família *Bacillaceae* (Taxonomy Browser-NCBI, 2018).

O gênero *Bacillus* é composto principalmente de bactérias Gram-positivas formadoras de endósporos, aeróbias ou anaeróbias facultativas e em formato de bacilo. Entretanto, já foram descritas espécies em formato de cocos, móveis ou não móveis, anaeróbias, organotróficas ou litotróficas e com diferentes fisiologias. Bactérias desse gênero estão amplamente distribuídas em diversos ambientes, incluindo solo e sedimentos aquáticos, atuando nos ciclos do carbono e nitrogênio. A maioria não é patogênica, por isso muitas espécies desse gênero são exploradas para fins biotecnológicos e aplicações industriais (Rooney AP *et al.*, 2009; Bhandari Vet *al.*, 2013; Soni A *et al.*, 2016).

Assim como o gênero *Bacillus*, bactérias do gênero *Lysinibacillus* são Gram-positivas formadoras de endósporos e têm sido isoladas a partir de diversos ambientes como solo, superfícies aquáticas e alimentos fermentados de soja. O gênero *Lysinibacillus* é o único entre a família *Bacillaceae* que é caracterizado por uma estrutura especial de peptidoglicano do tipo A4 $\alpha$  (Lys-Asp) (Ahmed I *et al.*, 2007; Jung MY *et al.*, 2012; Zhao F *et al.*, 2015).

Espécies do gênero *Bacillus* têm sido bem descritas para produção de diversas enzimas de interesse industrial como amilases, proteases, lipases, fitases, celulasas e xilanases (Kim Y-K *et al.*, 2012; Kanmani P, Kumaresan K, Aravind J, 2015; Latorre JD *et al.*, 2016, Devaraj K *et al.*, 2018). O mesmo ocorre para bactérias do gênero *Lysinibacillus*, que são reportadas pela produção de quitinases, proteases, lipases e celulasas extracelulares (Mechri Set *al.*, 2017; Naureen Z *et al.*, 2017).



## 1.4 ENZIMAS DE INTERESSE BIOTECNOLÓGICO

Enzimas são macromoléculas biológicas, produzidas por organismos vivos, que atuam em reações bioquímicas específicas. A nível molecular, as enzimas catalisam tais reações através da aceleração da conversão do substrato em produto. Sem a catálise enzimática, a maioria das reações ocorreriam a uma velocidade muito lenta para a manutenção da vida, embora nem todas as reações requerem a presença de tais catalisadores (Cuesta SM *et al.*, 2015).

A maioria das enzimas é de origem proteica, exceto as ribozimas que são ácidos ribonucleicos (RNA) catalíticos (Singh R *et al.*, 2016). A região da enzima que contém seu resíduo catalítico, que se liga ao substrato e desempenha a reação, é chamada de sítio ativo, o qual é influenciado pela estrutura tridimensional dos aminoácidos que compõem a cadeia e também pela conformação do substrato (Gurung N *et al.*, 2013).

Os organismos possuem a capacidade em adaptar-se a mudanças ambientais para garantir sua sobrevivência e reprodução. Por isso, a adaptação à variações químicas ambientais levam a inovação, troca ou transferência de funções das enzimas, levando a diversidade enzimática (Cuesta SM *et al.*, 2015). Desde o surgimento da humanidade, as enzimas são utilizadas em muitos processos de fabricação de alimentos, como queijo, cerveja, vinho, vinagre e pão, e também na indústria têxtil, como na produção de couro e linho. O desenvolvimento da tecnologia de fermentação ao longo do tempo permitiu que hoje fosse possível caracterizar e produzir em larga escala essas enzimas, purificadas a partir de microrganismos selecionados (Kirk O, Borchert TV, Fuglsang CC, 2002).

O uso desses biocatalisadores na indústria tem ganhado destaque quando comparado a catalisadores químicos, devido à segurança, redução do tempo de produção, necessidade de baixa energia, viabilidade econômica, não toxicidade e não poluição do meio ambiente (Wohlgemuth R, 2010). Atualmente, existem cerca de 4000 enzimas conhecidas, sendo que 200 são de origem microbiana e comercializadas em vários setores industriais, como alimentício, cosmético, ração animal, têxtil, papel, detergente, ambiental e bioenergia (Li S *et al.*, 2012).

As enzimas de origem microbiana têm sido as mais utilizadas na indústria. Isso ocorre devido à facilidade de produção em grandes quantidades, capacidade de

liberação para o meio extracelular, baixo custo de produção em um curto período de tempo, estabilidade em condições extremas e possibilidade de expressão e produção de enzimas recombinantes em células hospedeiras (Gopinath SCB *et al.*, 2017).

No ano de 2015, a estimativa é que o mercado mundial de enzimas industriais tenha mobilizado em torno de cinco bilhões de dólares, sendo esperada uma taxa de crescimento anual composta (CAGR) de 8% até o ano de 2024 (Global Market Insights, 2016). Essa pesquisa também classificou o mercado enzimático de acordo com o tipo de enzima, sendo as proteases, glicosil hidrolases (GHs) como celulase, amilase e xilanase; lipases, polimerases e nucleases, as enzimas mais produzidas no mundo.

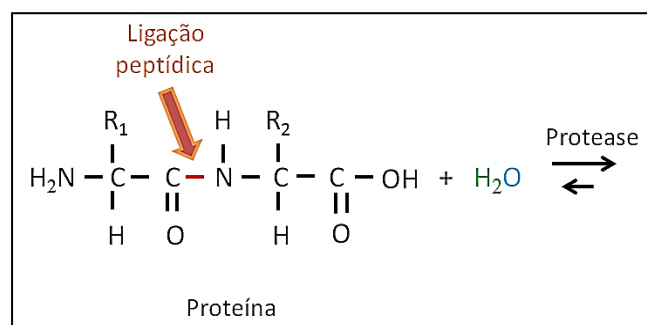
Segundo dados do Ministério da Indústria, Comércio Exterior e Serviços do Brasil, o Brasil é um país essencialmente importador das enzimas utilizadas na pesquisa e indústria nacional. No período de 2016/2017 o Brasil gastou 164,41 milhões de dólares com a importação de enzimas e obteve apenas 58,93 milhões com sua exportação. Embora o Brasil possua um enorme potencial para a produção de enzimas devido à disponibilidade de grandes quantidades de substrato de baixo custo para fermentações (resíduos agrícolas) e a grande biodiversidade microbiana ainda pouco explorada (Pandey *Aet al.*, 2000), 73,61 % das enzimas são importadas e apenas 26,39 % desse comércio é destinado à exportação (Brasil MDIC, 2018).

As principais enzimas utilizadas na indústria correspondem às proteases, GHs e lipases, que pertencem à classe hidrolase, por atuarem em reações de clivagem hidrolítica de ligações (Singh R *et al.*, 2016). Esses três grupos de enzimas são classificadas de acordo com o tipo de ligação em que realizam a hidrólise: as proteases atuam em ligações peptídicas, as GHs em ligações glicosídicas e as lipases em ésteres.

#### **1.4.1 Proteases**

Proteases correspondem a um grupo de enzimas que realizam a hidrólise da ligação peptídica (Figura 1), reação que resulta na degradação de proteína ou em modificação pós-traducional específica (Souza PM *et al.*, 2015).

**Figura 1** -Hidrólise da ligaçãopeptídica.



Fonte: Adaptado de Baker PJ e Numata K (2013).

As proteases podem ser divididas em dois grupos: as endopeptidases, que atuam sobre as ligações peptídicas na região interna do peptídeo e podem ser subdivididas em quatro grupos, baseados em seu mecanismo de ação (serina protease, cisteína protease, aspártico protease e metaloprotease); e as exopeptidases, que agem apenas nas extremidades da cadeia polipeptídica, sendo também subdivididas em dois grupos, baseado no sítio de ação (aminopeptidase e carboxipeptidase) (Rao MB *et al.*, 1998).

Essas enzimas podem ser produzidas por vários organismos, incluindo animais (produtores de tripsina, quimiotripsina, pepsina e renina), plantas (capazes de produzir papaína, bromelina, queratinases e ficina) e microrganismos. Os últimos são os principais produtores de proteases preferencialmente utilizadas na indústria, devido a fácil manipulação, altas taxas de produção e liberação para o meio extracelular (Jisha VN *et al.*, 2013).

Existe uma grande diversidade de espécies bacterianas produtoras de proteases. Os gêneros *Bacillus*, *Alcaligenes*, *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Halomonas*, *Arthrobacter* e *Serratia* se destacam devido à grande importância na produção em nível industrial (Shafee N *et al.*, 2005; Cui H *et al.*, 2015). Cada bactéria produz enzimas com características particulares para atuarem em condições físico-químicas específicas. Por exemplo, algumas espécies como *Arthrobacter arilaitensis* (Siala R *et al.*, 2015) e *Serratia marcescens* (Thakur S *et al.*, 2016) já foram relatadas por serem produtoras de proteases tolerantes a solventes orgânicos.

Outra característica relevante de algumas enzimas é a atuação em um meio básico. De todos os microrganismos alcalinofílicos, *Bacillus sp.* são os maiores

produtores de proteases alcalinas (Jisha VN *et al.*, 2013). Além disso, existem gêneros capazes de produzir proteases halofílicas como, por exemplo, *Halobacterium sp.* (Chuprom J *et al.*, 2016).

Existem diversas aplicações biotecnológicas para esse grupo de enzimas. As proteases alcalinas são utilizadas como aditivos de detergentes e, juntamente com outras enzimas, facilita a ação de limpeza (Maurer K-H, 2004). Outra potencial aplicação das proteases é no bioprocessamento de filmes de raio - X, possibilitando a recuperação do metal Prata (Al-Abdalall AH, Al-Khaldi EM, 2016).

As proteases também são utilizadas na indústria alimentícia, no processamento de alimentos, clarificação de cereais da fabricação de cerveja, coagulação durante a fabricação de queijo e amolecimento de massas, como pães (Sumantha A, Larroche C, Pandey A, 2006). Ademais, esse grupo de enzimas também tem importante atuação no tratamento de efluentes industriais e na indústria têxtil através do curtimento de couro animal (Ellaiah P, Srinivasulu B, Kunamneni A, 2002).

## **1.4.2 Glicosil hidrolases (GHs)**

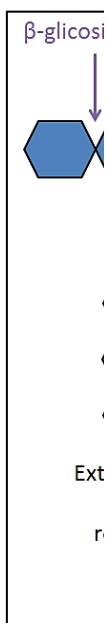
### *1.4.2.1 Celulases*

A produção de combustível a partir da biomassa de plantas tem ganhado atenção nos últimos anos por ser considerada uma alternativa que reduz os problemas ambientais e energéticos mundiais. Os açúcares das plantas são encontrados na biomassa lignocelulósica, composta por: celulose (50% da biomassa), um polímero homólogo composto de longas cadeias de glicose organizadas em unidades de celobiose; hemicelulose, um polímero heterólogo composto de xilose, arabinose, manose, glicose e galactose; e lignina, um complexo polímero aromático (Maki M, Leung KT, Qin W, 2009).

Celulases são as enzimas que catalisam a hidrólise das ligações 1,4- $\beta$ -D-glicosídicas da celulose, lignina e  $\beta$ -D-glicanos (Kubicek CP, 2013). As celulases são divididas em três subgrupos de enzimas (Figura 2), necessárias para que se tenha uma completa hidrólise da celulose: as endoglicanases, que hidrolisam aleatoriamente as

ligações 1,4- $\beta$ -D-glicosídicas intramoleculares da cadeia de celulose, produzindo novas extremidades redutoras e não-redutoras; as exoglicanases, que clivam as extremidades das cadeias de celulose liberando celobiose ou glicose; e as  $\beta$ -glicosidases, que hidrolisam celobiose a glicose (Zhang Y-HP, Himmel ME, Mielenz JR, 2006).

**Figura 2** - Subgrupos de celulases envolvidas na hidrólise da celulose.



Fonte: Adaptado de Ratanakhanokchai K *et al.* (2013).

Vários organismos, como bactérias, fungos, protozoários, nematoides e alguns artrópodes, são capazes de produzir celulases (Watanabe H, Tokuda G, 2001). A maioria das enzimas utilizadas para degradação da biomassa lignocelulósica tem sido derivada de fungos, principalmente do gênero *Trichoderma* e *Aspergillus*, os quais apresentam elevada capacidade de produção de celulases extracelulares (Banerjee G, Scott-Craig JS, Walton JD, 2010).

Entretanto, nos últimos anos, as celulases bacterianas têm recebido maior atenção, devido ao rápido crescimento das células produtoras e facilidade de obtenção das enzimas. Além disso, algumas espécies bacterianas crescem em diferentes condições de pH e temperatura, produzindo enzimas mais estáveis e que agem na

presença de um complexo multi-enzimático, que atua em sinergismo, levando a um aumento na taxa de hidrólise (Acharya S, Chaudhary A, 2012).

Diversos gêneros bacterianos têm sido relatados como produtores de celulases, incluindo *Bacillus*, *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Rummmminococcus*, *Alteromonas* e *Acetivibrio* (Gaur R, Tiwari S, 2015). *Clostridium thermocellum* é uma das bactérias anaeróbicas mais investigadas, por ser produtora de celulosoma, um complexo multi-enzimático, formado por celulases, hemicelulases e pectinases, capaz de degradar vários substratos (Hirano K *et al.*, 2016).

As condições físico-químicas de atividade de cada enzima variam de espécie para espécie e até mesmo entre linhagens. Algumas espécies bacterianas são produtoras de celulases alcalinas, como *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis* e *Serratiamarcescens* (Sethi S *et al.*, 2013), enquanto outras linhagens já foram reportadas por serem produtoras de celulases termoestáveis, como *Geobacillus sp.* e *Bacillus sp.*, cujas celulases atuam em temperaturas de 70 °C e 75 °C, respectivamente (Rastogi G *et al.*, 2010).

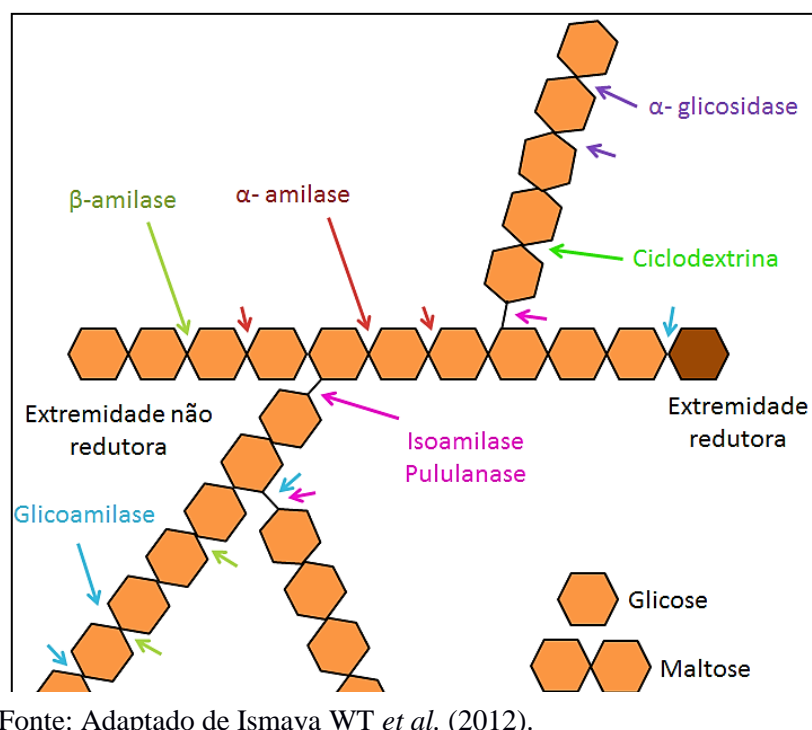
Além da produção de etanol, as celulases também são de interesse biotecnológico em outras áreas, tais como: indústria alimentícia, onde são utilizadas juntamente com xilanases e pectinases, para extração e clarificação de frutas na fabricação de sucos; indústria têxtil, para lavagem do jeans, algodão e outros tecidos celulósicos (Bhat MK, 2000); indústria de papel, na qual a enzima é utilizada para a degradação do material lignocelulósico da madeira ou de material reciclado e para branqueamento do papel final (Dienes D, Egyházi A, Réczey K, 2004).

#### 1.4.2.2 Amilases

As amilases são enzimas capazes de realizar a hidrólise do amido. O amido é um polissacarídeo composto pelos polímeros amilose e amilopectina. A amilose é um polímero linear, que contém mais de 6000 unidades de glicose unidas por ligações  $\alpha$ -1,4-glicosídicas, enquanto a amilopectina consiste de cadeias lineares, de 10-60 unidades de glicose, unidas pelas ligações  $\alpha$ -1,4, e cadeias ramificadas de 15-20 unidades de glicose, unidas por ligações  $\alpha$ -1,6 (Souza PM, Magalhães PO, 2010).

As amilases podem ser divididas em quatro grupos (Figura 3). O primeiro são as endo-hidrolases, como a  $\alpha$ -amilase, responsável pela hidrólise de ligações  $\alpha$ -1,4-glicosídicas na região interna do amido, gerando glicose e maltose. O segundo grupo são as exo-hidrolases, que atuam sobre as extremidades não-redutoras da cadeia polissacarídica. As enzimas desse grupo podem ser  $\beta$ -amilase (hidrolisa ligações  $\alpha$ -1,4-glicosídicas gerando unidades de maltose),  $\alpha$ -glicosidase (hidrolisa ligações  $\alpha$ -1,4-glicosídicas gerando unidades de glicose) e amiloglicosidase/glicoamilase (hidrolisa ligações  $\alpha$ -1,4 e  $\alpha$ -1,6 glicosídicas gerando unidades de glicose). O terceiro grupo de amilases é composto pelas desramificases, responsáveis pela retirada das ramificações, como as isoamilases e pululanases, que hidrolisam ligações  $\alpha$ -1,6 glicosídicas. O último grupo corresponde às transferases, que clivam ligações  $\alpha$ -1,4 glicosídicas e transferem parte dessa molécula para um aceptor, formando uma nova ligação glicosídica, tais como as ciclodextrinas (Sundarram A, Murthy TPK, 2014; van der Maarel MJEC *et al.*, 2002).

**Figura 3** - Tipos de amilases envolvidas na hidrólise do amido.



A enzima amilase pode ser produzida por plantas, animais e microrganismos. As enzimas microbianas são as de maior demanda no mercado, devido à fácil manipulação em laboratório, alta produção em larga escala em função do rápido crescimento desses organismos, e maior estabilidade (Gupta R *et al.*, 2003).

O nível de produção de amilases varia de um microrganismo para outro, entre membros do mesmo gênero, espécie e linhagem; varia dependendo da origem do microrganismo, sendo que linhagens isoladas a partir de ambientes naturalmente ricos em amido produzem altas quantidades de enzima. Além disso, fatores como pH, temperatura, fonte de carbono e nitrogênio também influenciam a produção de amilases em processos fermentativos (Gopinath SCB *et al.*, 2017).

Diversas espécies bacterianas são capazes de produzir amilase. Porém, para a aplicação industrial, esse grupo de enzimas tem sido derivado principalmente de bactérias do gênero *Bacillus*, como *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. stearothermophilus* e *B. amyloliquefaciens*, capazes de produzir amilases termoestáveis (Souza PM, Magalhães PO, 2010). Além de poder atuar em temperaturas elevadas, tais enzimas também podem atuar na presença de sais. Algumas linhagens de bactérias isoladas de oceanos, como *Marinobacter sp.* (Kumar S, Khare SK, 2015) e *Rhodothermus marinus* (Seong Y *et al.*, 2008), já foram relatadas como produtoras de amilases halofílicas.

A otimização da produção de amilase é importante para aumentar a quantidade produzida e diminuir o custo de fabricação. Por isso é importante estabelecer, para cada microrganismo e enzima, os padrões-físicoquímicos, como pH, temperatura, presença de íons (já que a maioria das amilases são metaloenzimas e necessitam de cofatores, como  $\text{Ca}^{2+}$ ), fonte de carbono e nitrogênio (Sivaramakrishnan S *et al.*, 2006).

Existem vários setores industriais que utilizam amilases em alguma etapa da produção. A produção de glicose e frutose a partir da conversão de amido ocorre por ação dessa enzima. A amilase também é empregada na indústria de papel, onde modifica e produz amido de baixo peso molecular e baixa viscosidade (van der Maarel MJEC *et al.*, 2002).

Essas enzimas podem atuar junto com celulasas, proteases e lipases e esse coquetel enzimático é utilizado na indústria de detergentes, pois potencializa a ação do



produto em remover manchas, além de ser um composto menos poluente ao meio ambiente (Hmidet N *et al.*, 2009).

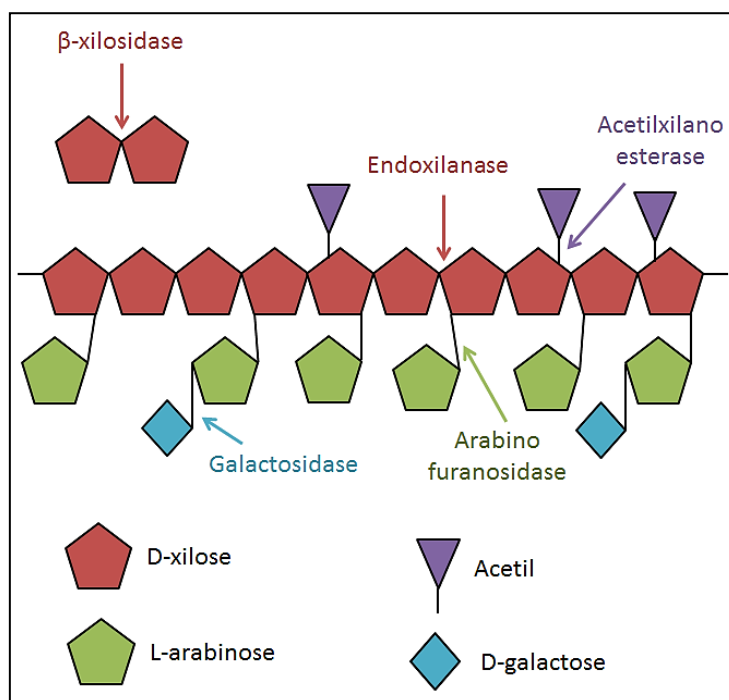
As amilases também podem ser utilizadas para produção de etanol, sendo o amido um excelente substrato para produção desse combustível, devido ao baixo custo e fácil disponibilidade (Chi Z *et al.*, 2009). Podem ser utilizadas também na indústria de alimentos processados, onde são inseridas durante o cozimento, na produção de bolos, suco de fruta e xarope de amido (Couto SR, Sanromán MA, 2006), e ainda na indústria têxtil, para remoção do amido (Dalvi P *et al.*, 2007).

#### 1.4.2.3 Xilanases

A biomassa lignocelulósica das plantas é composta por celulose, hemicelulose e lignina. A hemicelulose é um heteropolímero ramificado, que contém pentoses (D-xilose e L-arabinose) e hexoses (D-manose, D-glicose e D-galactose), sendo que a xilose é o açúcar mais abundante (Kumar R, Singh S, Singh OV, 2008). Devido a essa complexidade, são necessárias várias hemicelulases para que se proceda à hidrólise completa.

O xilano é o maior constituinte da hemicelulose. Trata-se de um homopolímero de D-xilopiranoses, unidos por ligações  $\beta$ -1,4 glicosídicas, e suas ramificações contêm alguns açúcares e ácidos orgânicos, como L-arabinosil, D-galactosil e acetil. Dentre as enzimas xilanólíticas necessárias para a metabolização do xilano destacam-se aquelas pertencentes à família hidrolase glicosídica (Figura 4): a endoxilanase, que atua sobre as ramificações das ligações  $\beta$ -1,4 de D-xilopiranoses, produzindo xilo-oligossacarídeos; e a  $\beta$ -xilosidase, que hidrolisa esses xilo-oligossacarídeos solúveis e xilobiose a partir de extremidades não redutoras, liberando xilose (Knob A, Terrasan CRF, Carmona EC, 2010).

**Figura 4** - Subgrupos de xilanases envolvidas na hidrólise do xilano.



Fonte: Adaptado de Ratanakhanokchai K *et al.* (2013)

Em nível industrial, fungos filamentosos produtores de xilanase são os mais utilizados, pois produzem e exportam para o meio de cultivo grandes quantidades dessa enzima, quando comparados a leveduras e bactérias (Polizeli MLTM *et al.*, 2005). Entretanto, nos últimos anos, têm aumentado a procura por novas enzimas produzidas por bactérias.

Uma vantagem de se produzir xilanase a partir de bactérias é que essa produção ocorre em meio básico ou neutro, enquanto a produção por fungos ocorre apenas em meio ácido, o que aumenta as etapas *downstream* e onera a produção. Outra vantagem é que as bactérias são capazes de produzir apenas xilanases, enquanto os fungos produzem simultaneamente xilanases e celulases, gerando maiores custos de purificação (Chakdar H *et al.*, 2016).

Diversos gêneros bacterianos já foram reportados como produtores de xilanases, como *Bacillus*, *Cellulomonas*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Paenibacillus*, *Arthrobacter*, *Microbacterium*, *Pseudoxanthomonas* e *Rhodothermus* (Chakdar H *et al.*, 2016). Algumas espécies, como *Bacillus arseniciselenatis* (Kamble RD, Jadhav AR, 2012), *Cellulomonas flavigena* (Lisov AV *et al.*, 2017),

*Pseudoxanthomonastaiwanensis* (Du Ret *et al.*, 2015) e *Micrococcusluteus* (Kaseke ZM *et al.*, 2016), são exemplos de produtores de xilanases.

Algumas bactérias produzem xilanases com características vantajosas para aplicação industrial. *Bacillus sp.*, por exemplo, é capaz de produzir xilanases termoestáveis (Cordeiro CAM *et al.*, 2002), enquanto *Arthrobacter sp.* é produtor de xilanases alcalinas (Murugan S *et al.*, 2011).

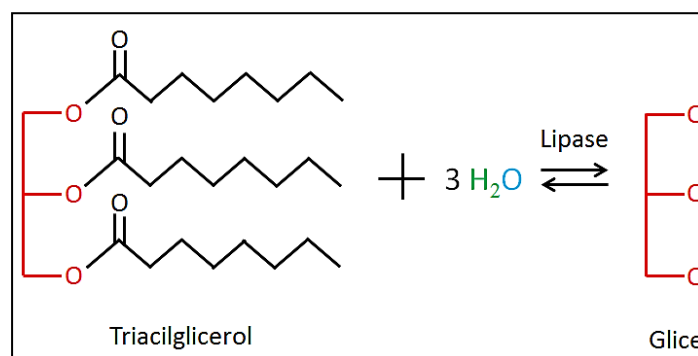
As enzimas xilanolíticas são produzidas em larga escala e aplicadas em diversos setores industriais. A xilanase é utilizada na indústria de papel, onde é responsável pelo branqueamento da polpa, facilitando a extração (Peixoto-Nogueira S de C *et al.*, 2009). Também pode ser aplicada na alimentação animal, para ajudar na digestibilidade (Harris AD, Ramalingam C, 2010), e na indústria alimentícia, atuando na produção de pão, através da degradação da hemicelulose presente na farinha de trigo, e no suco de frutas, facilitando a extração (Butt MS *et al.*, 2008).

As xilanases, juntamente com outras enzimas hidrolíticas, podem ser utilizadas para produção de bioetanol a partir da biomassa lignocelulósica (Bhalla A, Bischoff KM, Sani RK, 2015). Além disso, essas enzimas também podem ser utilizadas na indústria têxtil, para processar fibras vegetais, como o linho (Battan B *et al.*, 2012).

### **1.4.3 Lipases**

Lipases são enzimas responsáveis pela reação de hidrólise do triacilglicerol em ácidos graxos livres e glicerol (Figura 5) (Sirisha E, Rajasekar N, Narasu ML, 2010). Além dessa atividade hidrolítica, essas enzimas também atuam em outras reações, como esterificação, interesterificação, acidólise, alcoólise e aminólise (Joseph B, Ramteke PW, Thomas G, 2008).

**Figura 5** - Hidrólise de triacilglicerol.



Fonte: Adaptado de Jaeger KE e Reetz MT (1998)

As lipases pertencem à superfamília com a conformação  $\alpha/\beta$ -hidrolase; seu sítio ativo contém uma tríade catalítica, composta pelos aminoácidos Ser-Asp/Glu-His, além de conter uma sequência consenso Gly-X-Ser-X-Gly, onde X pode ser qualquer aminoácido natural, que auxilie em sua atividade catalítica (Gupta R, Gupta N, Rathi P, 2004).

As lipases são produzidas por animais, plantas e microrganismos. As enzimas de origem microbiana são as de maior interesse biotecnológico em função da variedade catalítica, alto rendimento, fácil manipulação genética e rápido crescimento do microrganismo produtor (Hasan F, Shah AA, Hameed A, 2006).

Existem vários gêneros de bactérias que produzem esse grupo de enzimas. As lipases obtidas a partir de *Bacillus* e *Pseudomonas* são as principais enzimas lipolíticas estudadas para aplicação industrial. Outros gêneros que também se destacam incluem *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Staphylococcus* e *Chromobacterium* (Patil KJ, Chopda MZ, Mahajan RT, 2011; Gurung N *et al.*, 2013).

As bactérias também são capazes de produzir lipases com características físico-químicas específicas. Por exemplo, uma linhagem de *Oceanobacillusrekeensis* foi reportada por produzir lipase com atividade em temperaturas baixas, como 10°C (Jiewei T *et al.*, 2014), enquanto *Bacillussonorensis* produz uma lipase alcalina-termoestável (Bhosale H, Shaheen U, Kadam T, 2016).

A maioria das lipases microbianas possuem atividade ótima em pH neutro ou alcalino, na temperatura de 30 a 60°C (embora algumas possuam atividade fora dessa faixa e sejam produzidas por microrganismos extremófilos), são estáveis em solventes orgânicos e não necessitam de cofatores (Verma N, Thakur S, Bhatt AK, 2012).

Devido a essas características, as lipases bacterianas são utilizadas em vários segmentos industriais. Elas podem ser empregadas na indústria alimentícia, conferindo aroma a alguns alimentos, como queijo, manteiga e carnes, também podem ser adicionadas a detergentes, para facilitar a remoção de manchas e sujeiras (Patil KJ, Chopda MZ, Mahajan RT, 2011), ou serem utilizadas na indústria de papel, para degradar o "*pitch*", que é a parte hidrofóbica da madeira, facilitando assim a produção de papel (Bajpai P, 1999).

As lipases também podem ser utilizadas na biorremediação, reduzindo a quantidade de solos e águas contaminados por óleo (Karigar CS, Rao SS, 2011), na indústria de cosmético e perfumaria, devido a sua atuação como surfactantes, lubrificantes e produção de aroma (Metzger JO, Bornscheuer U, 2006), e na produção de biodiesel, para reações de transesterificação de óleos de vegetais (Shah S, Sharma S, Gupta MN, 2004).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 GERAL

Isolar e caracterizar bactérias produtoras de enzimas de interesse biotecnológico a partir de amostras de solo em Uberaba, MG.

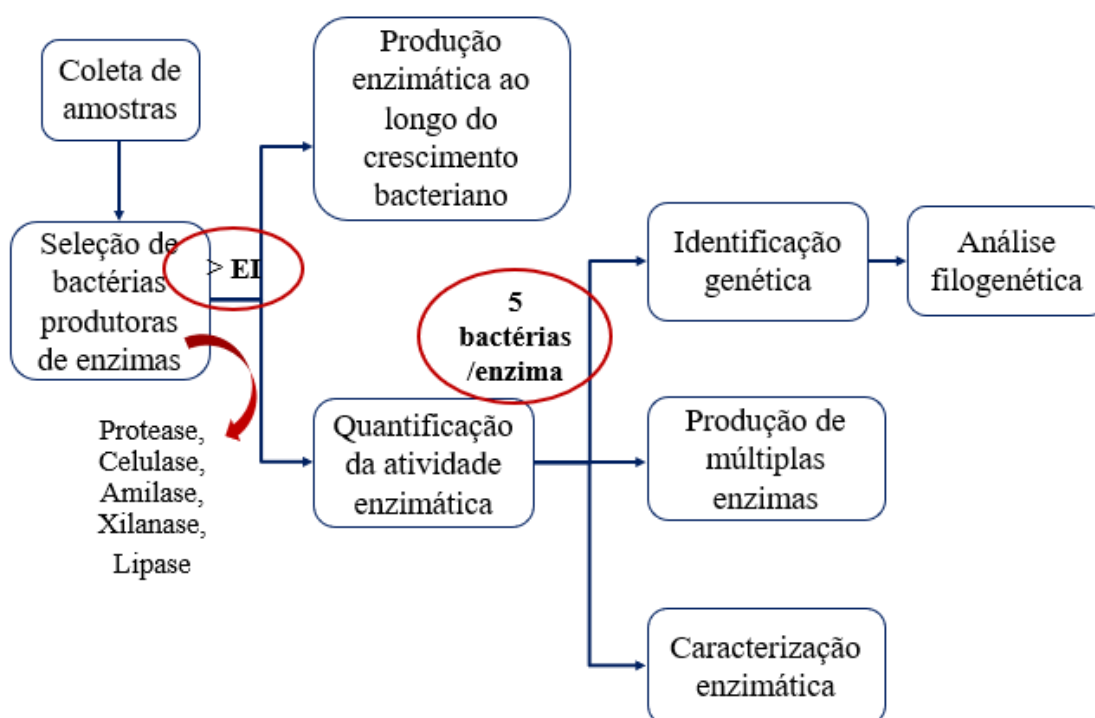
### 2.2 ESPECÍFICOS

- Isolar bactérias produtoras de celulase, amilase, xilanase e/ou lipase a partir de amostras de solo;
- Caracterizar morfológicamente e identificar geneticamente as bactérias produtoras das enzimas selecionadas;
- Determinar a unidade de atividade enzimática para cada enzima produzida;
- Caracterizar as enzimas produzidas quanto à influência de variações de pH e temperatura, e presença de íons metálicos sobre a reação enzimática.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

**Figura 6** – Etapas dos experimentos realizados.



#### 3.2 COLETA DE AMOSTRAS E SELEÇÃO DE BACTÉRIAS PRODUTORAS DE CELULASE, AMILASE, XILANASE OU LIPASE

Amostras de solo foram coletadas, em Abril de 2017, em dois locais de mata preservada no bioma Cerrado, ambos localizados na cidade de Uberaba, Minas Gerais: o Parque Ecológico Mata do Ypê e o Parque Jacarandá (Bosque ou Zoológico). Três áreas cobertas por vegetação nativa foram selecionadas e as amostras de solo foram coletadas a 10 cm de profundidade em relação à superfície.

As amostras foram coletadas e estocadas em recipientes de plástico estéreis, adequadamente identificados (local de coleta, data, horário), e transportadas

imediatamente para o Laboratório de Microbiologia, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, onde foram processadas.

A partir de cada amostra, 1 g de solo foi suspenso em 9 mL de solução salina estéril (0,85 % NaCl), homogeneizado durante um minuto, seguido de uma hora de repouso em temperatura ambiente. Após esse intervalo, foram realizadas diluições seriadas e alíquotas de 0,1 mL de suspensão das diluições  $10^{-3}$  a  $10^{-5}$  foram plaqueadas em meios de cultura contendo diferentes substratos como fontes de carbono.

Para selecionar bactérias produtoras de celulases foi utilizado meio mínimo (0,2 % extrato de levedura, 0,1 %  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,5 %  $\text{MgSO}_4$ , 2 % ágar), adicionado de 0,5 % de carboximetilcelulose (CMC) (meio ágar CMC, pH 7). Para *screening* de bactérias amilolíticas foi utilizado meio mínimo adicionado de 0,5 % de amido solúvel (meio ágar amido, pH 7) (Apun K, Jong BC, Salleh MA, 2000).

Para avaliar a degradação de xilano por bactérias produtoras de xilanases foi utilizado meio ágar xilano (pH 7), contendo 0,5 % peptona, 0,2 % extrato de levedura, 0,05 %  $\text{MgSO}_4$ , 0,05 % NaCl, 0,01 %  $\text{CaCl}_2$ , 0,5 % xilano e 2 % ágar (Nagar S, Mittal A, Gupta VK, 2012). Para seleção de bactérias produtoras de lipases foi utilizado o meio descrito por Mobarak-Qamsari E, Kasra-Kermanshahi R, Moosavi-nejad Z (2011) com modificações (1 % peptona, 0,5 % extrato de levedura, 1 % NaCl, 0,2 %  $\text{CaCl}_2$ , 1 % tween 80, 2 % ágar) (meio ágar tween 80, pH 7)).

As placas foram incubadas a 37 °C, em condições de aerobiose e microaerofilia. Após 24-48 h de incubação, as placas foram avaliadas quanto à presença de zonas de hidrólise claras ao redor das colônias bacterianas para celulase, amilase e xilanase, indicativo de degradação do substrato utilizado. No caso de lipases, a hidrólise é confirmada pela precipitação de sais ao redor das colônias. Para evidenciar o halo formado, o corante Vermelho congo (1 mg/mL) foi adicionado às placas utilizadas para *screening* de bactérias produtoras de celulase e xilanase (Teather RM, Wood PJ, 1982), enquanto lugol (1 %  $\text{I}_2$ : 2 % KI) foi adicionado às placas utilizadas para *screening* de bactérias amilolíticas (Hyun HH, Zeikus JG, 1985).

Em seguida, as colônias com resultados positivos na etapa de *screening* (formação de halos ao redor das colônias) foram transferidas para novas placas contendo o referido substrato para isolamento das bactérias e confirmação da atividade



enzimática. Culturas puras foram submetidas à coloração de Gram, para caracterização morfológica, e preservadas em meio BHI contendo glicerol (20 %), em freezer a -20 °C.

As bactérias produtoras de celulases, amilases, xilanases ou lipases foram analisadas pelo Índice Enzimático (EI), expresso pela relação entre o diâmetro da zona de hidrólise e o diâmetro da colônia (em milímetros) (Hankin R, Anagnostakis SL, 1975). Isolados que apresentaram  $EI \geq 1$  para produção de celulase ou xilanase e  $EI \geq 1,5$  para produção de amilase ou lipase foram selecionados para os experimentos subsequentes.

### 3.3 PRODUÇÃO ENZIMÁTICA AO LONGO DO CRESCIMENTO BACTERIANO

Meio caldo CMC, amido, xilano e tween 80 (mesma composição descrita no item 3.1, mas sem a adição de ágar) foram inoculados com 1 % de culturas, após 24 de cultivo, dos isolados produtores de, respectivamente, celulases, amilases, xilanases e lipases. As culturas foram incubadas a 37 °C, em aerobiose ou microaerofilia, por até 96 h.

A cada 24 h de incubação, alíquotas das culturas foram coletadas para determinação da densidade óptica (600 nm) em espectrofotômetro (UV-1600, *Pró-Análise*) e para centrifugação (12000 rpm, 15 min.). O sobrenadante foi utilizado como extrato enzimático e sua atividade foi determinada pelo ensaio de difusão em ágar, no qual o extrato foi adicionado em poços perfurados em meio sólido, contendo os substratos específicos para cada enzima (Vijayaraghava P and Vincent SGP, 2013). As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h, em aerobiose ou microaerofilia, e a atividade enzimática foi confirmada pela presença de zonas de hidrólise ao redor dos poços.

### 3.4 QUANTIFICAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Para a quantificação de celulases, amilases, xilanases ou lipases, as bactérias foram cultivadas em, respectivamente, meio caldo CMC, amido, xilano e tween 80 (descrito no item 2.2). Cada cultura foi centrifugada (12000 rpm, 15 min) e o

sobrenadante foi utilizado como extrato enzimático. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

As atividades enzimáticas de celulasas e xilanases foram quantificadas pelo Método Sacarificante, descrito por Miller GL (1959), com modificações, utilizando como substrato CMC ou xilano, respectivamente. À 75  $\mu\text{L}$  de substrato (1 %) foram adicionados 30  $\mu\text{L}$  de extrato enzimático e 45  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato de sódio (0,05 M, pH 7,0). A reação foi incubada a 55 °C, por 5 min., sendo então adicionado 300  $\mu\text{L}$  de 3,5-ácido dinitrosalicílico (DNS) para parar a reação. A mistura foi fervida por 10 min. e, em seguida, adicionado 2 mL de água destilada. A absorbância foi medida em espectrofotômetro (UV-1600, *Pró-Análise*), a 540 nm. A quantidade de açúcar redutores formada foi calculada de acordo com uma curva padrão de glicose (0,5-2,5  $\mu\text{mol/mL}$  ou 2-10  $\mu\text{mol/mL}$ ). Uma unidade (U) de atividade celulolítica ou xilanolítica foi definida como a quantidade de enzima que libera 1  $\mu\text{mol}$  de açúcar redutor (glicose), por minuto de reação.

O ensaio de quantificação de amilases foi realizado pelo Método Dextrinizante descrito por Fuwa H (1954), com modificações, utilizando amido como substrato. Uma alíquota de 60  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático foi adicionada a 100  $\mu\text{L}$  de amido (0,5 %) e a 40  $\mu\text{L}$  de tampão acetato de sódio (0,5 M, pH 5,5). A mistura foi incubada a 55 °C, por 30 min., e finalizada pela adição de 200  $\mu\text{L}$  de ácido acético (1 M). Foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  de reagente de FUWA e 4400  $\mu\text{L}$  de água destilada. A absorbância foi determinada em espectrofotômetro (UV-1600, *Pró-Análise*), a 660 nm. A quantidade de amido consumido foi calculada de acordo com uma curva padrão de amido (0,1-0,5 mg/mL). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para hidrolisar 0,1 mg de amido, por minuto de reação.

A atividade de lipase foi avaliada pelo método descrito por Winkler UK e Stuckmann M (1979), utilizando p-nitrofenilpalmitato (pNPP) como substrato. Uma alíquota de 300  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático foi adicionada a 700  $\mu\text{L}$  de solução pNPP dissolvido em tampão Tris-HCl (50 mM, pH 8). A reação foi incubada a 30 °C, por 15 min. e parada pela adição de 1 mL de solução acetona:etanol (1:1). A mistura foi centrifugada (12500 rpm, 10 min.) para remoção do precipitado e a absorbância do sobrenadante foi medida em espectrofotômetro (UV-1600, *Pró-Análise*), a 410 nm. A quantidade de p-nitrofenol (pNP) produzido foi calculada de acordo com uma curva

padrão de pNP (0,5-2,5  $\mu\text{mol/mL}$  ou 2-10  $\mu\text{mol/mL}$ ). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que libera 1  $\mu\text{mol}$  de p-nitrofenol (pNP) por minuto de reação.

### 3.5 EXTRAÇÃO DE DNA DAS BACTÉRIAS PRODUTORAS DE ENZIMAS

Os isolados produtores das enzimas de interesse foram identificados pelo sequenciamento parcial do gene 16S RNAr. O DNA total de cada isolado foi extraído utilizando o método de fenol-clorofórmio (Oliveira SDet *al.*, 2002), com modificações. As bactérias foram cultivadas em meio BHI ágar, *overnight*. Foi feita uma suspensão de células em 500  $\mu\text{L}$  de TE (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA pH 8) e a cultura foi centrifugada (12000 rpm, 2 min.). O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso em 200  $\mu\text{L}$  de lisozima (4 mg/mL) e incubado a 37 °C, por 1 h.. Posteriormente, 200  $\mu\text{L}$  de solução de proteinase K (10 mg/mL) foram adicionados, seguido de incubação a 50 °C, por 1 h.. As enzimas foram inativadas a 95 °C, por 10 min.. O DNA foi extraído pela adição de 400  $\mu\text{L}$  de solução fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1); a mistura foi homogeneizada e centrifugada (12000 rpm, 5 min.). A fase aquosa foi coletada e transferida para um novo tubo, no qual foi adicionado igual volume de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e novamente centrifugado (12000 rpm, 5 min.). O volume da fase aquosa foi transferido novamente para um tubo novo, no qual foi adicionado 10 % de acetato de sódio (3M, pH 6) e 2,5 vezes o volume de etanol absoluto gelado. O tubo foi mantido a -20°C *overnight* ou por 30 min. Após esse intervalo, o tubo foi centrifugado (12000 rpm, 10 min.), o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi lavado com 1 mL de etanol 70 %. Foi realizada nova centrifugação (13000 rpm, 20 min.), o sobrenadante foi descartado e o *opellet* foi mantido à temperatura ambiente até secagem. Por fim, o DNA extraído foi suspenso com 50  $\mu\text{L}$  de água milli-Q e armazenado a -20 °C até sua utilização.

A integridade do DNA extraído foi verificada por eletroforese em gel de agarose (0,8 %), utilizando o tampão TAE 1X (Tris base 0,4M, ácido acético 0,2M, EDTA 0,1 M - pH 8,0). O gel foi corado com brometo de etídio (0,2  $\mu\text{g/mL}$ ) e fotodocumentado sob luz ultravioleta. A concentração de DNA e sua pureza foi determinada em

espectrofotômetro NanoDrop (*Thermo Scientific*). As amostras foram diluídas para 50 ng/ $\mu$ L e estocadas a -20 °C até a realização das reações em cadeia da polimerase (PCR).

### 3.6 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

O 16S RNAr foi amplificado utilizando o par de primers universal 27F (AGAGTTTGATCMTGGCTCA) e 1492R (TACGGYTACCTTGTTACGAC) (Purves K *et al.*, 2016). A PCR foi realizada em um volume total de 25  $\mu$ L, utilizando-se 17,325  $\mu$ L de água milli-Q, 2,5  $\mu$ L de tampão 10X, 0,625  $\mu$ L de dNTP's (10 mM), 1,25  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 1  $\mu$ L de primer F (10 pM/ $\mu$ L), 1  $\mu$ L de primer R (10 pM/ $\mu$ L), 0,3  $\mu$ L de Taq DNA polimerase (5 U/ $\mu$ L) e 1  $\mu$ L de DNA (50 ng/ $\mu$ L). As condições da PCR incluíram: temperatura inicial de desnaturação a 95 °C por 5 min., seguida de 35 ciclos de 95 °C por 30 seg. para a desnaturação, 60 °C por 30 seg. para anelamento dos primers e 72 °C por 60 seg. para a extensão dos primers. O ciclo de amplificação foi seguido por uma extensão final a 72 °C por 7 min. e os tubos foram mantidos a 4 °C. As reações de amplificação foram realizadas em termociclador Gene Amp PCR System 9700 (*Applied Biosystems*).

Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose (1,2%), o gel foi corado com brometo de etídio (0,2  $\mu$ g/mL) e fotodocumentado sob luz ultravioleta.

### 3.7 PURIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DO 16S RNAr

Os amplicons obtidos foram purificados diretamente do produto de PCR, utilizando o kit Invisorb® Fragment CleanUp (*Stratec Molecular*). Brevemente, 500  $\mu$ L da solução *Binding Buffer* foram adicionadas a 75  $\mu$ L do produto de PCR; a mistura foi homogeneizada, transferida para uma coluna *Spin Filter* e depois centrifugada (11000 rpm, 2 min.). O filtrado foi descartado e a coluna foi centrifugada novamente (11000 rpm, 3 min.). A coluna foi inserida em um novo tubo e o DNA foi eluído pela adição de 10  $\mu$ L de solução *Elution Buffer*. O tubo foi mantido em repouso à temperatura ambiente por 5 min. e posteriormente centrifugado (11000 rpm, 1min.). O material

purificado foi quantificado em NanoDrop (*Thermo Scientific*) e estocado a -20 °C até a utilização.

Após a purificação, o DNA foi utilizado para sequenciamento pelo método de terminação de cadeia (Método de Sanger). Uma reação foi realizada para cada amostra de DNA utilizando primer *forward* e o primer *reverse*. Todas as sequências consenso obtidas foram comparadas às aquelas disponíveis no banco de dados do GenBank (NCBI), utilizando o algoritmo Basic Local Alignment Search Tool para nucleotídeos (Blastn) (Altschul SF *et al.*, 1990). Todas as sequências obtidas foram depositadas no banco de dados do GenBank.

### 3.8 ANÁLISE FILOGENÉTICA

Para a análise filogenética, as sequências foram alinhadas pelo *software* Clustal W e a árvore filogenética foi reconstruída com o programa MEGA versão 7.0, no qual foi utilizado o método de Máxima Verosimilhança baseado no modelo Kimura 2-parâmetros. *Brevibacillus brevis* YNP-1 foi utilizado como grupo externo e uma análise *Bootstrap* (1000 repetições) foi realizada para reconstrução da história evolutiva dos isolados.

### 3.9 CAPACIDADE DE PRODUÇÃO DE MÚLTIPLAS ENZIMAS PELAS BACTÉRIAS SELECIONADAS

Os isolados selecionados como melhores produtores para cada uma das cinco enzimas avaliadas foram analisados quanto à capacidade de produção das demais enzimas de interesse. Para isso, cada isolado foi cultivado nos diferentes meios descritos (item 2.1), contendo os quatro substratos utilizados para detectar a atividade enzimática, sendo a produção de enzimas extracelulares confirmada pela presença de zonas de hidrólise claras/zona de precipitação ao redor das colônias.

### 3.10 CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA

A influência de parâmetros físico-químicos, como pH, temperatura e presença de íons, sobre a atividade das enzimas foi analisada. Para tanto, ensaios de quantificação foram realizados, seguindo os mesmos procedimentos descritos no item 2.3, mas variando as condições de cada reação.

#### 3.10.1 Efeito do pH sobre a atividade enzimática

O efeito do pH sobre a atividade enzimática foi analisado com valores de pH variando de 2 a 12, mediante o uso de soluções tampão apropriadas (pH 2: cloreto de potássio-HCl 0,2 M; pH 4 e 6: acetato de sódio 0,5 M; pH 7 e 8: fosfato de sódio 0,05 M; pH 10: Tris-HCl 0,05 M; pH 12: fosfato de sódio-NaOH 0,1 M). As condições de ensaio padrão para cada uma das enzimas avaliadas foram utilizadas. A maior atividade enzimática (M) foi considerada 100 % e para os demais valores observados (R) foi calculada a atividade relativa (%) através da equação  $(R \times 100) / M$ . Todos os ensaios foram realizados em duplicata biológica.

#### 3.10.2 Efeito da temperatura sobre a atividade enzimática

A influência da temperatura sobre a atividade enzimática foi avaliada pela incubação da mistura de reação em temperaturas que variaram de 10 a 80 °C (com incrementos de 10 °C), sendo utilizadas condições de ensaio padrão para cada uma das enzimas avaliadas. A maior atividade enzimática (M) foi considerada 100 % e para os demais valores observados (R) foi calculada a atividade relativa (%) através da equação  $(R \times 100) / M$ . Todos os ensaios foram realizados em duplicata biológica.

#### 3.10.3 Efeito de íons metais sobre a atividade enzimática

O efeito de íons metais (5 mM) sobre a atividade enzimática foi investigado utilizando  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgCl}_2$ , NaCl e  $\text{FeSO}_4$ . O extrato enzimático de cada isolado foi incubado com as diferentes soluções de metais, à temperatura ambiente, por 5 min.. A

atividade enzimática foi determinada pelos ensaios de quantificação, específicos para cada enzima, com pH e temperatura ótima para cada enzima. A maior atividade enzimática (M) foi considerada 100 % e para os demais valores observados (R) foi calculada a atividade relativa (%) através da equação  $(R \times 100) / M$ . Todos os ensaios foram realizados em duplicata biológica.

### 3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

*One-way* análise de variância (ANOVA) seguida por teste de comparação múltipla de Dunnett ( $p < 0,05$ ) foram realizados, utilizando o *software* GraphPad versão 7.04.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE BACTÉRIAS PRODUTORAS DE CELULASE, AMILASE, XILANASE OU LIPASE

A partir das amostras de solo coletadas em ambientes de mata preservada no bioma Cerrado, 376 colônias foram obtidas após cultivo nos quatro diferentes meios utilizados (ágar CMC, ágar amido, ágar xilano e ágar tween 80), em condições de aerobiose ou microaerofilia. Dessas colônias, 157 foram isoladas a partir da amostra de solo 1, 133 foram isoladas a partir da amostra de solo 2 e a partir da amostra 3 foram obtidas 86 colônias (Tabela 1).

Colônias de diferentes tamanhos e morfologias foram obtidas, tanto em aerobiose como em microaerofilia, sendo 84 colônias obtidas em meio ágar CMC, 91 colônias isoladas em meio ágar amido, 113 em meio ágar xilano e 88 colônias isoladas em meio ágar tween 80 (Tabela 1).

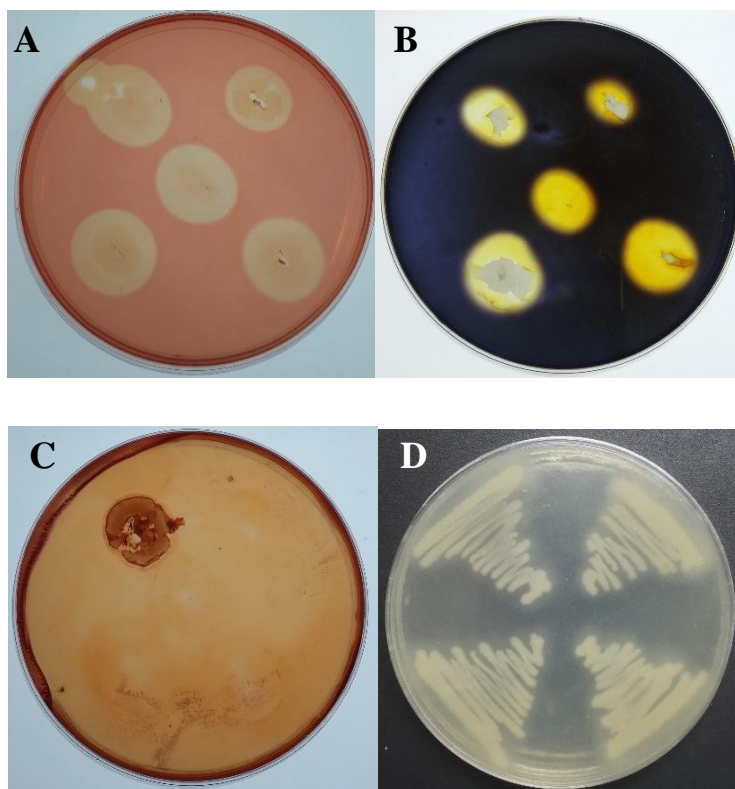
**Tabela 1** - Isolamento de bactérias a partir de solo do bioma Cerrado.

Condição de crescimento	Amostra de solo			Meio ágar			
	1	2	3	CMC	Amido	Xilano	Tween 80
Aerobiose	56	44	22	27	28	31	36
Microaerofilia	101	89	64	57	63	82	52
Total	157	133	86	84	91	113	88

Dentre as 376 colônias recuperadas das três amostras de solo avaliadas, a atividade enzimática foi confirmada em 85 isolados, os quais apresentaram formação de zonas de hidrólise ao redor das colônias após subcultivo em cada meio específico (Figura 7).



**Figura 7** - Bactérias produtoras de enzimas extracelulares de interesse biotecnológico, isoladas a partir de amostras de solo preservado no bioma Cerrado, na cidade de Uberaba, MG. A atividade enzimática foi confirmada através da formação de zonas de hidrólise ao redor das colônias bacterianas após cultivo em meio ágar CMC (A), ágar amido (B), ágar xilano (C) e ágar tween 80 (D), para detectar a produção de celulases, amilases, xilanases e lipases, respectivamente.



Dos isolados confirmados como produtores de enzimas, 29 foram provenientes da amostra de solo 1, 25 foram isolados a partir da amostra 2, sendo os demais 31 isolados obtidos a partir da amostra 3 (Tabela 2). Quatorze isolados foram confirmados como produtores de celulases, 25 isolados como produtores de amilases, 20 como produtores de xilanases e 26 como produtores de lipase (Tabela 2).

**Tabela 2** -Atividade enzimática de bactérias isoladas a partir de amostras de solo do bioma Cerrado. A atividade enzimática foi confirmada após cultivo das bactérias em meio sólido, utilizando substratos específicos para cada uma das enzimas avaliadas.

Enzima produzida	Isolados produtores de enzimas	Amostra de solo		
		1	2	3
Celulase	14	6	4	4
Amilase	25	14	8	3
Xilanase	20	1	8	11
Lipase	26	8	5	13

A maioria das bactérias produtoras de enzimas de interesse biotecnológico foi caracterizada como Gram-positivas, em formato bacilare isoladas em condições de microaerofilia (n=62) (Tabela 3).

**Tabela 3** -Caracterização das bactérias isoladas a partir de amostras de solo do bioma Cerrado, com atividade enzimática confirmada em meio sólido, contendo os substratos específicos para cada enzima.

Característica		Celulolíticas	Amilolíticas	Xilanolíticas	Lipolíticas
<b>Coloração de Gram</b>	Gram-positivo	11	25	20	26
	Gram-negativo	3	0	0	0
<b>Forma</b>	Bacilo	13	23	20	26
	Pleomórfico	1	2	0	0
<b>Atmosfera de incubação</b>	Aerobiose	4	8	3	8
	Microaerofilia	10	17	17	18

Os isolados foram nomeados baseado na enzima produzida, na atmosfera utilizada para o isolamento, a fonte da amostra, seguido pelo número do isolado. Bactérias produtoras de celulases receberam a identificação “C”, aquelas com atividade amilolítica foram assinaladas como “I”, as produtoras de xilanases foram nomeadas como “X”, ao mesmo tempo em que “L” foi determinada como a sigla para as produtoras de lipases. Os isolados que cresceram em condições de aerobiose foram identificados como “a”, e aqueles que foram isolados em condições de microaerofilia foram identificados como “m”. As bactérias isoladas a partir da amostra de solo 1 foram nomeados como “b”, aquelas provenientes da amostra 2 foram nomeadas como “p”, enquanto a identificação “e” foi dada àquelas bactérias obtidas a partir da terceira amostra de solo.

De acordo com o Índice Enzimático (EI), 10 isolados produtores de celulases e 13 produtores de xilanases apresentaram  $EI \geq 1$ ; em relação à produção de amilases e lipases, 10 isolados e 12 isolados, respectivamente, apresentaram  $EI \geq 1,5$  (Tabela 4). Baseado no EI, esses 45 isolados foram então selecionados para os demais experimentos.

**Tabela 4** -Índice Enzimático (EI) obtido para bactérias isoladas de solo, selecionadas como produtoras de enzimas de interesse biotecnológico. O EI foi calculado pela relação entre o diâmetro da zona de hidrólise e o diâmetro da colônia, em meio sólido.

Celulolíticas		Amilolíticas		Xilanolíticas		Lipolíticas	
Isolado	EI	Isolado	EI	Isolado	EI	Isolado	EI
Cab-8	0,67	Iab-2	0,80	Xab-3	1,00	Lab-2	1,60
Cab-9	1,00	Imb-1	3,00	Xap-6	1,00	Lab-3	2,11
Cab-1	1,00	Imb-2	1,18	Xmp-9	1,00	Lab-8	1,80
Cmb-2	1,00	Imb-7	1,43	Xmp-11	1,00	Lab-19	4,00
Cmb-3	1,00	Imb-9	0,67	Xmp-13	1,00	Lmb-7	1,87
Cmb-22	1,00	Imb-10	0,67	Xmp-20	1,00	Lmb-2	1,70
Cmp-6	0,87	Imb-13	1,45	Xmp-21	0,80	Lmb-3	1,31
Cmp-7	1,20	Imb-16	0,71	Xmp-22	1,00	Lmb-4	3,00
Cmp-8	1,25	Imb-17	1,60	Xmp-23	0,80	Lap-4	3,33
Cmp-11	0,80	Imb-18	1,67	Xae-4	0,83	Lmp-5	1,75
Cae-1	0,70	Imb-19	1,67	Xme-1	1,00	Lmp-6	2,40
Cme-1	1,00	Imb-22	2,80	Xme-7	0,89	Lmp-7	1,20
Cme-2.1	1,00	Imb-23	1,22	Xme-14	1,00	Lmp-9	1,43
Cme-2	1,00	Imb-24	1,40	Xme-16	1,00	Lae-3	1,18
		Iap-1	1,00	Xme-17	0,74	Lae-6	2,00
		Iap-11	1,57	Xme-20	1,00	Lae-7	1,12
		Iap-13	0,83	Xme-21	0,78	Lme-1	1,62
		Iap-14	2,00	Xme-23	1,00	Lme-6	1,11
		Iap-15	0,75	Xme-2	1,00	Lme-8	1,13
		Imp-11	1,40	Xme-3	0,89	Lme-9	1,08
		Imp-16	1,00			Lme-10	1,17
		Imp-26	1,00			Lme-15	1,33
		Iae-1	1,80			Lme-17	1,07
		Iae-2	3,33			Lme-18	1,09
		Ime-1	3,00			Lme-19	1,20
						Lme-20	1,07

## 4.2 PRODUÇÃO ENZIMÁTICA AO LONGO DO CRESCIMENTO BACTERIANO

O crescimento bacteriano foi monitorado ao longo de 96 h de incubação, sendo avaliada a produção das enzimas de interesse a cada 24 h de crescimento, em meio sólido contendo os substratos específicos para cada enzima.

### 4.2.1 Bactérias celulolíticas

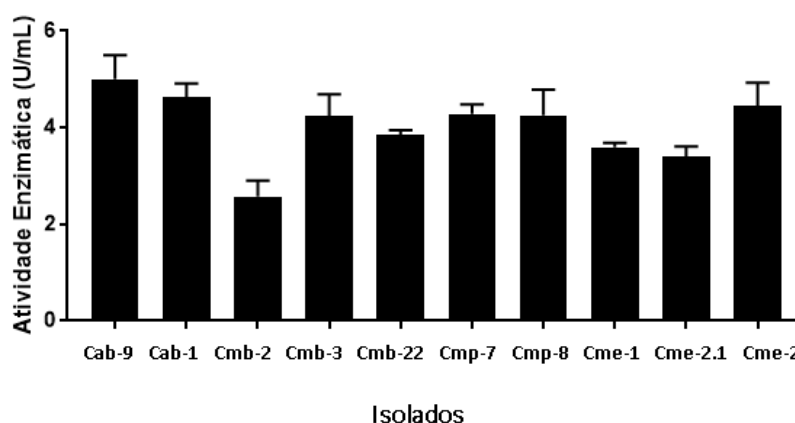
Todos os isolados celulolíticos (n=10) apresentaram um padrão de crescimento semelhante, atingindo a fase estacionária entre 72 e 96 h de incubação, a 37 °C, em aerobiose ou microaerofilia. A atividade celulolítica foi observada desde as primeiras 24 h de crescimento bacteriano, sendo mantida até o último momento de análise, após 96 h de incubação, exceto o isolado Cab-1, cuja atividade celulolítica mais expressiva foi detectada somente após 96 h de crescimento bacteriano (Tabela 5).

**Tabela 5** -Atividade celulolítica ao longo do crescimento bacteriano. A densidade óptica das culturas foi determinada ao longo de 96h (DO<sub>600nm</sub>) e o sobrenadante das culturas foi avaliado em relação à atividade celulolítica, pelo método de difusão em meio sólido.

Isolados	Absorbância (600 nm)				Zonas de hidrólise (mm)			
	24 h	48 h	72 h	96 h	24 h	48 h	72 h	96 h
Cab-9	0,384	0,506	0,876	0,872	23	23	20	20
Cab-1	0,037	0,127	0,590	0,497	5	5	5	22
Cmb-2	0,278	0,546	0,698	0,810	25	25	20	19
Cmb-3	0,239	0,497	0,582	0,786	23	27	20	20
Cmb-22	0,283	0,582	0,844	0,884	19	21	17	19
Cmp-7	0,257	0,538	0,620	0,720	22	23	17	19
Cmp-8	0,291	0,577	0,654	0,798	21	22	20	19
Cme-1	0,299	0,552	0,716	0,858	23	23	18	20
Cme-2.1	0,200	0,586	0,694	0,886	21	23	18	20
Cme-2	0,207	0,495	0,580	0,674	22	28	15	21

Baseado no perfil de crescimento e atividade enzimática das bactérias celulolíticas selecionadas, os ensaios de quantificação enzimática foram realizados após 72 h de cultivo, utilizando CMC como substrato. A atividade enzimática variou de 2,575 U/mL (isolado Cmb-2) a 5,0 U/mL (isolado Cab-9), sendo os cinco melhores produtores de celulases selecionados para a identificação molecular e a caracterização enzimática (Cab-9 (5,0 U/mL), Cab-1 (4,630 U/mL), Cmb-3 (4,236 U/mL), Cmp-7 (4,282 U/mL) e Cme-2 (4,444 U/mL)) (Figura 8).

**Figura 8** - Atividade enzimática dos isolados celulolíticos, após 72 h de crescimento bacteriano. O ensaio enzimático foi realizado em meio líquido, utilizando CMC como substrato, e a atividade foi expressa em U/mL. Os resultados mostram a média das análises em triplicata e as barras de erro indicam  $\pm$  desvio padrão das médias.



#### 4.2.2 Bactérias amilolíticas

Dentre os isolados amilolíticos (n=10), a maioria (n=7) atingiu a fase estacionária após 72 h de incubação, a 37 °C, em aerobiose ou microaerofilia. Além disso, para a maioria dos isolados, a atividade amilolítica foi observada ao longo das 96 h de avaliação, exceto para os isolados Iap-11, Imb-1, Imb-19 e Imb-22 (Tabela 6).

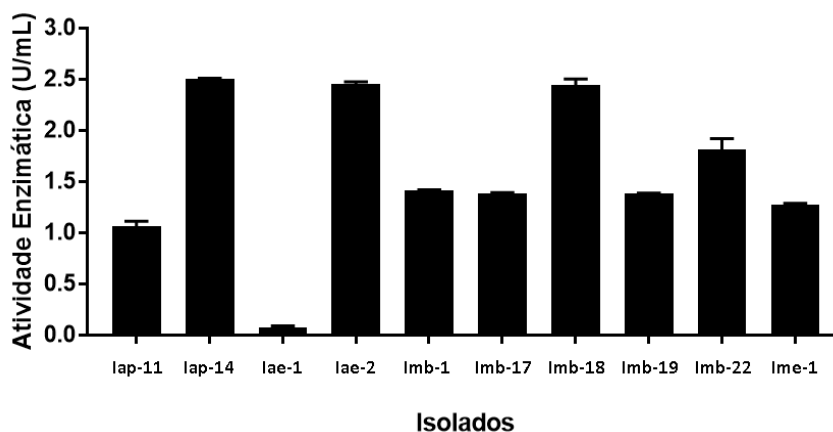
**Tabela 6** -Atividade amilolítica ao longo do crescimento bacteriano. A densidade óptica das culturas foi determinada ao longo de 96h ( $DO_{600nm}$ ) e o sobrenadante das culturas foi avaliado em relação à atividade amilolítica, pelo método de difusão em meio sólido.

Isolados	Absorbância (600 nm)				Zonas de hidrólise (mm)			
	24 h	48 h	72 h	96 h	24 h	48 h	72 h	96 h
Iap-11	1,106	1,240	1,384	1,052	13	14	14	-
Iap-14	0,890	0,852	1,024	0,490	14	9	13	13
Iae-1	0,163	0,968	1,440	0,858	11	9	13	16
Iae-2	0,292	1,168	2,615	1,528	19	20	19	19
Imb-1	1,096	0,804	1,420	1,208	13	-	18	18
Imb-17	1,052	1,928	1,328	1,300	13	11	18	18
Imb-18	0,970	1,640	1,356	0,632	14	14	12	11
Imb-19	0,075	0,114	0,636	1,012	-	-	5	5
Imb-22	0,094	0,118	0,414	0,358	12	13	9	-
Ime-1	0,528	0,764	1,428	0,778	12	12	13	12

Legenda: (-) atividade enzimática ausente.

De acordo com os resultados obtidos, a atividade enzimática das bactérias amilolíticas selecionadas foi quantificada após 48 h(para Iap-14, Iae-2, Imb-18 e Imb-22) ou 72 h de incubação (demais isolados), dependendo do isolado, utilizando amido como substrato. A atividade enzimática variou de 0,080 U/mL (isolado Iae-1) a 2,506 U/mL (isolado Iap-14). Os isolados Iap-14 (2,506 U/mL), Iae-2 (2,452 U/mL), Imb-1 (1,417 U/mL), Imb-18 (2,443 U/mL) e Imb-22 (1,816 U/mL) foram selecionados como os melhores produtores de amilase e utilizados nos experimentos subsequentes (Figura9).

**Figura 9** - Atividade enzimática dos isolados amilolíticos, após 48 ou 72 h de crescimento bacteriano. O ensaio enzimático foi realizado em meio líquido, utilizando amido como substrato, e a atividade foi expressa em U/mL. Os resultados mostram a média das análises em triplicata e as barras de erro indicam  $\pm$  desvio padrão das médias.



#### 4.2.3 Bactérias xilanolíticas

Os isolados capazes de produzir xilanases (n=13) apresentaram padrão de crescimento semelhante ao longo das 96 h de incubação em meio caldo xilano. A maioria dos isolados atingiu a fase estacionária entre 48 e 72 h de incubação, a 37 °C, em aerobiose ou microaerofilia. Para os isolados Xab-3, Xap-6 e Xme-16, a atividade xilanolítica foi observada a partir das amostras coletadas após 48 h de cultivo. Para os demais isolados foi observada atividade enzimática já nas primeiras 24 h de incubação, sendo importante ressaltar que, nas condições avaliadas, não houve alteração no diâmetro dos halos de degradação de xilano independente do tempo de crescimento bacteriano (Tabela 7).



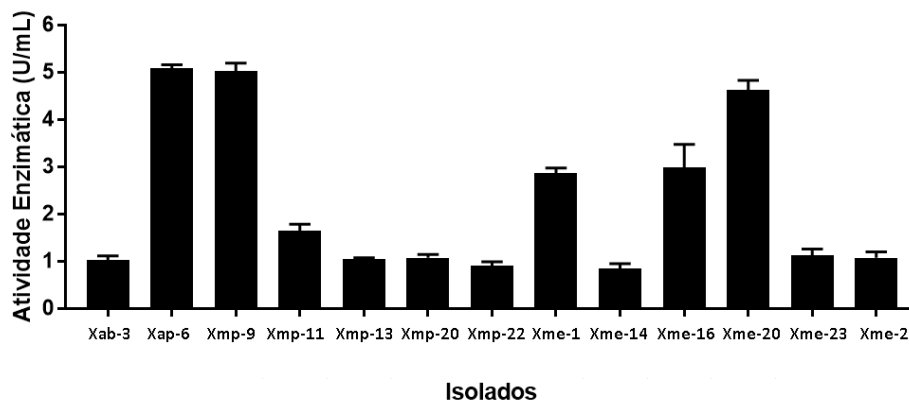
**Tabela 7** - Atividade xilanolítica ao longo do crescimento bacteriano. A densidade óptica das culturas foi determinada ao longo de 96h ( $DO_{600nm}$ ) e o sobrenadante das culturas foi avaliado em relação à atividade xilanolítica, pelo método de difusão em meio sólido.

Isolados	Absorbância (600 nm)				Zonas de hidrólise (mm)			
	24 h	48 h	72 h	96 h	24 h	48 h	72 h	96 h
Xab-3	1,288	2,048	3,580	3,420	-	5	5	5
Xap-6	0,246	1,924	3,770	3,610	-	5	5	5
Xmp-9	1,712	1,940	1,208	0,840	5	5	5	5
Xmp-11	2,136	4,420	4,930	4,200	5	5	5	5
Xmp-13	0,178	1,752	1,784	1,456	5	5	5	5
Xmp-20	1,308	2,168	3,060	2,750	5	5	5	5
Xmp-22	1,192	2,128	2,445	1,970	6	5	5	5
Xme-1	1,096	1,368	0,908	0,624	5	5	5	5
Xme-14	0,128	0,333	0,447	3,340	5	5	5	5
Xme-16	0,459	2,140	4,050	3,480	-	5	5	5
Xme-20	0,113	0,348	0,505	0,589	6	5	5	5
Xme-23	2,116	2,835	2,880	2,310	5	5	5	5
Xme-2	2,076	2,625	2,365	1,740	5	5	5	5

Legenda: (-) atividade enzimática ausente.

Os ensaios de quantificação enzimática, utilizando xilano como substrato, foram realizados após 48 h de incubação. A atividade enzimática variou de 0,845 U/mL (isolado Xme-14) até 5,093 U/mL (isolado Xap-6) (Figura 10). Os isolados selecionados como melhores produtores de xilanases, Xap-6 (5,093 U/mL), Xmp-9 (5,028 U/mL), Xme-1 (2,870 U/mL), Xme-16 (2,986 U/mL) e Xme-20 (4,630 U/mL), foram selecionados para a identificação molecular e caracterização enzimática.

**Figura 10** - Atividade enzimática dos isolados xilanolíticos, após 48 h de incubação. O ensaio enzimático foi realizado em meio líquido, utilizando xilano como substrato, e a atividade foi expressa em U/mL. Os resultados mostram a média das análises em triplicata e as barras de erro indicam  $\pm$  desvio padrão das médias.



#### 4.2.4 Bactérias lipolíticas

Os isolados produtores de lipase (n=12) apresentaram padrão de crescimento semelhante ao longo das 96 h de incubação em meio caldo tween 80. A maioria dos isolados (n=8) atingiu a fase estacionária após 96 h de incubação, a 37 °C, em aerobiose ou microaerofilia. Os isolados Lab-19 e Lmb-7 apresentaram atividade lipolítica somente nas amostras coletadas após 48 e 72 h de cultivo. Para os demais isolados, a atividade enzimática foi detectada já nas primeiras 24 h de incubação. Vale ressaltar que, nas condições avaliadas, a atividade lipolítica dos isolados selecionados reduziu após 96 h de cultivo (Tabela 8).

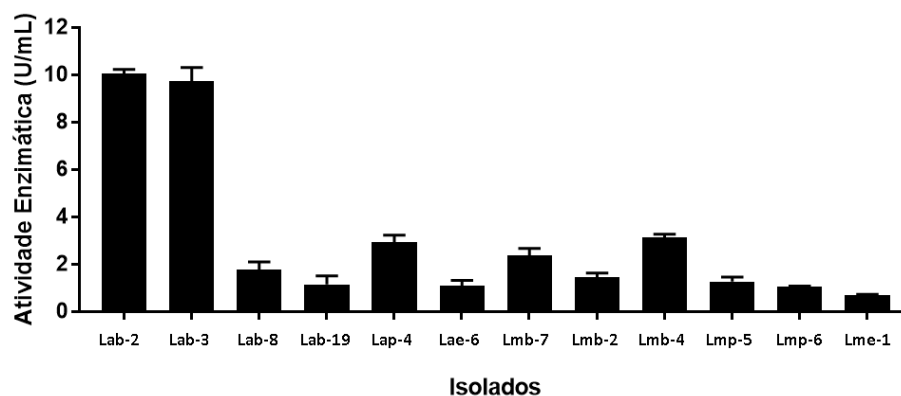
**Tabela 8** -Atividade lipolítica ao longo do crescimento bacteriano. A densidade óptica das culturas foi determinada ( $DO_{600nm}$ ) ao longo de 96h e o sobrenadante das culturas foi avaliado em relação à atividade lipolítica, pelo método de difusão em meio sólido.

Isolados	Absorbância (600 nm)				Zonas de hidrólise (mm)			
	24 h	48 h	72 h	96h	24 h	48 h	72 h	96 h
Lab-2	0,239	0,356	0,748	1,092	14	13	15	8
Lab-3	0,362	1,604	2,440	1,872	15	14	14	-
Lab-8	0,489	1,240	1,460	1,288	18	15	10	-
Lab-19	0,561	0,744	0,976	1,204	-	15	15	-
Lap-4	0,816	2,104	3,470	3,200	18	17	17	15
Lae-6	0,680	0,968	1,565	3,160	21	15	22	19
Lmb-7	0,646	1,024	1,545	2,352	-	17	12	-
Lmb-2	0,550	1,904	1,364	1,720	15	13	13	-
Lmb-4	0,714	1,332	1,524	4,830	15	14	14	-
Lmp-5	0,618	1,312	2,020	3,240	14	16	15	-
Lmp-6	0,660	1,884	2,445	3,810	16	15	15	-
Lme-1	0,313	0,438	1,040	1,955	12	12	13	-

Legenda: (-) atividade enzimática ausente

De acordo com esses resultados foram realizados ensaios de quantificação enzimática após 72 h de incubação, utilizando pNPP como substrato. A atividade enzimática variou de 0,718 U/mL (isolado Lme-1) até 10,064 U/mL (isolado Lab-2). Os isolados Lab-2 (10,064 U/mL), Lab-3 (9,722 U/mL), Lap-4 (2,934 U/mL), Lmb-7 (2,387 U/mL) e Lmb-4 (3,140 U/mL) foram selecionados como os melhores produtores de lipases (Figura 11), sendo utilizados nos experimentos subsequentes.

**Figura 11** - Atividade enzimática dos isolados lipolíticos, após 72 h de incubação. O ensaio enzimático foi realizado em meio líquido, utilizando NPP como substrato, e a atividade foi expressa em U/mL. Os resultados mostram a média das análises em triplicata e as barras de erro indicam  $\pm$  desvio padrão das médias.



### 4.3 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DAS BACTÉRIAS PRODUTORAS DE CELULASE, AMILASE, XILANASE OU LIPASE

O DNA total bacteriano foi eficientemente extraído pelo método fenol-clorofórmio, resultando em amostras com concentração final de 30,4 a 2374,9 ng/ $\mu$ L, assim como baixa contaminação com proteínas e sais (razões 260/280 e 260/230 adequadas). A amplificação da sequência parcial do gene 16S RNAr, utilizando os primers universais, resultou em amplicons de 1500 pb, valor próximo ao esperado (1465 pb). Os produtos de PCR foram sequenciados e as sequências foram comparadas àquelas disponíveis no banco de dados do GenBank.

#### 4.3.1 Bactérias celulolíticas

A análise das sequências parciais do gene 16S RNAr indicou que todos os 5 isolados produtores de celulases pertenciam ao gênero *Bacillus*, sendo identificadas quatro espécies distintas. O isolado AB-9 apresentou maior identidade com *B.siamensis* PD A10 (99 %), o isolado AB-1 com *B. toyonensis* BCT-7112 (99 %), ambos isolados MB-3 e MP-7 com *B.methylotrophicus* CBMB205 (100 % e 90 %, respectivamente) e o

isolado ME-2 apresentou maior identidade com *B.drentensis* NBRC 102427 (99 %) (Tabela 9).

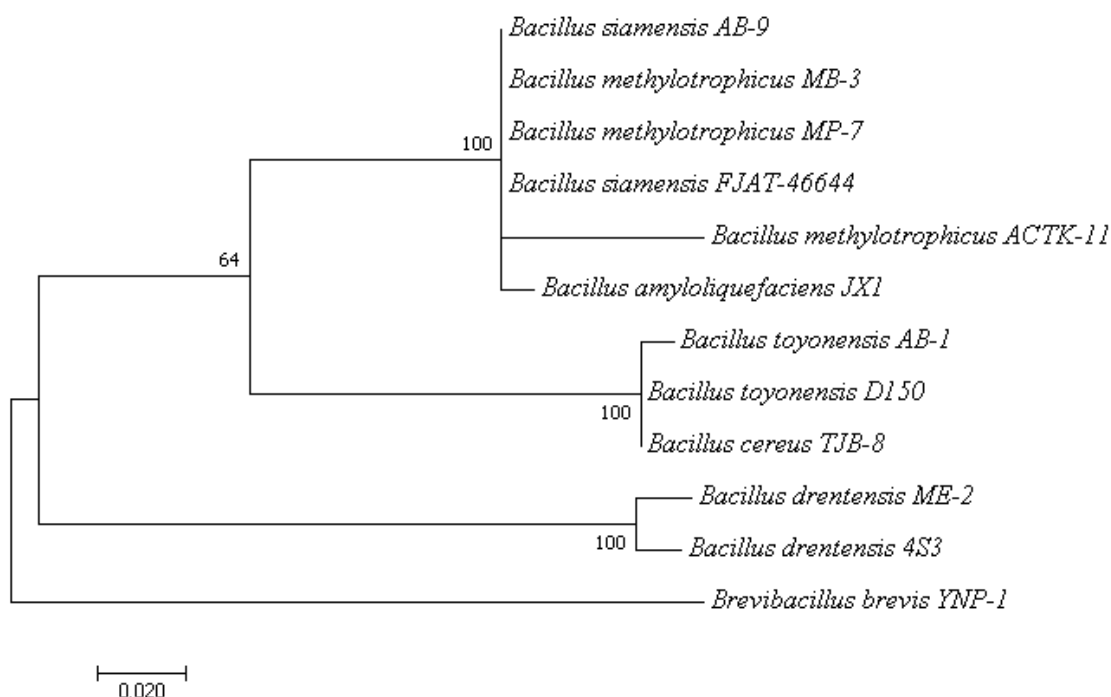
**Tabela 9** - Identificação molecular das bactérias celulolíticas selecionadas. As sequências parciais do gene 16S RNAr foram alinhadas com sequências disponíveis no GenBank, utilizando a ferramenta Blastn.

<b>Isolado/ (Número de acesso)</b>	<b>Alinhamento/ (Número de acesso)</b>	<b>Identidade (%)</b>
AB-9 (MH381824)	<i>Bacillus siamensis</i> PD A10 (NR_117274.1)	99
AB-1 (MH381825)	<i>Bacillus toyonensis</i> BCT-7112 (NR_121761.1)	99
MB-3 (MH381826)	<i>Bacillus methylotrophicus</i> BMB 205 (NR_116240.1)	100
MP-7 (MH381827)	<i>Bacillus methylotrophicus</i> BMB 205 (NR_116240.1)	90
ME-2 (MH381828)	<i>Bacillus drentensis</i> NBRC 102427 (NR_114085.1)	99

As sequências parciais do gene 16S RNAr, obtidas com o sequenciamento, foram depositadas no banco de dados de nucleotídeos do GenBank, com os seguintes números de acesso: MH381824 (*B. siamensis* AB-9), MH381825 (*B. toyonensis* AB-1), MH381826 (*B. methylotrophicus* MB-3), MH381827 (*B. methylotrophicus* MP-7) e MH381828 (*B. drentensis* ME-2).

A reconstrução da árvore filogenética evidenciou que *B. siamensis* AB-9, *B. methylotrophicus* MB-3 e *B. methylotrophicus* MP-7 foram relacionados a *B. toyonensis* AB-1, confirmando que eles pertencem a grupos filogenéticos próximos; enquanto *B. drentensis* ME-2 está menos relacionados aos demais isolados (Figura 12).

**Figura 12** - Árvore filogenética molecular de bactérias celulolíticas isoladas de amostras de solo preservado do bioma Cerrado. A árvore foi baseada na sequência parcial do gene 16S RNAr e reconstruída com o programa MEGA 7.0, utilizando o método de Máxima Verosimilhança baseado no modelo Kimura 2-parâmetros. A medida do comprimento dos ramos indica o número de substituições por sítio e a confiabilidade foi avaliada com *bootstrap* de 1000 repetições. *Brevibacillus brevis* YNP-1 foi utilizado como grupo externo. A escala indica o número de substituições por sítio.



#### 4.3.2 Bactérias amilolíticas

De acordo com a identificação molecular realizada, todas as bactérias amilolíticas pertenciam ao gênero *Bacillus*, sendo identificadas quatro espécies distintas. O isolado AP-14 apresentou maior identidade com *B. methylotrophicus* CBMB205 (99 %), o isolado AE-2 com *B. subtilis* IAM 12118 (99 %), ambos isolados MB-1 e MB-18 com *B. toyonensis* BCT-7112 (99 %) e o isolado MB-22 exibiu maior identidade com *B. pseudomycooides* NBRC 101232 (97 %) (Tabela 10).

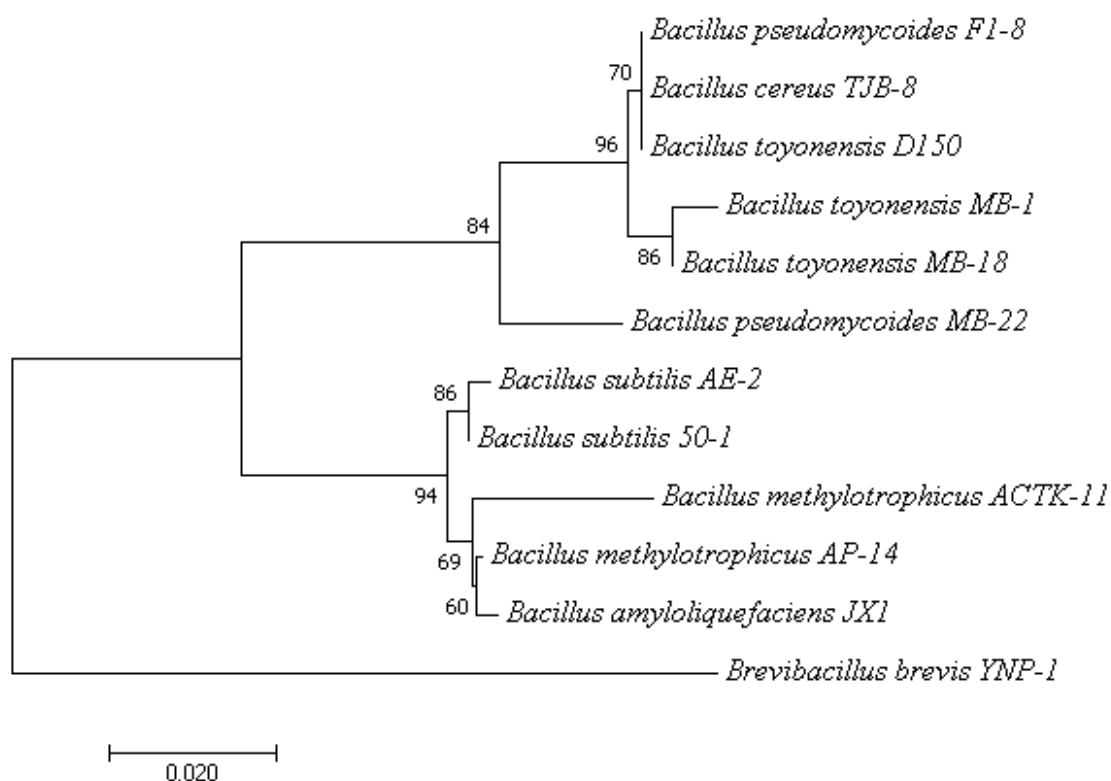
**Tabela 10** - Identificação molecular das bactérias amilolíticas selecionadas. As sequências parciais do gene 16S RNAr foram alinhadas com sequências disponíveis no GenBank, utilizando a ferramenta Blastn.

Isolado/ (Número de acesso)	Alinhamento/ (Número de acesso)	Identidade (%)
AP-14 (MH381819)	<i>Bacillus methylotrophicus</i> CBMB 205 (NR_116240.1)	99
AE-2 (MH381820)	<i>Bacillus subtilis</i> IAM 12118 (NR_112116.2)	99
MB-1 (MH381821)	<i>Bacillus toyonensis</i> BCT-7112 (NR_043403.1)	99
MB-18 (MH381822)	<i>Bacillus toyonensis</i> BCT-7112 (NR_121761.1)	99
MB-22 (MH381823)	<i>Bacillus pseudomycoides</i> NBRC 101232 (NR_113991.1)	97

As sequências parciais do gene 16S RNAr, obtidas com o sequenciamento, foram depositadas no banco de dados de nucleotídeos do GenBank, com os seguintes números de acesso: MH381819 (*B. methylotrophicus* AP-14), MH381820 (*B. subtilis* AE-2), MH381821 (*B. toyonensis* MB-1), MH381822 (*B. toyonensis* MB-18) e MH381823 (*B. pseudomycoides* MB-22).

Com a análise da árvore filogenética, os isolados *B. toyonensis* MB-1, *B. toyonensis* MB-18 e *B. pseudomycoides* MB-22 foram relacionados como grupos próximos, enquanto *B. subtilis* AE-2 e *B. methylotrophicus* AP-14 pertencem a um outro grupo filogenético, também relacionado ao grupo formado pelos outros três isolados (Figura 13).

**Figura 13** - Árvore filogenética molecular de bactérias amilolíticas isoladas de amostras de solo preservado do bioma Cerrado. A árvore foi baseada na sequência parcial do gene 16S RNAr e reconstruída com o programa MEGA 7.0, utilizando o método de Máxima Verosimilhança baseado no modelo Kimura 2-parâmetros. A medida do comprimento dos ramos indica o número de substituições por sítio e a confiabilidade foi avaliada com *bootstrap* de 1000 repetições. *Brevibacillus brevis* YNP-1 foi utilizado como grupo externo. A escala indica o número de substituições por sítio.



### 4.3.3 Bactérias xilanolíticas

O alinhamento das sequências parciais do gene 16S RNAr indicou que todos os isolados xilanolíticos pertenciam ao gênero *Bacillus*, sendo identificadas quatro espécies distintas: o isolado AP-6 apresentou maior identidade com *B. velezensis* FZB 42 (95 %), o isolado MP-9 com *B. toyonensis* BCT-7112 (98 %), os isolados ME-1 e ME-20 exibiram maior identidade com *B. thuringiensis* NBRC 101235 (ambos com 97 %) e o isolado ME-16 denotou maior identidade com *B. pseudomycooides* NBRC 101232 (94 %) (Tabela 11).



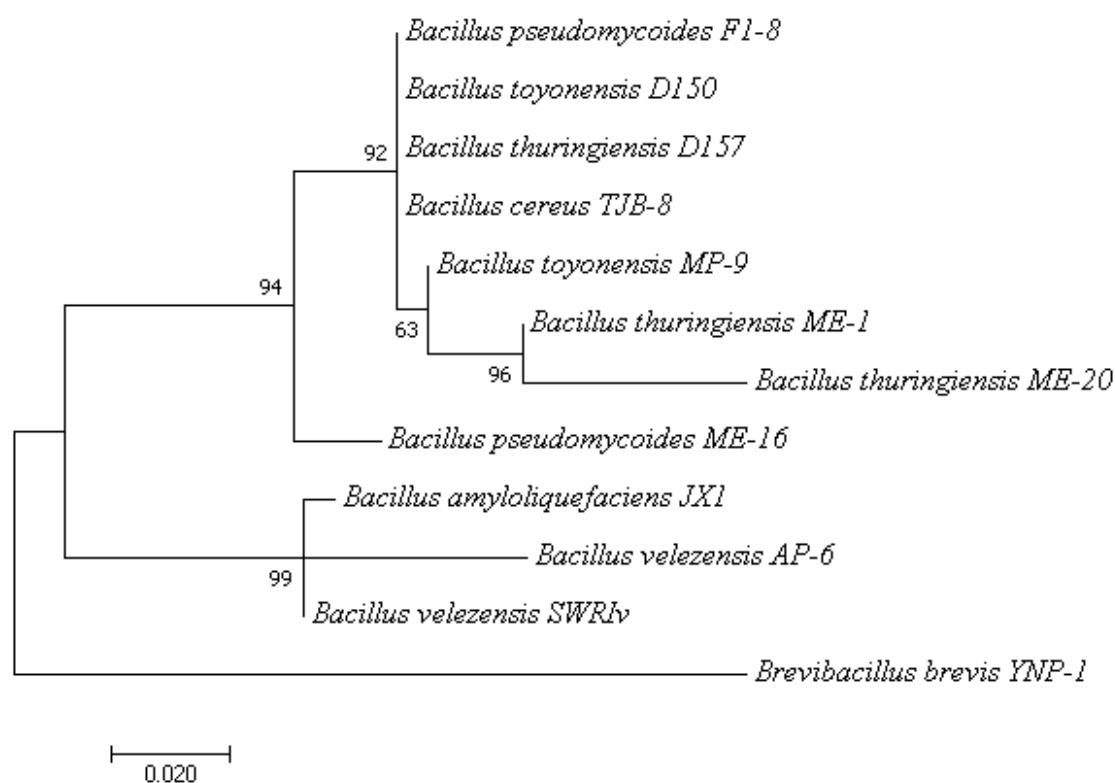
**Tabela 11** - Identificação molecular das bactérias xilanolíticas selecionadas. As sequências parciais do gene 16S RNAr foram alinhadas com sequências disponíveis no GenBank, utilizando a ferramenta Blastn.

<b>Isolado/ (Número de acesso)</b>	<b>Alinhamento/ (Número de acesso)</b>	<b>Identidade (%)</b>
AP-6 (MH381834)	<i>Bacillus velezensis</i> FZB 42 (NR_075005.2)	95
MP-9 (MH381835)	<i>Bacillus toyonensis</i> BCT-7112 (NR_121761.1)	98
ME-1 (MH381836)	<i>Bacillus thuringiensis</i> NBRC 101235 (NR_112780.1)	97
ME-16 (MH381837)	<i>Bacillus pseudomycoides</i> NBRC 101232 (NR_113991.1)	94
ME-20 (MH381838)	<i>Bacillus thuringiensis</i> NBRC 101235 (NR_112780.1)	97

As sequências parciais do gene 16S RNAr, obtidas com o sequenciamento, foram depositadas no banco de dados de nucleotídeos do GenBank, com os seguintes números de acesso: MH381834 (*B. velezensis* AP-6), MH381835 (*B. toyonensis* MP-9), MH381836 (*B. thuringiensis* ME-1), MH381837 (*B. pseudomycoides* ME-16) e MH381838 (*B. thuringiensis* ME-20).

Segundo resultados da árvore filogenética, os isolados *B. toyonensis* MP-9, *B. thuringiensis* ME-1 e *B. thuringiensis* ME-20 foram relacionados a *B. pseudomycoides* ME-16, enquanto *B. velezensis* AP-6 pertence a um grupo menos relacionado aos demais isolados (Figura 14).

**Figura 14** - Árvore filogenética molecular de bactérias xilanolíticas isoladas de amostras de solo preservado do bioma Cerrado. A árvore foi baseada na sequência parcial do gene 16S RNAr e reconstruída com o programa MEGA 7.0, utilizando o método de Máxima Verossimilhança baseado no modelo Kimura 2-parâmetros. A medida do comprimento dos ramos indica o número de substituições por sítio e a confiabilidade foi avaliada com *bootstrap* de 1000 repetições. *Brevibacillus brevis* YNP-1 foi utilizado como grupo externo. A escala indica o número de substituições por sítio.



#### 4.3.4 Bactérias lipolíticas

A análise das sequências parciais do gene 16S RNAr indicou que quatro isolados pertenciam ao gênero *Bacillus* e um ao gênero *Lysinibacillus*, sendo todos de espécies distintas. O isolado AB-2 apontou maior identidade com *B. siamensis* PD-A10 (97 %), o isolado AB-3 com *B. methylotrophicus* CBMB 205 (99 %), o isolado AP-4 com *L. macroides* LMG 18474 (99 %), o isolado MB-7 com *B. thuringiensis* NBRC 101235

(99 %) e o isolado MB-4 exibiu maior identidade com *B. wiedmannii* FSL W8-0169 (99 %) (Tabela 12).

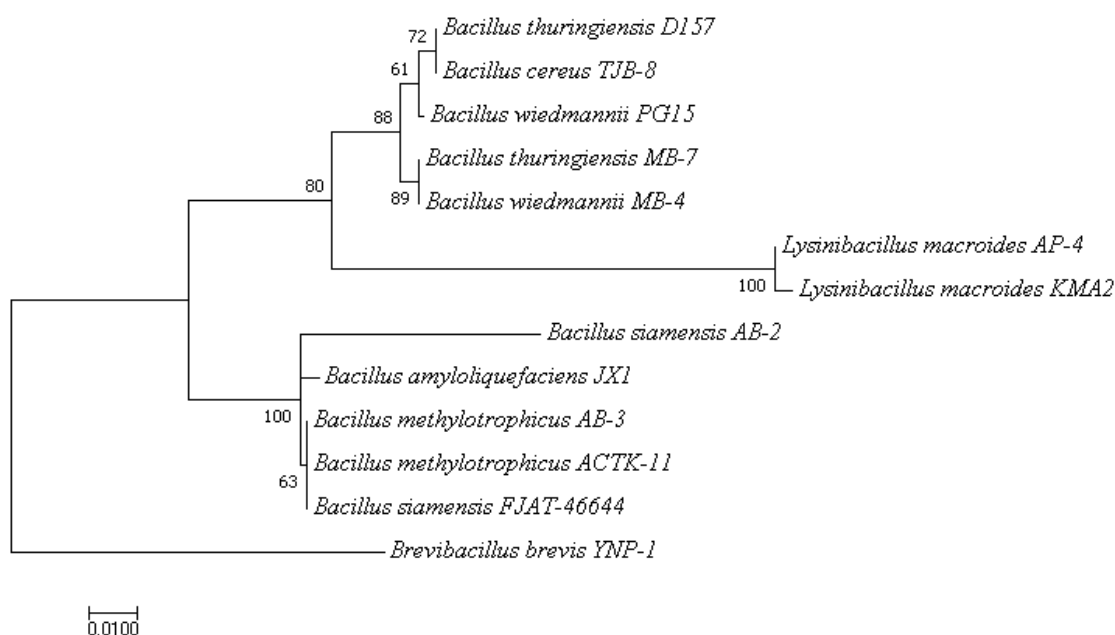
**Tabela 12** - Identificação molecular das bactérias lipolíticas selecionadas. As sequências parciais do gene 16S RNAr foram alinhadas com sequências disponíveis no GenBank, utilizando a ferramenta Blastn.

<b>Isolado/ (Número de acesso)</b>	<b>Alinhamento/ (Número de acesso)</b>	<b>Identidade (%)</b>
AB-2 (MH381829)	<i>Bacillus siamensis</i> PD-A10 (NR_117274.1)	97
AB-3 (MH381830)	<i>Bacillus methylotrophicus</i> CBMB 205 (NR_116240.1)	99
AP-4 (MH381831)	<i>Lysinibacillus macroides</i> LMG 18474 (NR_114920.1)	99
MB-7 (MH381832)	<i>Bacillus thuringiensis</i> NBRC 101235 (NR_112780.1)	99
MB-4 (MH381833)	<i>Bacillus wiedmannii</i> FSL W8-0169 (NR_152692.1)	99

As sequências parciais do gene 16S RNAr, obtidas com o sequenciamento, foram depositadas no banco de dados de nucleotídeos do GenBank, com os seguintes números de acesso: MH381829 (*B. siamensis* AB-2), MH381830 (*B. methylotrophicus* AB-3), MH381831 (*L. macroides* AP-4), MH381832 (*B. thuringiensis* MB-7) e MH381833 (*B. wiedmannii* MB-4).

A reconstrução da árvore filogenética evidenciou que *B. thuringiensis* MB-7 e *B. wiedmannii* MB-4 estão relacionados a *L. macroides* AP-4, enquanto os isolados *B. siamensis* AB-2 e *B. methylotrophicus* AB-3 estão relacionados entre si, e constituem outro grupo próximo ao anterior (Figura 15).

**Figura 15** - Árvore filogenética molecular de bactérias lipolíticas isoladas de amostras de solo preservado do bioma Cerrado. A árvore foi baseada na sequência parcial do gene 16S RNAr e reconstruída com o programa MEGA 7.0, utilizando o método de Máxima Verosimilhança baseado no modelo Kimura 2-parâmetros. A medida do comprimento dos ramos indica o número de substituições por sítio e a confiabilidade foi avaliada com *bootstrap* de 1000 repetições. *Brevibacillus brevis* YNP-1 foi utilizado como grupo externo. A escala indica o número de substituições por sítio.



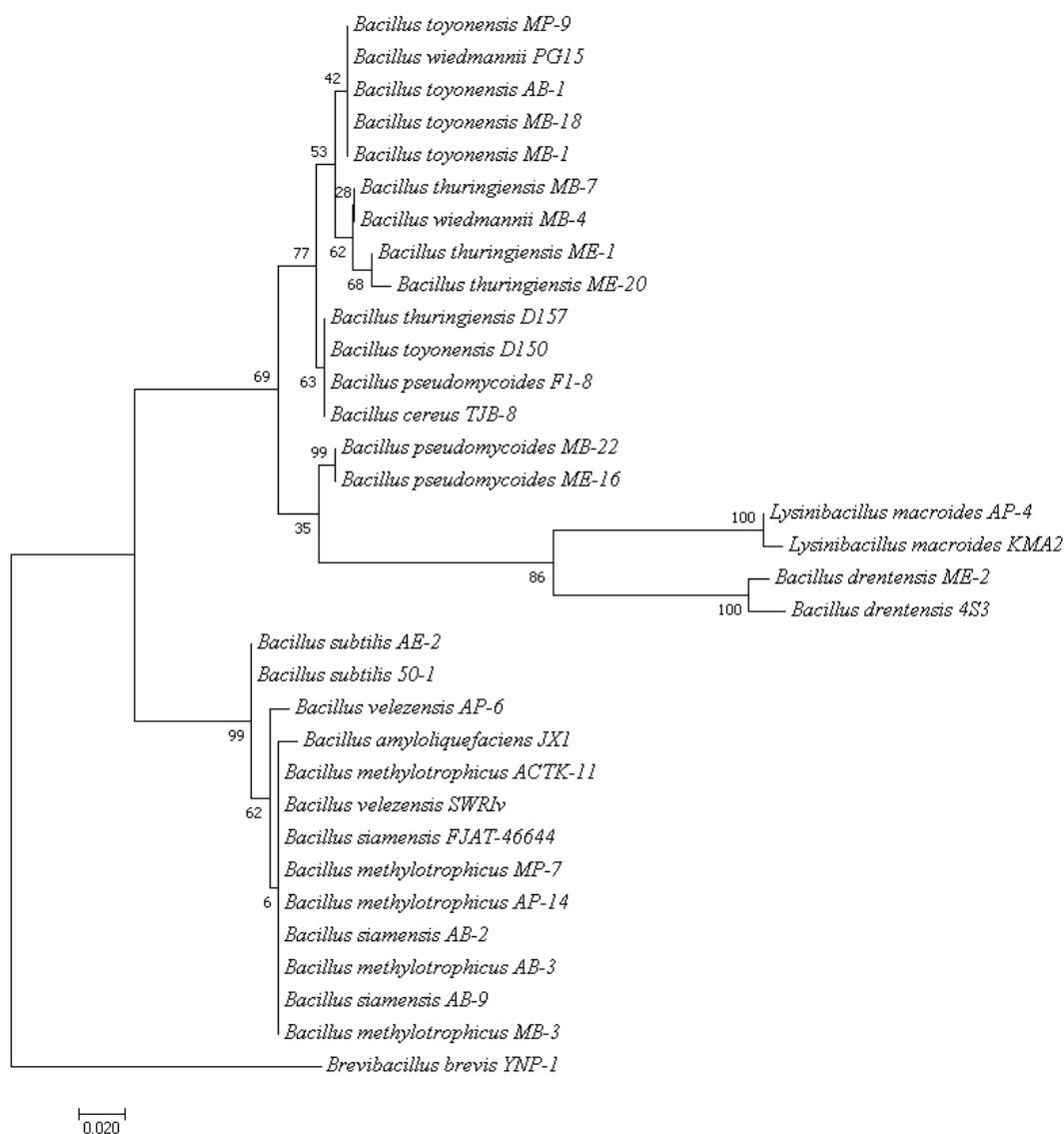
#### 4.3.5 Análise filogenética dos 20 isolados selecionados como os melhores produtores de celulase, amilase, xilanase ou lipase.

Adicionalmente às análises de cada grupo de bactérias produtoras das enzimas de interesse foi também verificada a relação filogenética entre todos os 20 isolados selecionados para a etapa de identificação molecular.

A reconstrução da árvore filogenética evidenciou que esses 20 isolados estão divididos em dois grupos filogenéticos, oriundos de um ancestral comum. *B. toyonensis* MP-9, *B. toyonensis* AB-1, *B. toyonensis* MB-18, *B. toyonensis* MB-1, *B. thuringiensis* MB-7, *B. wiedmannii* MB-4, *B. thuringiensis* ME-1, *B. thuringiensis* ME-20, *B. pseudomycoides* MB-22, *B. pseudomycoides* ME-16, *L. macroides* AP-4 e *B. drentensis* ME-2 foram relacionados como pertencentes a um grupo (Figura 16).

Já os isolados *B. subtilis* AE-2, *B. velezensis* AP-6, *B. methylotrophicus* MP-7, *B. methylotrophicus* AP-14, *B. siamensis* AB-2, *B. methylotrophicus* AB-3, *B. siamensis* AB-9 e *B. methylotrophicus* MB-3 estão relacionados como sendo um outro grupo, próximo ao anterior, confirmando sua relação filogenética (Figura 16).

**Figura 16** -Árvore filogenética molecular das bactérias produtoras de enzimas de interesse biotecnológico, isoladas de amostras de solo preservado do bioma Cerrado. A árvore foi baseada na sequência parcial do gene 16S RNAr e reconstruída com o programa MEGA 7.0, utilizando o método de Máxima Verosimilhança baseado no modelo Kimura 2-parâmetros. A medida do comprimento dos ramos indica o número de substituições por sítio e a confiabilidade foi avaliada com *bootstrap* de 1000 repetições. *Brevibacillus brevis* YNP-1 foi utilizado como grupo externo. A escala indica o número de substituições por sítio.



#### 4.4 CAPACIDADE DE PRODUÇÃO DE MAIS DE UMA CLASSE DE ENZIMA PELOS ISOLADOS SELECIONADOS

Para avaliar a capacidade de produção de outras classes de enzimas além daquelas inicialmente detectadas nos experimentos anteriores, os 20 isolados selecionados foram cultivados em meios contendo CMC, amido, xilano ou Tween 80.

Os isolados *B. toyonensis* AB-1, *B. toyonensis* MB-18, *B. toyonensis* MP-9, *B. thuringiensis* ME-1, *B. pseudomycoides* ME-16, *B. methylotrophicus* AB-3 e *B. wiedmannii* MB-4 foram capazes de produzir todas as enzimas de interesse biotecnológico avaliadas, celulases, amilases, xilanases e lipases, sendo evidenciados halos claros ao redor das colônias nos quatro meios de cultura distintos (Tabela 13).

Nas condições avaliadas, todos os 20 isolados foram capazes de produzir amilases, 7 isolados não produziram xilanases, 8 não produziram lipases e a produção de celulases não foi observada em 3 dos isolados avaliados (Tabela 13).

**Tabela 13** -Atividade enzimática dos 20 isolados selecionados como melhores produtores das enzimas de interesse biotecnológico avaliadas. Cada isolado foi cultivado em meio sólido, contendo diferentes substratos para detecção de atividade das enzimas celulases, amilases, xilanases e lipases. Foi considerado resultado positivo a presença de zonas claras ao redor das colônias.

Atividade inicial	Isolado	Substrato contido no meio de cultura			
		CMC	Amido	Xilano	Tween 80
Celulolíticas	AB-9				
	AB-1				
	MB-3				
	MP-7				
	ME-2				
Amilolíticas	AP-14				
	AE-2				
	MB-1				
	MB-18				
	MB-22				
Xilanolíticas	AP-6				
	MP-9				
	ME-1				
	ME-16				
	ME-20				
Lipolíticas	AB-2				
	AB-3				
	AP-4				
	MB-7				
	MB-4				

Legenda: ( ) atividade enzimática detectada; ( ) ausência de atividade enzimática.

## 4.5 CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA

A influência de fatores como pH, temperatura e presença de íons, sobre a reação enzimática dos melhores produtores selecionados para cada classe de enzimas foi avaliada. Para tanto, a atividade enzimática foi determinada em valores de pH entre 2 e 12, temperaturas de 10 °C a 80 °C, e adição de quatro diferentes íons.

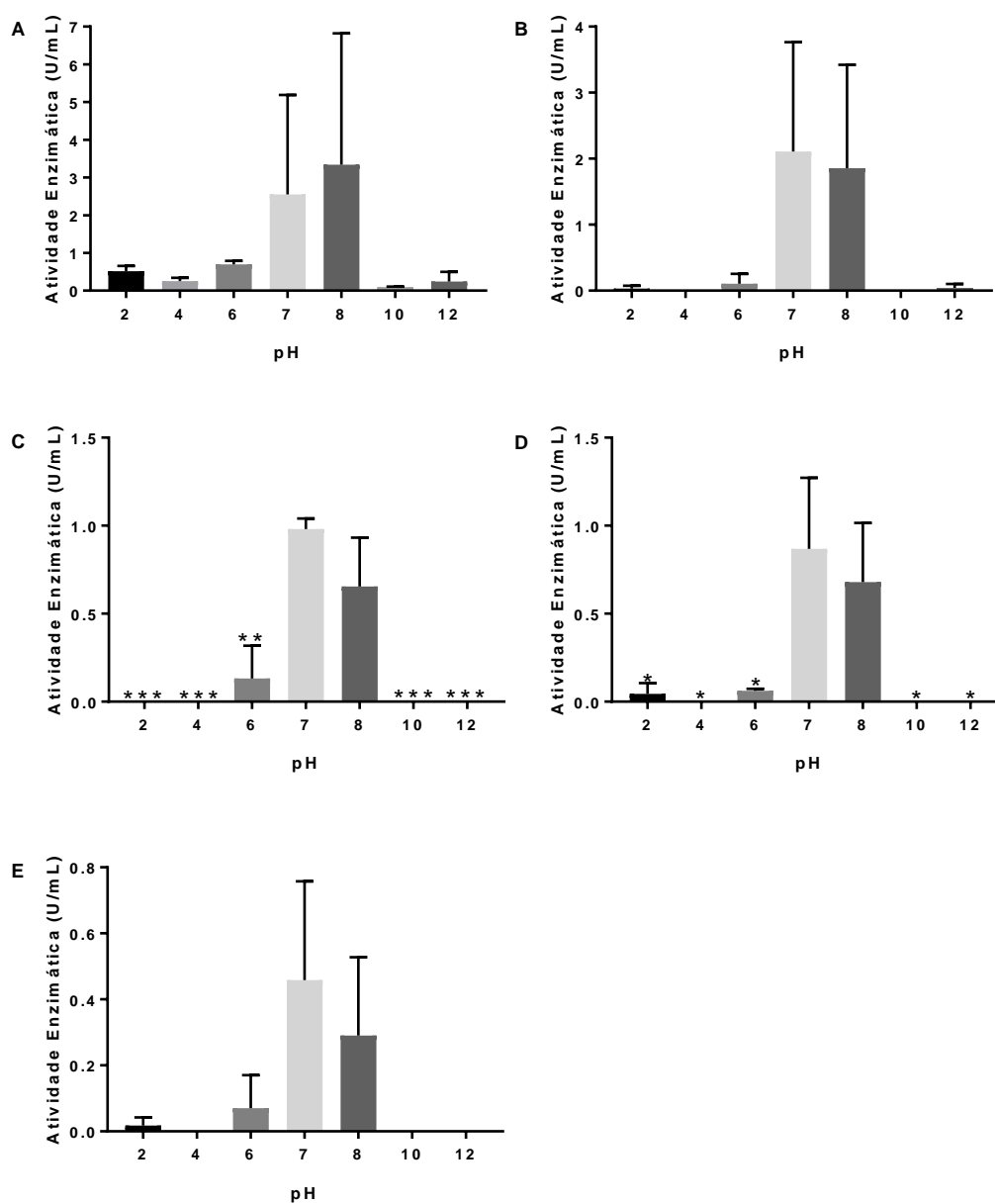
### 4.5.1 Bactérias celulolíticas

O pH exerceu relevante influência sobre a atividade das celulases produzidas pelas bactérias celulolíticas selecionadas. O extrato enzimático obtido a partir de *B. siamensis* AB-9 foi mais estável ao pH, mantendo a atividade celulolítica ao longo de toda a faixa de pH avaliada (2-12) ( $p > 0,05$ ) (Figura 17a). As celulases produzidas por *B. toyonensis* AB-1 e *B. drentensis* ME-2 também foram estáveis nos diferentes pHs avaliados, exceto em pH 4 e 10 para o primeiro, e de 4, 10 e 12 para o segundo, nos quais não foi observada atividade enzimática (Figura 17b, 17e).

*B. methylotrophicus* MP-7 e *B. methylotrophicus* MB-3 produziram celulases com máxima atividade apenas em pH 7 e 8 ( $p > 0,05$ ); enquanto nos demais valores de pH a atividade das celulases reduziu significativamente ( $p < 0,05$ ) (Figura 17c, 17d) e sua atividade relativa ficou abaixo de 80 % (Anexo).



**Figura 17** - Efeito do pH (2-12) sobre a atividade celulolítica (U/mL) de extratos enzimáticos obtidos a partir de bactérias celulolíticas isoladas de solo preservado no bioma cerrado. (A) *B. siamensis*AB-9; (B) *B. toyonensis*AB-1; (C) *B. methylotrophicus*MP-7; (D) *B. methylotrophicus*MB-3; (E) *B. drentensis*ME-2. Os resultados mostram a média de duplicatas biológicas e as barras de erro indicam  $\pm$  o desvio padrão das médias. Asteriscos indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ); quanto maior o número de asteriscos, maior a diferença estatística em relação à máxima atividade enzimática.

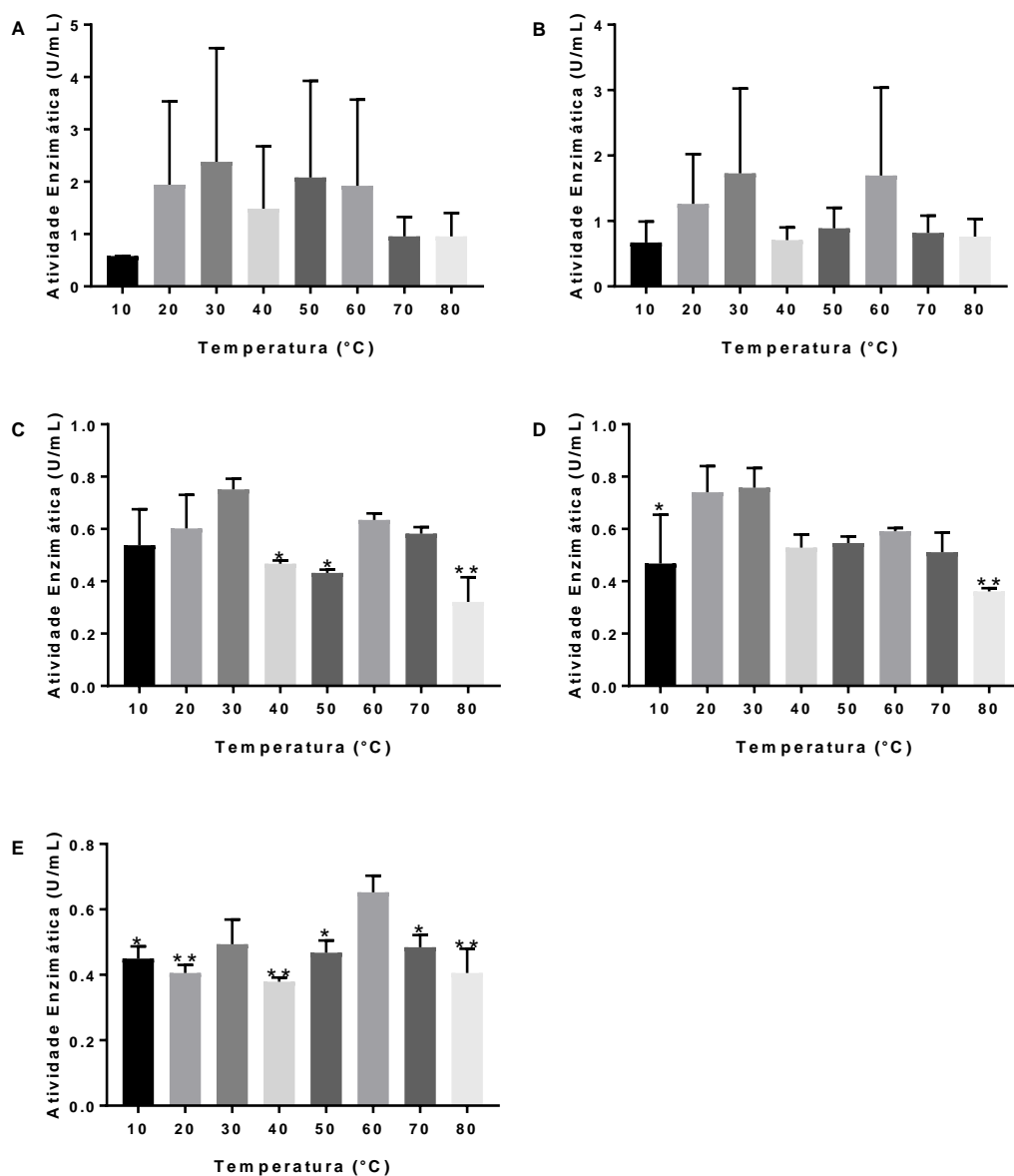


A atividade hidrolítica das celulases também variou conforme a temperatura da reação. *B. siamensis* AB-9 e *B. toyonensis* AB-1 produziram celulases com catálise enzimática em ampla faixa de temperatura, exibindo elevada atividade enzimática em todas as temperaturas analisadas (10-80 °C) ( $p > 0,05$ ) (Figura 18a, 18b). O extrato enzimático obtido a partir de *B. methylotrophicus* MP-7 apresentou maior atividade celulolítica nas temperaturas de 10-30 °C e 60-70 °C ( $p > 0,05$ ) (Figura 18c), enquanto para *B. methylotrophicus* MB-3 máxima atividade celulolítica foi obtida na faixa de 20 à 70 °C ( $p > 0,05$ ) (Figura 18d). Além disso, a atividade relativa das demais temperaturas, para ambos isolados *B. methylotrophicus*, permaneceu abaixo de 62 % (Anexo).

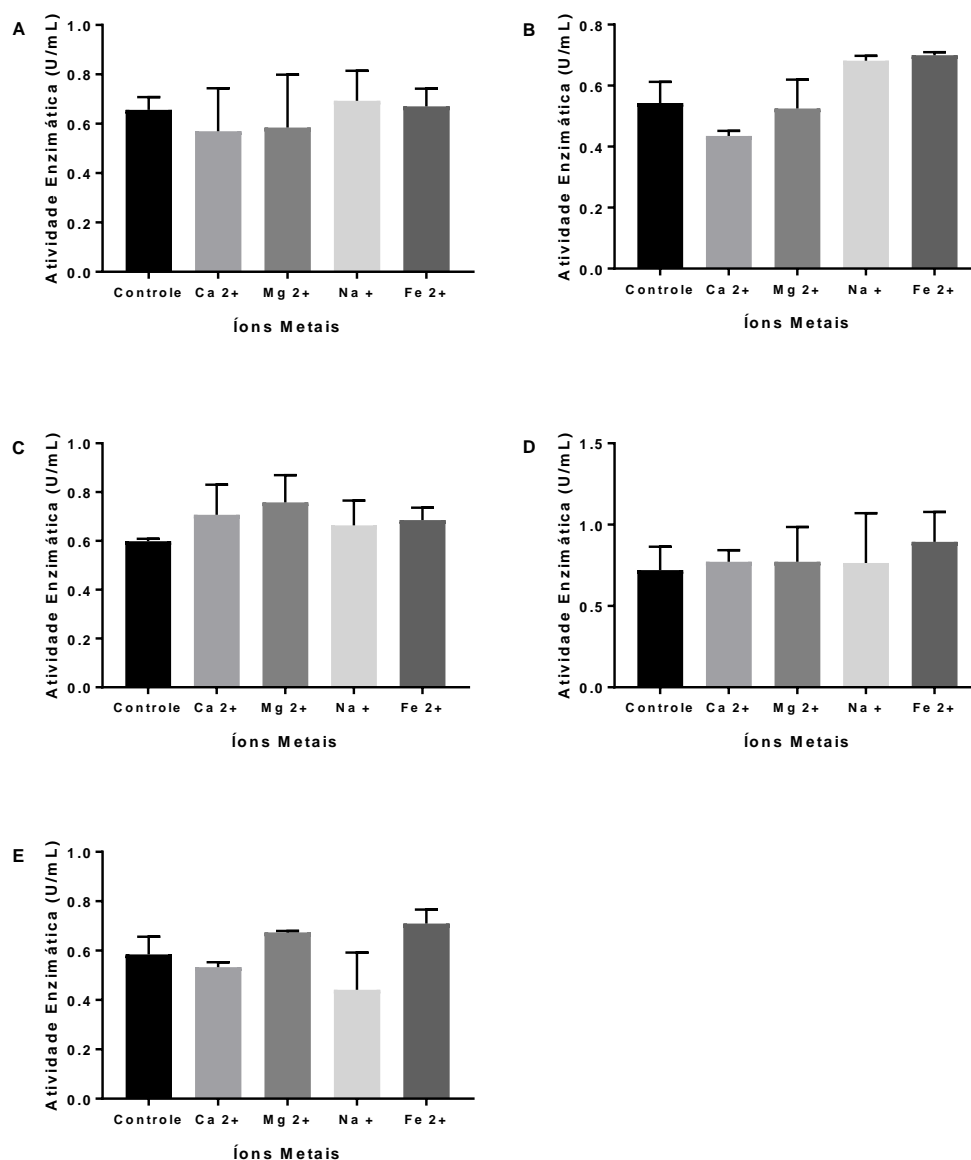
Já as celulases produzidas por *B. drentensis* ME-2 foram as mais influenciadas pela temperatura: maior atividade enzimática foi observada a 30 e 60 °C ( $p > 0,05$ ), enquanto nas demais temperaturas foram observadas reduções significativas nessa atividade ( $p < 0,05$ ) (Figura 18e), sendo a atividade relativa inferior a 75 % (Anexo).

A presença de íons não influenciou a atividade celulolítica dos extratos enzimáticos obtidos a partir das bactérias com comprovada atividade celulolítica ( $p > 0,05$ ) (Figura 19).

**Figura 18** - Efeito da temperatura (10-80 °C) sobre a atividade celulolítica (U/mL) de extratos enzimáticos obtidos a partir de bactérias celulolíticas isoladas de solo preservado no bioma cerrado. (A) *B. siamensis*AB-9; (B) *B. toyonensis*AB-1; (C) *B. methylotrophicus*MP-7; (D) *B. methylotrophicus*MB-3; (E) *B. drentensis*ME-2. Os resultados mostram a média de duplicatas biológicas e as barras de erro indicam  $\pm$  o desvio padrão das médias. Asteriscos indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ); quanto maior o número de asteriscos, maior a diferença estatística em relação à máxima atividade enzimática.



**Figura 19** -Efeito de íons metálicos ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  e  $\text{Fe}^{2+}$ ; 5 mM) sobre a atividade celulolítica (U/mL) de extratos enzimáticos obtidos a partir de bactérias celulolíticas isoladas de solo preservado no bioma cerrado. (A) *B. siamensis*AB-9; (B) *B. toyonensis*AB-1; (C) *B. methylotrophicus*MP-7; (D) *B. methylotrophicus*MB-3; (E) *B. drentensis*ME-2. Os resultados mostram a média de duplicatas biológicas e as barras de erro indicam  $\pm$  o desvio padrão das médias. Asteriscos indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ); quanto maior o número de asteriscos, maior a diferença estatística em relação à máxima atividade enzimática.

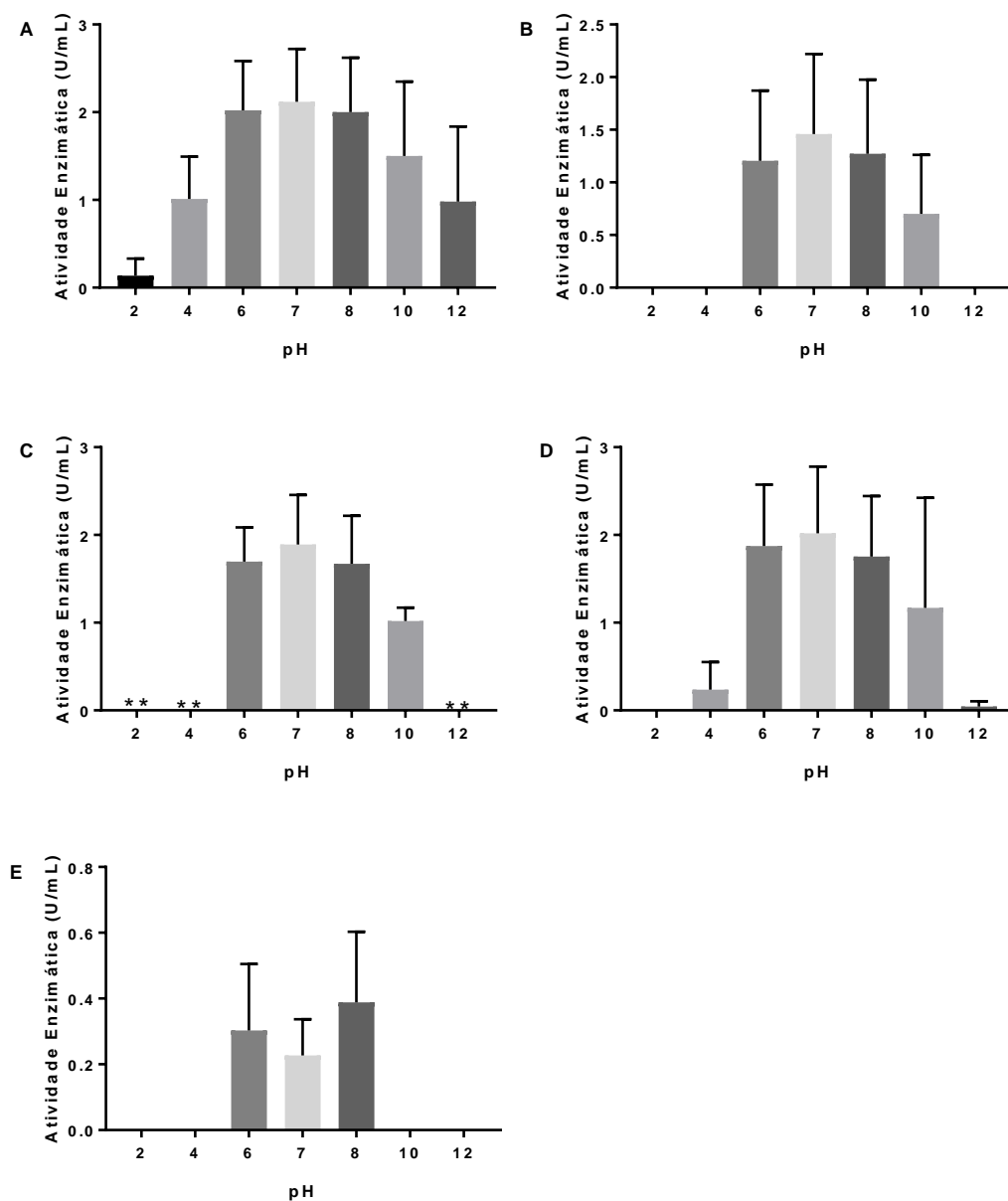


#### 4.5.2 Bactérias amilolíticas

O pH da reação influenciou de forma similar as amilases produzidas pela maioria dos isolados amilolíticos avaliados. *B. methylotrophicus* AP-14 produziu amilases com maior atividade em todos os valores de pH de 2 a 12 ( $p > 0,05$ ) (Figura 20a). Já amilases obtidas a partir de *B. subtilis* AE-2, *B. toyonensis* MB-18 e *B. pseudomycooides* MB-22 também foram estáveis nos pHs avaliados, exceto em pH 2, 4 e 12 para o primeiro, 2 para o segundo e 2, 4, 10 e 12 para o terceiro isolado, nos quais não foi constatada atividade enzimática (Figura 20b, 20d, 20e).

Já as amilases produzidas por *B. toyonensis* MB-1 apresentaram máxima atividade em pH 6 até 10 ( $p > 0,05$ ). Para esse isolado, valores extremos de pH (2, 4 e 12) inibiram totalmente a atividade enzimática ( $p < 0,05$ ) (Figura 20c) resultando em 0 % de atividade relativa (Anexo).

**Figura 20** - Efeito do pH (2-12) sobre a atividade amilolítica (U/mL) de extratos enzimáticos obtidos a partir de bactérias amilolíticas isoladas de solo preservado no bioma cerrado. (A) *B. methylotrophicus* AP-14; (B) *B. subtilis* AE-2; (C) *B. toyonensis* MB-1; (D) *B. toyonensis* MB-18; (E) *B. pseudomycooides* MB-22. Os resultados mostram a média de duplicatas biológicas e as barras de erro indicam  $\pm$  o desvio padrão das médias. Asteriscos indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ); quanto maior o número de asteriscos, maior a diferença estatística em relação à máxima atividade enzimática

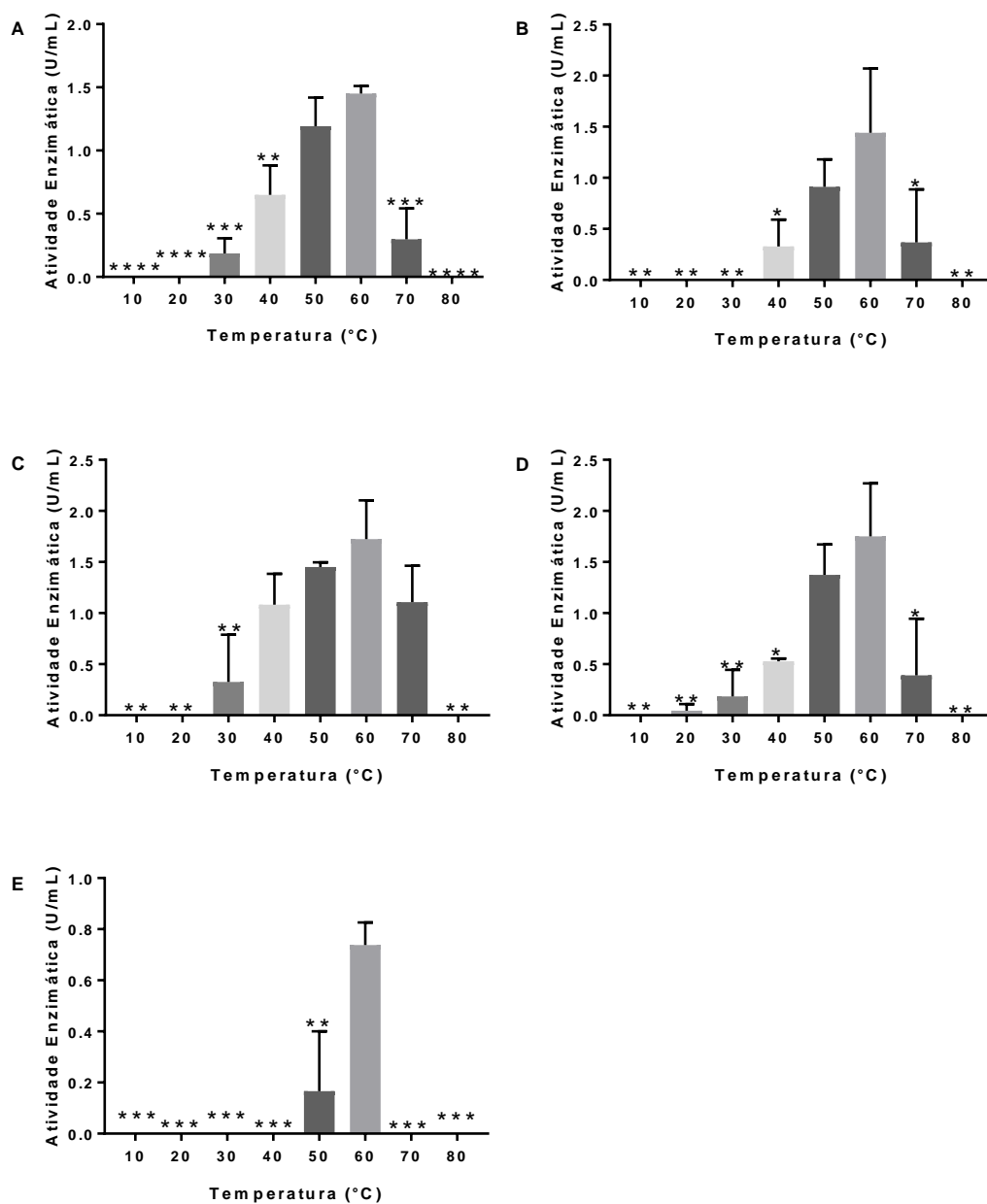


A temperatura exerceu importante influência sobre a atividade amilolítica dos extratos enzimáticos. Os extratos obtidos a partir de *B. methylotrophicus* AP-14, *B. subtilis* AE-2 e *B. toyonensis* MB-18 obtiveram máxima atividade enzimática em temperaturas de 50 e 60 °C ( $p > 0,05$ ) (Figura 21a, 21b, 21d), com atividade relativa superior a 65 %. As amilases produzidas por *B. toyonensis* MB-1 apresentaram maior atividade hidrolítica na faixa de temperatura de 40 à 70 °C ( $p > 0,05$ ) (Figura 21c). Para esses quatro isolados, nas demais temperaturas avaliadas, a atividade das amilases foi reduzida ( $p < 0,05$ ), apresentando atividade relativa abaixo de 16 % (Anexo).

O extrato enzimático obtido a partir de *B. pseudomycooides* MB-22 foi o que sofreu maior influência da temperatura durante a reação: maior atividade enzimática foi observada à 60 °C ( $p > 0,05$ ) (Figura 21e), sendo a atividade relativa inferior à 21% em todas as demais temperaturas avaliadas (Anexo).

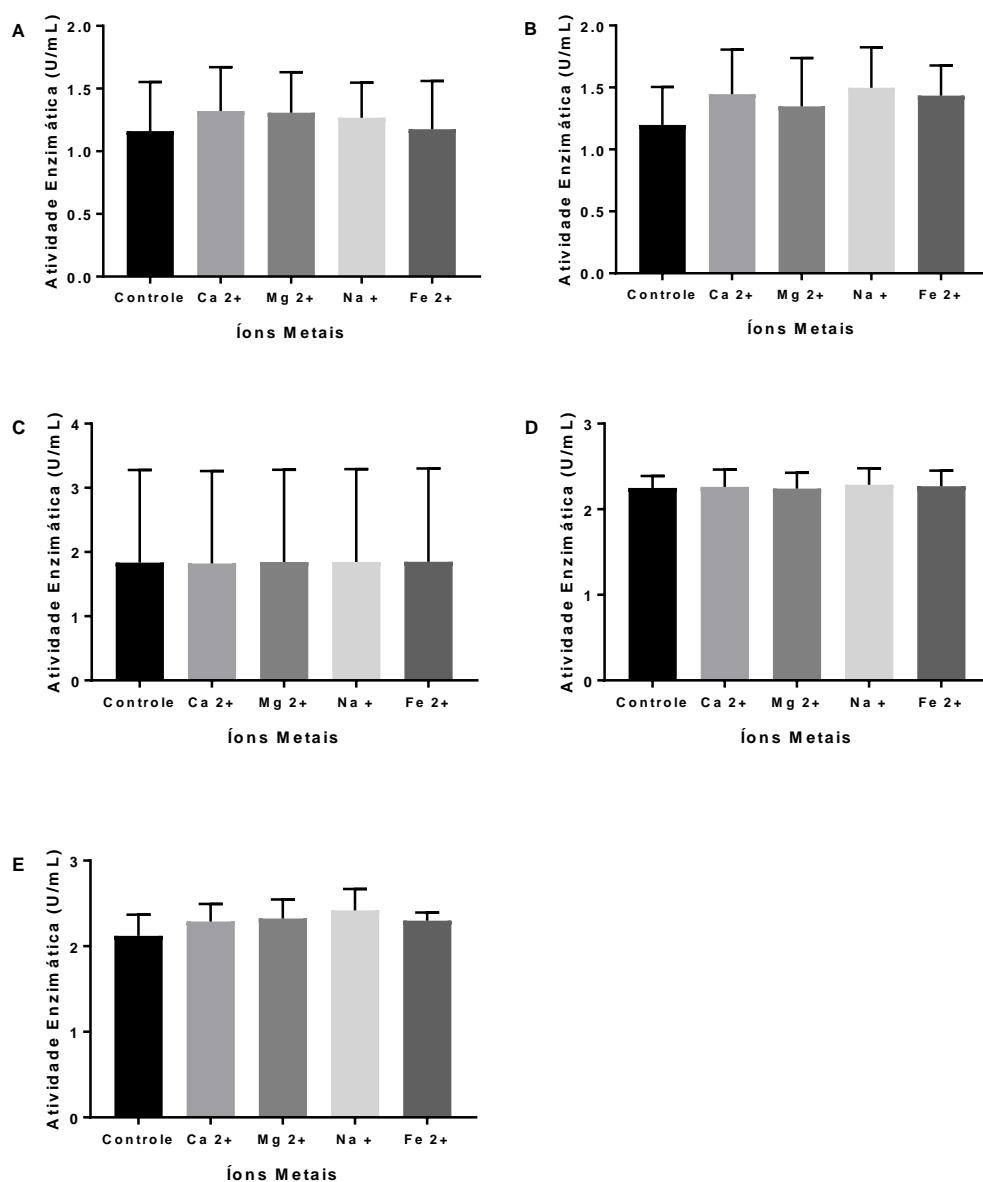
Em relação à presença de íons metálicos, nenhum dos extratos amilolíticos sofreu influência em sua atividade enzimática ( $p > 0,05$ ) (Figura 22).

**Figura 21** - Efeito da temperatura (10-80 °C) sobre a atividade amilolítica (U/mL) de extratos enzimáticos obtidos a partir de bactérias amilolíticas isoladas de solo preservado no bioma cerrado. (A) *B. methylotrophicus* AP-14; (B) *B. subtilis* AE-2; (C) *B. toyonensis* MB-1; (D) *B. toyonensis* MB-18; (E) *B. pseudomycooides* MB-22. Os resultados mostram a média de duplicatas biológicas e as barras de erro indicam  $\pm$  o desvio padrão das médias. Asteriscos indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ); quanto maior o número de asteriscos, maior a diferença estatística em relação à máxima atividade enzimática.





**Figura 22** - Efeito de íons metálicos ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  e  $\text{Fe}^{2+}$ ; 5 mM) sobre a atividade amilolítica (U/mL) de extratos enzimáticos obtidos a partir de bactérias amilolíticas isoladas de solo preservado no bioma cerrado. (A) *B. methylotrophicus* AP-14; (B) *B. subtilis* AE-2; (C) *B. toyonensis* MB-1; (D) *B. toyonensis* MB-18; (E) *B. pseudomycoides* MB-22. Os resultados mostram a média de duplicatas biológicas e as barras de erro indicam  $\pm$  o desvio padrão das médias. Asteriscos indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ); quanto maior o número de asteriscos, maior a diferença estatística em relação à máxima atividade enzimática.

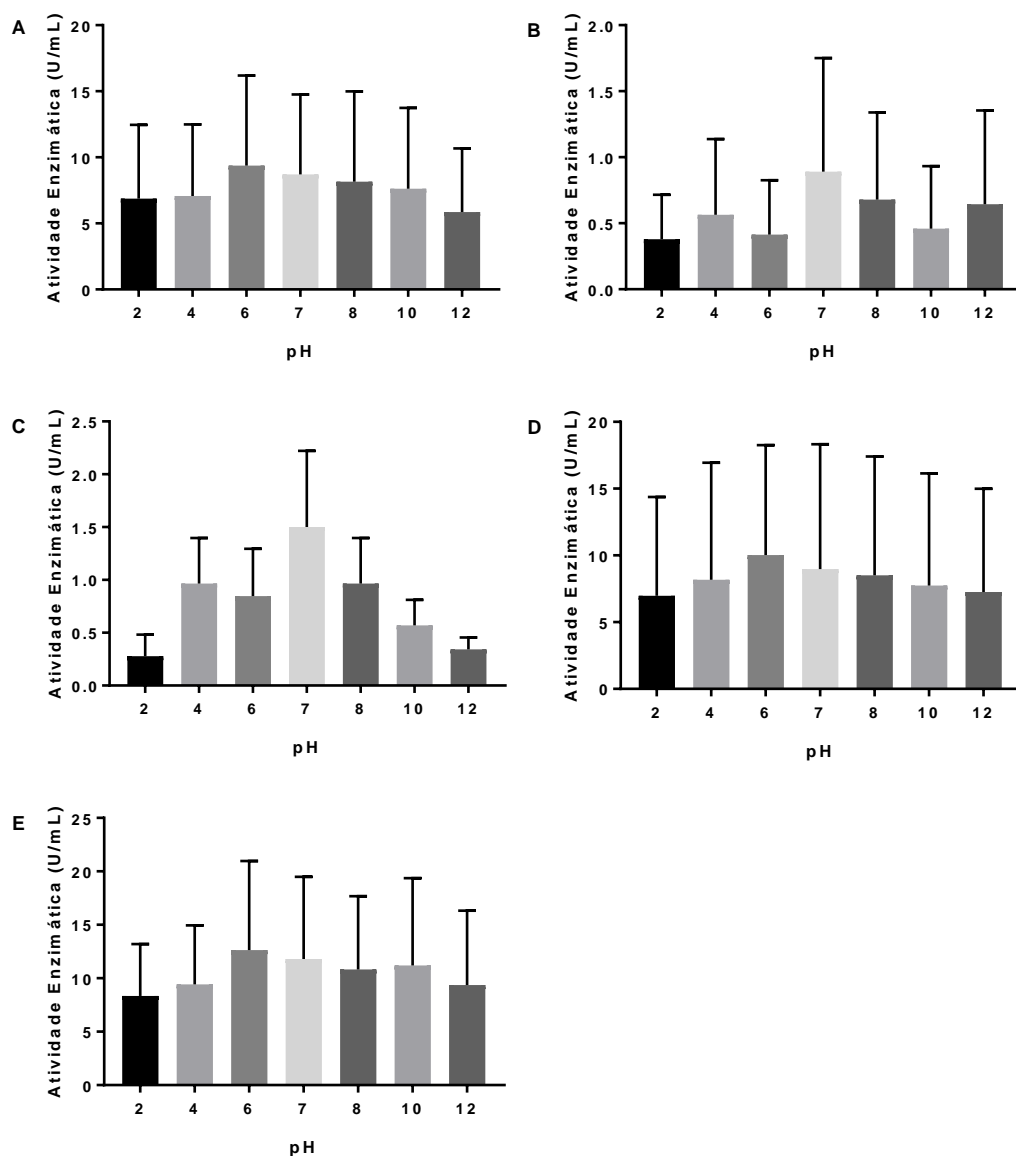


### 4.5.3 Bactérias xilanolíticas

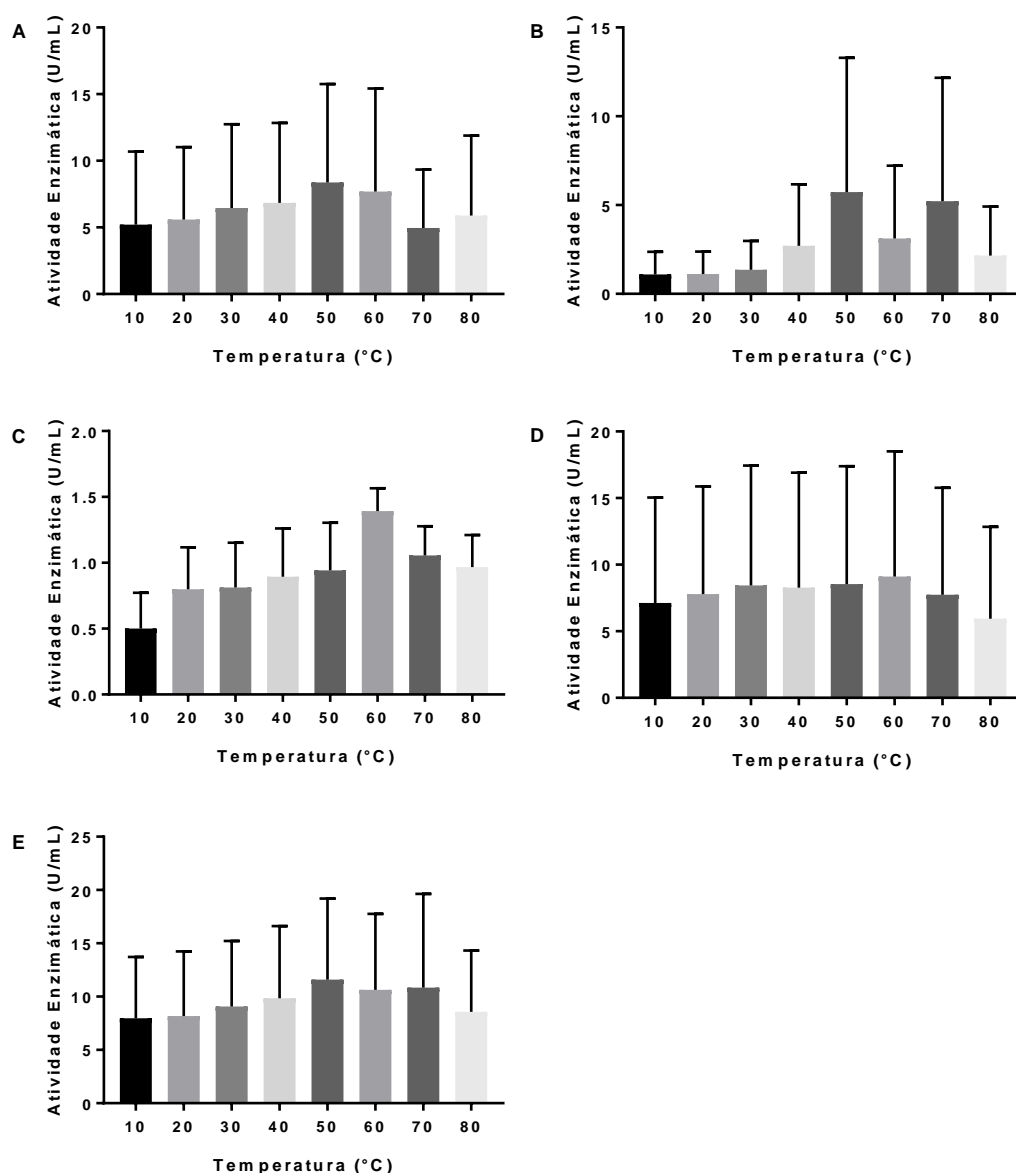
O pH e a temperatura da reação não afetaram a atividade das enzimas xilanolíticas. Os extratos enzimáticos obtidos a partir dos cinco isolados xilanolíticos foram estáveis às variações de pH e temperatura, apresentando máxima atividade enzimática em todos os valores de pH avaliados (2-12) ( $p > 0,05$ ) (Figura 23) assim como de temperatura (10-80 °C) (Figura 24).

A maioria dos extratos obtidos a partir dos isolados xilanolíticos não foi influenciada pela presença de íons na reação enzimática, exceto o extrato obtido a partir de *B. toyonensis* MP-9, cuja atividade xilanolítica foi aumentada na presença de  $Fe^{2+}$  ( $p < 0,05$ ) (Figura 25b), sendo a atividade relativa de 105% (Anexo).

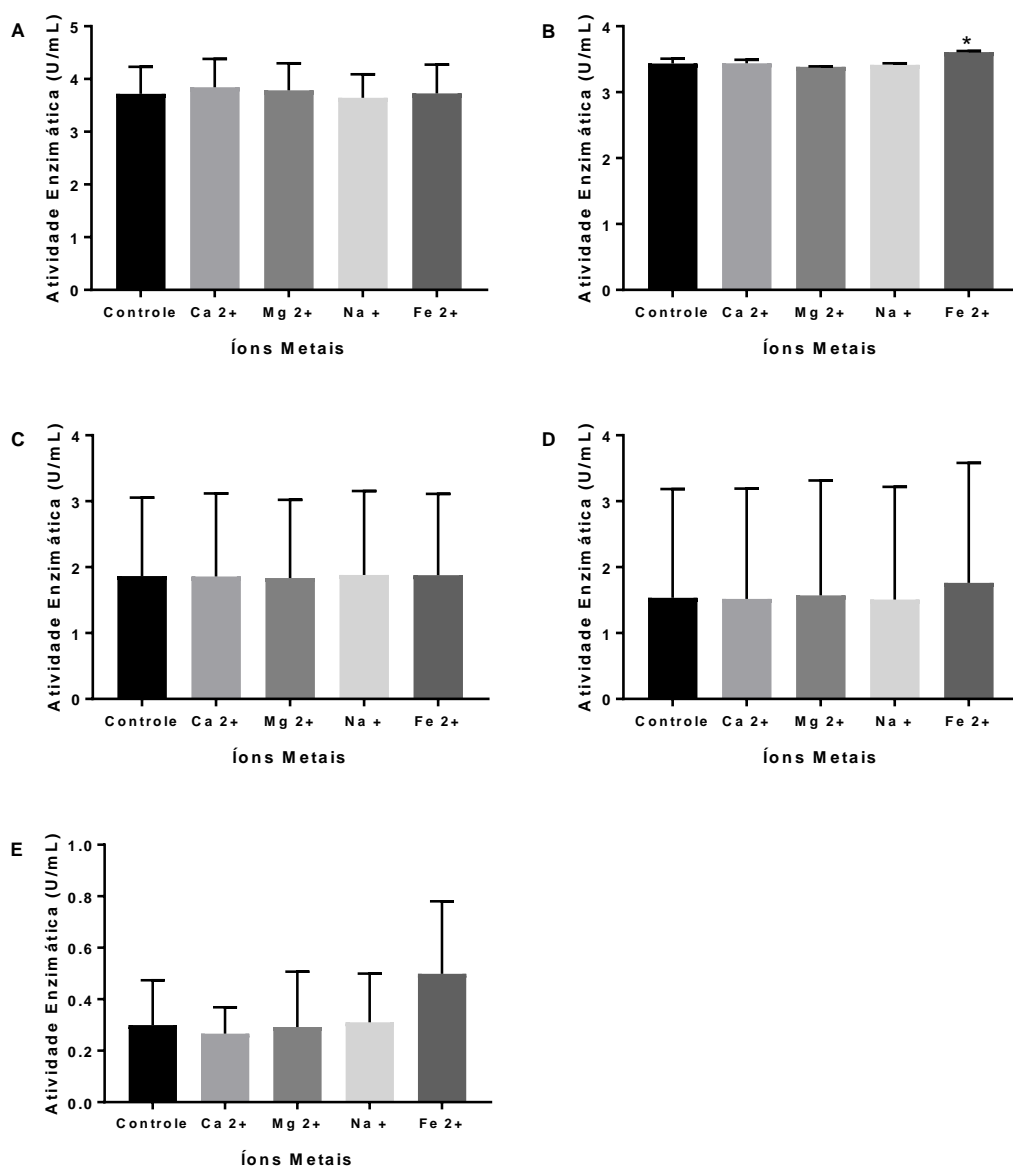
**Figura 23** - Efeito do pH (2-12) sobre a atividade xilanolítica (U/mL) de extratos enzimáticos obtidos a partir de bactérias xilanolíticas isoladas de solo preservado no bioma cerrado. (A) *B. velezensis* AP-6; (B) *B. toyonensis* MP-9; (C) *B. thuringiensis* ME-1; (D) *B. pseudomycooides* ME-16; (E) *B. thuringiensis* ME-20. Os resultados mostram a média de duplicatas biológicas e as barras de erro indicam  $\pm$  o desvio padrão das médias. Asteriscos indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ); quanto maior o número de asteriscos, maior a diferença estatística em relação à máxima atividade enzimática.



**Figura 24** - Efeito da temperatura (10-80 °C) sobre a atividade xilanolítica (U/mL) de extratos enzimáticos obtidos a partir de bactérias xilanolíticas isoladas de solo preservado no bioma cerrado. (A) *B. velezensis* AP-6; (B) *B. toyonensis* MP-9; (C) *B. thuringiensis* ME-1; (D) *B. pseudomycooides* ME-16; (E) *B. thuringiensis* ME-20. Os resultados mostram a média de duplicatas biológicas e as barras de erro indicam  $\pm$  o desvio padrão das médias. Asteriscos indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ); quanto maior o número de asteriscos, maior a diferença estatística em relação à máxima atividade enzimática.



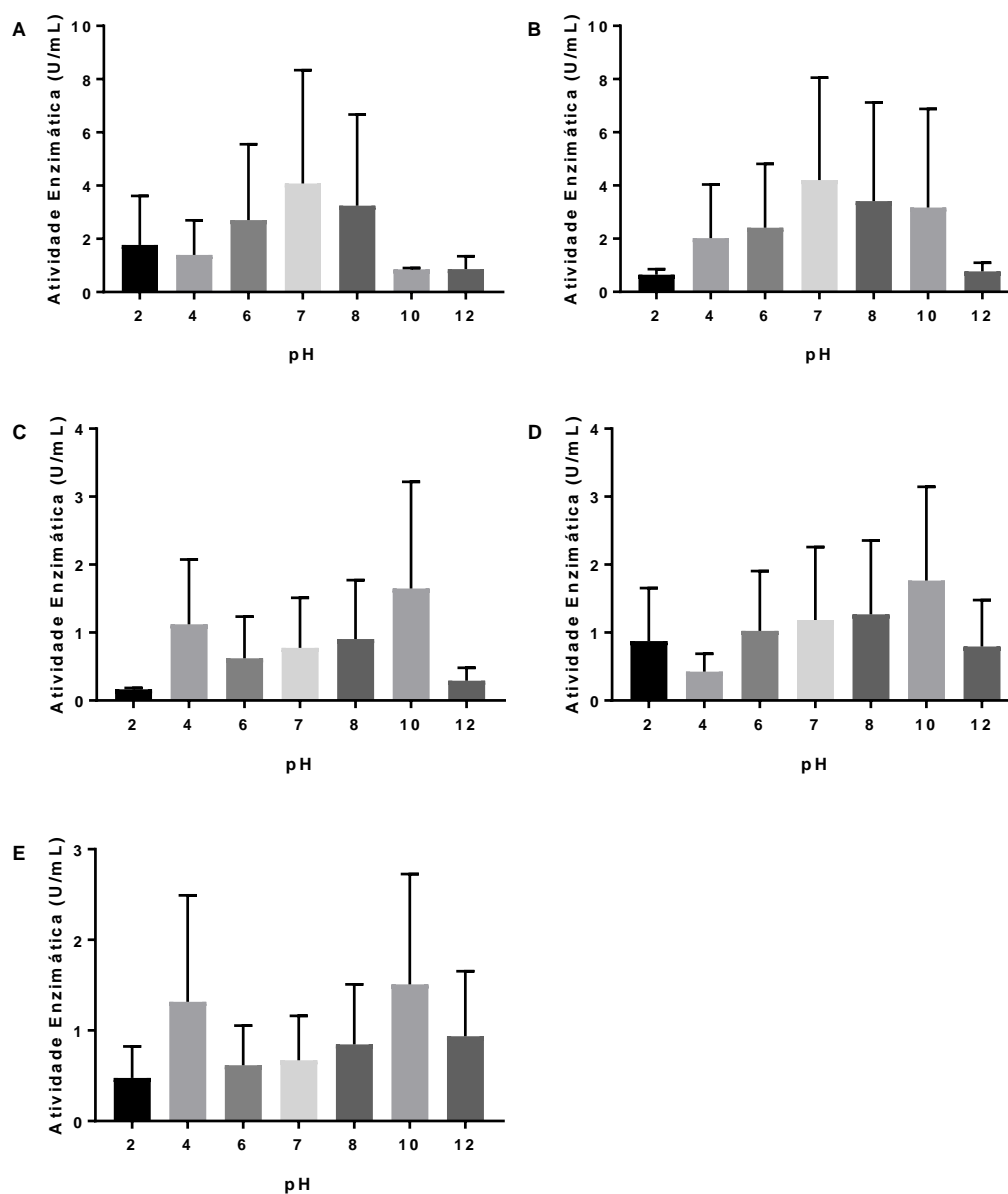
**Figura 25** - Efeito de íons metálicos ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  e  $\text{Fe}^{2+}$ ; 5 mM) sobre a atividade xilanolítica (U/mL) de extratos enzimáticos obtidos a partir de bactérias xilanolíticas isoladas de solo preservado no bioma cerrado. (A) *B. velezensis* AP-6; (B) *B. toyonensis* MP-9; (C) *B. thuringiensis* ME-1; (D) *B. pseudomycooides* ME-16; (E) *B. thuringiensis* ME-20. Os resultados mostram a média de duplicatas biológicas e as barras de erro indicam  $\pm$  o desvio padrão das médias. Asteriscos indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ); quanto maior o número de asteriscos, maior a diferença estatística em relação à máxima atividade enzimática.



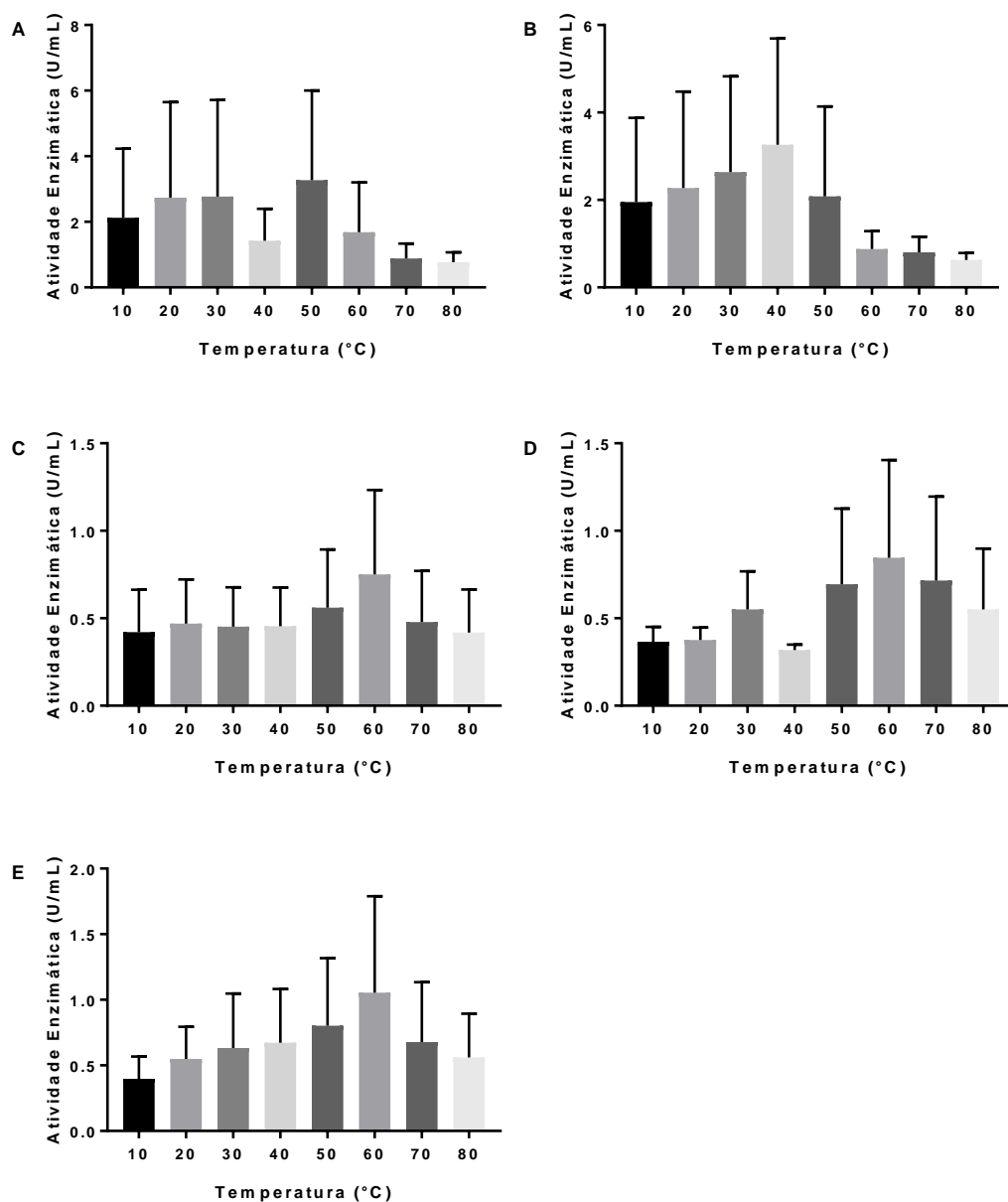
#### **4.5.4 Bactérias lipolíticas**

As atividades hidrolíticas de lipases obtidas a partir dos isolados lipolíticos selecionados não foram alteradas independente do pH (2-12) (Figura 26), da temperatura (10-80 °C) (Figura 27) ou da presença de íons metais (Figura 28) ( $p > 0,05$ ).

**Figura 26** - Efeito do pH (2-12) sobre a atividade lipolítica (U/mL) de extratos enzimáticos obtidos a partir de bactérias lipolíticas isoladas de solo preservado no bioma cerrado. (A) *B. siamensis* AB-2; (B) *B. methylotrophicus* AB-3; (C) *L. macroides* AP-4; (D) *B. thuringiensis* MB-7; (E) *B. wiedmannii* MB-4. Os resultados mostram a média de duplicatas biológicas e as barras de erro indicam  $\pm$  o desvio padrão das médias. Asteriscos indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ); quanto maior o número de asteriscos, maior a diferença estatística em relação à máxima atividade enzimática.

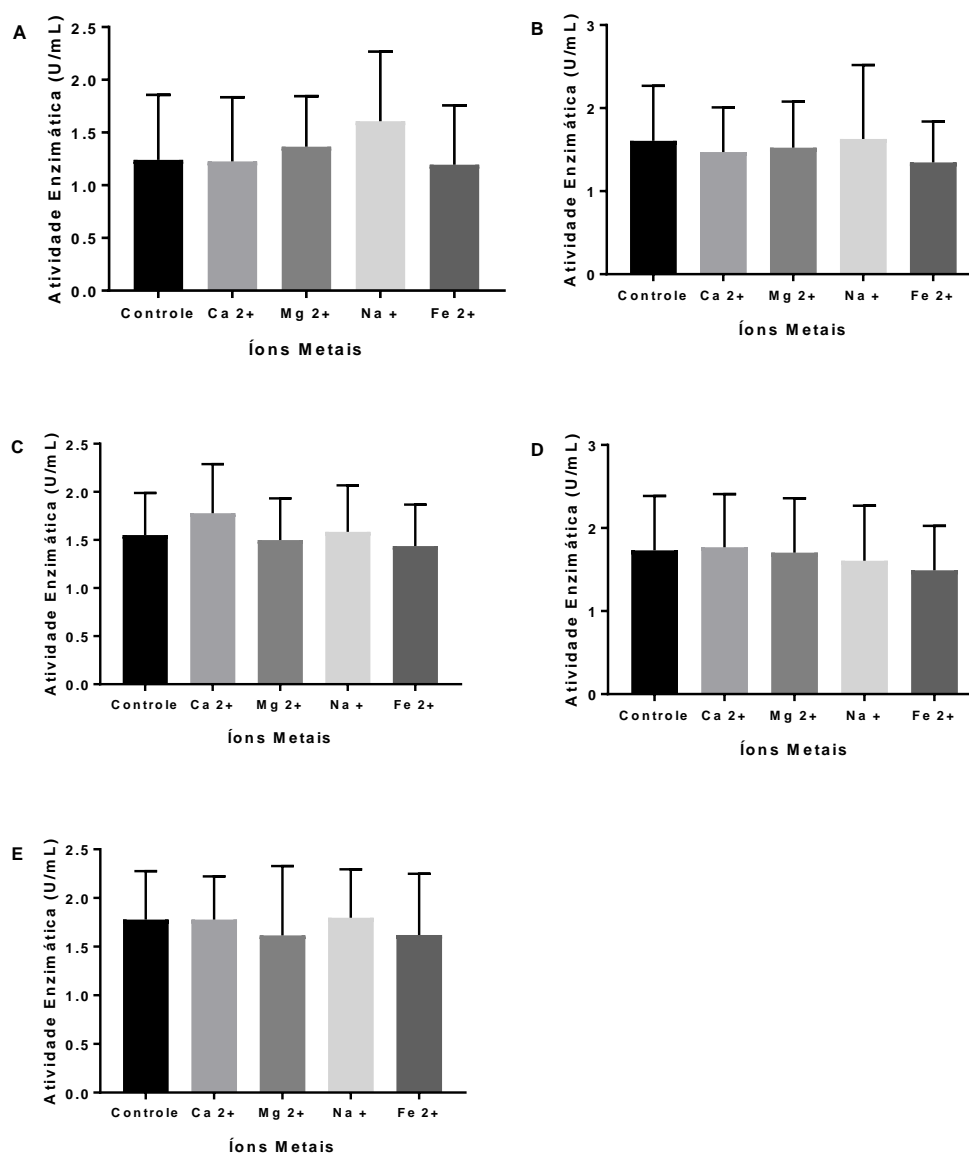


**Figura 27** - Efeito da temperatura (10-80 °C) sobre a atividade lipolítica (U/mL) de extratos enzimáticos obtidos a partir de bactérias lipolíticas isoladas de solo preservado no bioma cerrado. (A) *B. siamensis* AB-2; (B) *B. methylotrophicus* AB-3; (C) *L. macroides* AP-4; (D) *B. thuringiensis* MB-7; (E) *B. wiedmannii* MB-4. Os resultados mostram a média de duplicatas biológicas e as barras de erro indicam  $\pm$  o desvio padrão das médias. Asteriscos indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ); quanto maior o número de asteriscos, maior a diferença estatística em relação à máxima atividade enzimática.





**Figura 28** - Efeito de íons metálicos ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  e  $\text{Fe}^{2+}$ ; 5 mM) sobre a atividade lipolítica (U/mL) de extratos enzimáticos obtidos a partir de bactérias lipolíticas isoladas de solo preservado no bioma cerrado. (A) *B. siamensis* AB-2; (B) *B. methylotrophicus* AB-3; (C) *L. macroides* AP-4; (D) *B. thuringiensis* MB-7; (E) *B. wiedmannii* MB-4. Os resultados mostram a média de duplicatas biológicas e as barras de erro indicam  $\pm$  o desvio padrão das médias. Asteriscos indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ); quanto maior o número de asteriscos, maior a diferença estatística em relação à máxima atividade enzimática.



## 5 DISCUSSÃO

A bioprospecção é uma importante ferramenta para explorar a biodiversidade brasileira de forma sustentável, levando ao desenvolvimento econômico do país. Inúmeros microrganismos têm sido isolados de diversos ambientes a fim de se obter uma produção de compostos bioativos em larga escala, como as enzimas. O aumento da demanda do país por enzimas, aliado à necessidade da utilização de recursos nacionais têm incentivado a busca por microrganismos produtores de enzimas.

Apesar dos avanços nas pesquisas sobre a composição e dinâmica dos ecossistemas, pouco se sabe sobre os microrganismos que habitam o cerrado brasileiro. Tal conhecimento é fundamental, visto que bactérias e fungos são essenciais para a manutenção desse bioma e exibem grande potencial industrial para produção de compostos bioativos, incluindo enzimas.

Alguns microrganismos isolados a partir do Cerrado brasileiro já foram reportados como capazes de produzir enzimas, como celulasas e xilanasas (Nascimento RP *et al.*, 2002; Prado HFA *et al.*, 2010), amilases (dos Santos ER *et al.*, 2012) e lipases (Goldbeck R, Filho FM, 2013) de interesse industrial.

No presente estudo, foi realizado o isolamento de bactérias a partir de amostras de solo coletadas em regiões de mata preservada no bioma Cerrado, em Uberaba, MG. No total, 376 bactérias foram recuperadas a partir do cultivo em meios contendo quatro diferentes substratos, CMC, amido, xilano e tween 80. Após subcultivo nesses mesmos meios, a atividade enzimática foi confirmada, mediante visualização de zonas de hidrólise ao redor das colônias, para 85 isolados, sendo 14 isolados produtores de celulase, 25 de amilase, 20 de xilanase e 26 isolados produtores de lipase.

Após esse *screening*, as bactérias com maior EI foram analisadas quanto ao seu perfil de crescimento e produção enzimática ao longo de 96 h. Em condições de crescimento com disponibilidade de nutrientes, específicas enzimas bacterianas são produzidas em grandes quantidades durante a fase exponencial para degradar determinadas fontes de carbono presentes no meio de cultura e utilizá-las como fonte de energia para multiplicação celular (Madar D *et al.*, 2013). Por esse motivo é essencial a determinação do período de crescimento bacteriano em que a enzima é produzida.

Os isolados obtidos nesse estudo atingiram a fase estacionária de crescimento em diferentes tempos de incubação. Apesar da atividade celulolítica ter sido detectada já nas primeiras 24 h de crescimento, todos os isolados celulolíticos (n=10) atingiram a fase estacionária entre 72 h e 96 h de crescimento. Tiwari R *et al.* (2017) e Ye M *et al.* (2017) reportaram perfis de crescimento semelhantes para linhagens de *B. subtilis* e *Bacillus amyloliquefaciens*, respectivamente, que exibiram máxima produção de celulases após 72 h de cultivo.

No presente trabalho, *B. siamensis* AB-9 foi o isolado que apresentou maior produção de celulases (5,0 U/mL), após 72h tempo de incubação. Resultado semelhante foi constatado por Paudel YP e Qin W (2015) com a linhagem de *Bacillus sp.* K1, que atingiu a maior produção de CMCase (5,21 U/mL) concomitantemente com a entrada na fase estacionária, após 72 h.

Contudo, tal perfil de crescimento e produção enzimática podem variar de acordo com a espécie e as condições de cultivo. Já foram reportados diferentes períodos de incubação para obtenção de melhor atividade celulolítica, como 144 h para *Geobacillus* (Potprommanee L *et al.*, 2017), 60 h para *Paenibacillus* (Liang Y-L *et al.*, 2014), e 48 h e 60 h para o mesmo isolado de *Bacillus sp.* quando incubado na presença ou ausência de agitação (Goyal V *et al.*, 2014).

Em relação aos isolados selecionados como melhores produtores de amilases, o crescimento celular e a produção da enzima ocorreram principalmente entre 48 e 72 h. Em concordância com tais resultados, um período de incubação de aproximadamente 48h foi relatado por outros autores, como sendo o melhor para atingir máxima densidade celular e máxima produção de amilases por *B. subtilis* (Almalki MA, 2018), *B. amyloliquefaciens* e *Lactobacillus fermentum* (Fossi BT *et al.*, 2014), bem como 72 h para *Bacillus sp.* (Saxena R, Singh R, 2011). Por outro lado, outros intervalos ótimos para produção de tais enzimas também já foram observados, como 24 h para *B. subtilis* BI19 (Dash BK, Rahman MM, Sarker PK, 2015) e *Anoxybacillus sp.* AH1 (Acer Ö *et al.*, 2016), e 120 h para uma amilase de *Pyrococcus furiosus* expressa em *B. amyloliquefaciens* (Wang P *et al.*, 2016).

No presente trabalho, *B. methylotrophicus* AP-14 (2,506 U/mL), *B. subtilis* AE-2 (2,452 U/mL) e *B. toyonensis* MB-18 (2,443 U/mL) foram os isolados identificados como os melhores produtores de amilase após 48 h de crescimento. Similar produção de

amilases foi reportada para *Pseudomonas stutzeri* (2,49 U/mL), após 25 h de cultivo (Dutta P, Deb A, Majumdar S, 2016), e por *B. licheniformis* (2,59 U/mL), após incubação de 72 h (Divakaran D, Chandran A, Chandran RP, 2011).

Para a maioria das linhagens xilanolíticas (n=11) a fase estacionária foi atingida entre 48 h e 72 h de incubação e a atividade enzimática apresentou pequena variação ao longo do crescimento bacteriano. Idêntico padrão foi observado para *B. amyloliquefaciens* SK-3, no qual 48 h foi o ponto de máxima densidade celular assim como de atividade enzimática (Kumar S *et al.*, 2017). *Bacillus oceanisediminis* SJ3, também isolado de solo, manteve altas taxas enzimáticas de 48 h até 72 h (Boucherba N *et al.*, 2017). Contudo, distintos tempos de incubação têm sido reportados para a máxima produção de xilanases: 24 h para *Geobacillus stearothermophilus* KIBGE-IB29 (Bibi Z *et al.*, 2014), 56 h para *Bacillus pumilus* VLK-1 (Kumar L *et al.*, 2014), 96 h para *Arthrobacter sp.* MTCC 6915 (Murugan S *et al.*, 2011) e *Bacillus mojavenis* AG137 (Sepahy AA, Ghazi S, Sepahy MA, 2011).

No presente trabalho, *B. velezensis* AP-6 e *B. toyonensis* MP-9, apresentaram elevada atividade xilanolítica após 48 h de crescimento a 37 °C, sendo obtido 5,093 U/mL e 5,028 U/mL, respectivamente. Quantificação enzimática semelhante foi reportada para *Bacillus circulans* D1 após 48 h de crescimento (4,17 U/mL), em meio contendo *birchwood xylan*, mesmo substrato utilizado nesse estudo (Bocchini DA, Gomes E, Da Silva R, 2008).

Os isolados produtores de lipases atingiram a maior densidade óptica após 96 h de incubação, embora uma redução expressiva no diâmetro das zonas de precipitação de sais ao redor dos poços tenha sido observada nesse ponto da curva de crescimento. Por esse motivo, incubação de 72h foi escolhida para a quantificação de lipases produzidas pelos isolados selecionados. Outros trabalhos também já relataram 72 h de cultivo como ótimo para a produção de lipases por bactérias isoladas do solo (Willerding AL *et al.*, 2011; Sahoo RK, Subudhi E, Kumar M, 2014; Koc M, Cokmus C, Cihan AC, 2015).

A máxima produção de lipases extracelulares varia conforme a linhagem e circunstâncias de cultivo, como temperatura, pH e substrato. Já foram reportados tempos de incubação de 48 h para *Geobacillus thermoleovorans* DA2 (Fotouh DMA, Bayoumi RA, Hassan MA, 2016), 96 h para *B. pumilus* (Saranya P *et al.*, 2014) e 14 h para um isolado do gênero *Bacillus* (Rabbani M *et al.*, 2013).

A produção de lipases pelos isolados selecionados variou de 0,718 a 10,064 U/mL. Bisht SS e Panda AA (2011) evidenciaram produção intermediária de lipases, com 36 h de cultivo para *Porphyrobacter* sp AK-P3 (5,5 U/mL), *Acinetobacter* sp AK-P1 (4,5 U/mL) e *Brevibacillus* spp AK-P2 (3,5 U/mL).

A composição microbiana do solo é altamente diversificada e muitas das bactérias cultiváveis, isoladas a partir desse ecossistema, pertencem aos gêneros *Clostridium*, *Corynebacterium* e *Vibrio* (Rahman SS, Siddique R, Tabassum N, 2017), *Streptomyces*, *Rhizobium*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Achromobacter*, *Variovorax* e *Stenotrophomonas* (Bravo D *et al.*, 2015), *Sphingobacterium*, *Acinetobacter*, *Enterobacter* e *Microbacterium* (Lian J *et al.*, 2016).

A identificação molecular dos 20 isolados selecionados como os melhores produtores das enzimas de interesse avaliadas nesse estudo mostrou que apenas um isolado pertence ao gênero *Lysinibacillus*, sendo os demais pertencentes ao gênero *Bacillus*. Esses dois gêneros têm sido reportados em diferentes trabalhos que isolaram bactérias do solo (Vilain S *et al.*, 2006; Chikerema SM *et al.*, 2012; Townsley L *et al.*, 2016; Rabha M *et al.*, 2017; Oh H *et al.*, 2017; Kong D *et al.*, 2014; Gallegos-Monterrosa R *et al.*, 2016; Sun JQ, Xu L, Wu XL, 2017).

Dos 20 isolados, 10 espécies distintas foram identificadas, compreendendo *B. siamensis*, *B. toyonensis*, *B. methylotrophicus*, *B. pseudomycooides*, *B. thuringiensis*, *B. drentensis*, *B. subtilis*, *B. velezensis*, *L. macroides* e *B. wiedmannii*. Dentre essas bactérias, a produção de celulases já foi bem descrita para *B. siamensis* (Meidong R *et al.*, 2017), lipases, celulases a amilases para *B. toyonensis* (Tallur PN *et al.*, 2016) e amilases para *B. subtilis* (Rabbani M *et al.*, 2011). Adicionalmente, *B. methylotrophicus* já foi reportado como produtor de amilase e celulase (Xie F *et al.*, 2014), bem como de lipase (Sharma P *et al.*, 2017), e *B. velezensis* como produtor de xilanase (Chen L *et al.*, 2018).

A maioria dos isolados identificados foram capazes de produzir mais de uma classe de enzimas extracelulares, destacando-se os isolados *B. toyonensis* AB-1, *B. toyonensis* MB-18, *B. toyonensis* MP-9, *B. thuringiensis* ME-1, *B. pseudomycooides* ME-16, *B. methylotrophicus* AB-3 e *B. wiedmannii* MB-4, que foram capazes de produzir todas as quatro enzimas avaliadas neste trabalho.

Essa pluralidade na capacidade de produção de enzimas reflete uma adaptação à variação do ambiente, fato esse que amplia o potencial biotecnológico dos isolados obtidos neste trabalho. Outras linhagens isoladas de solo também já foram descritas como produtoras de mais de um tipo de enzima, demonstrando a versatilidade metabólica das bactérias que habitam esse ambiente (Pohlon E, Fandino AO, Marxsen J, 2013; Alves PDD *et al.*, 2014; Woo HL *et al.*, 2014; López-Mondéjar R *et al.*, 2016).

Diversos fatores físico-químicos podem induzir ou inibir a atividade enzimática em bactérias. Portanto, é fundamental caracterizar as enzimas quanto ao pH, temperatura e influência da presença de cofatores na reação, visando otimizar sua atividade catalítica. Máxima atividade celulolítica em pH neutro foi descrita para *B. methylotrophicus* S2 (pH 7,5, a 55 °C) (Niu Q *et al.*, 2016) e *B. thuringiensis* (pH 8, a 60 °C) (Awasthi MK *et al.*, 2018), corroborando com os resultados obtidos no presente trabalho para *B. methylotrophicus*MP-7 e *B. methylotrophicus*MB-3 (pH 7 e 8).

Entretanto, celulasas bacterianas com máxima atuação em pHs ácidos já foram descritas, como pH 5,5 para *B. subtilis* BY-3 (Meng F *et al.*, 2014) e pH 4 para *Bacillus sonorensis* HSC7 (Azadian F *et al.*, 2017). Celulasas de natureza alcalinofílica também já foram descritas, como aquelas produzidas por *Clostridium thermocellum* Z-7026 (pH ótimo de 9) (Zvereva EA *et al.*, 2006) e *Bacillus sp.* KSM-N252 (pH ótimo de 10) (Endo K *et al.*, 2001).

Algumas celulasas podem ser mais versáteis, mantendo elevada atividade hidrolítica em diversos valores de pH. Tal condição foi observada para *B. siamensis* AB-9, que produziu celulasas estáveis na faixa de pH de 2 até 12. Característica semelhante foi observada por Wang F e colaboradores (2009), que reportaram uma celulase com atividade elevada em valores de pH que variaram de 4 a 9.

Com exceção das celulasas produzidas por *B. drentensis* ME-2, as demais linhagens celulolíticas apresentaram elevada atividade enzimática em diversas temperaturas. Todos os isolados celulolíticos analisados exibiram máxima atividade enzimática a 60 °C. Muitas celulasas são descritas na literatura com atividade ótima a 50-60 °C, como aquelas produzidas por *B. amyloliquefaciens* AK9 (Irfan M *et al.*, 2017) e *B. subtilis* BS-5 (Wu B *et al.*, 2018). Entretanto, temperatura ótima mais elevada já foi descrita, como 75 °C em celulasas de *Bacillus sp.* (Rastogi G *et al.*, 2010), bem como temperatura ótima mais baixa, como 37 °C em *Pseudomonas* (Romano N *et al.*, 2013).

Nenhum dos íons metálicos avaliados nesse estudo exerceu influência significativa sobre a atividade das celulases. Zarafeta D *et al.* (2016) reportou similar resultado para atividade de CMCase de *Thermoanaerobacterium sp.* GH5, na qual os íons  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{Na}^+$  não influenciaram a atividade enzimática, enquanto o íon  $\text{Fe}^{2+}$  foi capaz de inibir a atividade enzimática.

Como a necessidade de cofatores para a atividade enzimática varia conforme a enzima, o mesmo íon pode atuar de maneiras opostas na reação. Existem relatos de celulases que são metaloenzimas e dependem de íons, como  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  e  $\text{Co}^{2+}$  (Cheng J *et al.*, 2016); outras celulases podem ser inibidas por  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  e  $\text{Co}^{2+}$  (Huang S *et al.*, 2015); ou mesmo se mostrarem indiferentes quanto à presença de metais, como K,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{Na}^+$  (Asha BM *et al.*, 2012).

Neste trabalho, apenas o isolado *B. methylotrophicus* AP-14 apresentou máxima atividade ao longo de toda a faixa de pH analisada (2-12), mostrando que as amilases produzidas possuem maior versatilidade de atuação em diferentes valores de pHs. Já os demais isolados amilolíticos mostraram alta atividade em valores de pH neutro a básico. Resultados semelhantes foram reportados para bactérias do gênero *Bacillus*, com maior atividade em pH 6-8 (Xie F *et al.*, 2014), pH 7 (David S *et al.*, 2017) e pH 10 (Pinjari AB e Kotari V, 2018). Essa elevada atividade em pH alcalino é uma particularidade ideal para a utilização de tais enzimas na indústria de detergentes, onde alguns processos ocorrem exatamente em pHs alcalinos (Souza PM, Magalhães PO, 2010)

Com relação à temperatura, os extratos enzimáticos obtidos a partir de *B. methylotrophicus* AP-14, *B. subtilis* AE-2 e *B. toyonensis* MB-18 apresentaram elevada atividade em temperatura de 50-60 °C, enquanto atividade ótima a 60 °C foi observada para amilases produzidas por *B. pseudomycooides* MB-22. Outras amilases com atuação eficiente nessa faixa de temperatura já foram descritas para *B. subtilis* KIBGE HAS (Bano S *et al.*, 2011) e para *Bacillus sp.* BCC 01-50 (Simair AA *et al.*, 2017).

*B. toyonensis* MB-1 apresentou máxima atividade amilolítica na faixa de 40-70 °C, valores dentro da faixa de temperatura em que ocorrem os processos na indústria de papel (45-60 °C), propiciando a aplicação das amilases produzidas por esse isolado nesse setor industrial (Gupta R *et al.*, 2003).



Embora a maior parte das enzimas que hidrolisam o amido sejam metaloenzimas e necessitem de cofatores, como  $\text{Ca}^{2+}$  (Sivaramakrishnan S *et al.*, 2006), nenhum dos cinco isolados amilolíticos mostraram aumento de sua atividade na presença dos íons. Lu M e colaboradores (2010) relataram inibição de amilases produzidas por *Pseudoalteromonas arctica* GS230 na presença de  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$ , e aumento da atividade amilolítica na presença de  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$ . Essa variação também foi observada para amilase produzida por *B. amyloliquefaciens* P-001, cuja atividade foi induzida na presença de  $\text{Ca}^{2+}$ , inibida por  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$ , e inalterada na presença de  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{2+}$  (Deb P *et al.*, 2013).

Todos os cinco isolados xilanolíticos selecionados nesse trabalho demonstraram elevada atividade hidrolítica ao longo da faixa de pH (2-12) e temperatura (10-80 °C) avaliadas, característica desejável para aplicação de tal enzima em diversos setores industriais. Já foram descritas enzimas que atuam em pH neutro para bactérias do gênero *Bacillus*, que atuaram com máxima atividade em pH 6-7, a 55 °C (Yoon KH, 2009; Ammoneh H *et al.*, 2014).

Xilanases com pH ideal básico entre 6 e 8 foram relatadas para *Bacillus tequilensis* BT21 (Khandeparker R, Parab P, Amberkar U, 2017), entre pH 7 e 9 para *B. amyloliquefaciens* SK-3 (Kumar S *et al.*, 2017), 8-10 para *Bacillus sp.* (Kumar PS, Yaashikaa PR, Saravanan A, 2018) e 6-10 para *Bacillus arseniciselenatis* DSM 15340 (Kamble RD, Jadhav AR, 2012). Assim como observado para as xilanases produzidas pelos isolados desse trabalho, Raj A e colaboradores (2013) reportaram uma espécie do gênero *Providencia sp.* X1, capaz de produzir xilanase extracelular com atuação tanto em pH ácido quanto básico (faixa de pH de 4 a 11).

Os cinco isolados produtores de xilanases apresentaram atividade semelhante ao longo de uma ampla faixa de temperatura, indicando versatilidade de ação catalítica. Ghio S e colaboradores (2016) reportaram a mesma característica para xilanases produzidas por *Paenibacillus sp.* A59, que mantiveram mais de 80 % de atividade nas temperaturas de 40 a 70 °C. Atividade de 80 % em temperatura de 35 a 60 °C também foi relatada para xilanase produzida por *B. mojavensis* AG137 (Sepahy AA, Ghazi S, Sepahy MA, 2011).

Os íons metálicos exerceram pouca influência sobre a atividade xilanolítica dos extratos obtidos no presente trabalho. Apenas o íon  $\text{Fe}^{2+}$  aumentou a atividade catalítica



de *B. toyonensis* MP-9. Resultado similar foi reportado por Sanjivkumar M e colaboradores (2017) para uma xilanase produzida por *Streptomyces*, cuja presença de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{2+}$ , bem como de  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  e  $\text{Hg}^{2+}$  aumentaram sua atividade hidrolítica. Todavia, a presença de íons pode não influenciar a atividade de xilanases, como observado para *Paenibacillus macquariensis* RC 1819, com os íons  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{2+}$  (Sharma M, Mehta S, Kumar A, 2013); ou pode ainda inibir sua atividade, como observado para *Bacillus sp.*, com  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  (Yin LJ *et al.*, 2010) e com  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  (Prakash P *et al.*, 2012).

A caracterização de lipases produzidas pelos isolados obtidos neste trabalho evidenciou que tais enzimas atuam tanto em pH ácido como básico. Entretanto, lipases bacterianas, geralmente, possuem atividade em pH de neutro a básico, como reportado em outros trabalhos, como pH 6-8 (Wang Q *et al.*, 2012), pH 7-8 (Privé F *et al.*, 2015), pH 9 (Arifin AR *et al.*, 2013) e pH 10,5 (Meilleur C *et al.*, 2009).

Os cinco isolados lipolíticos apresentaram atividade enzimática ideal em toda a faixa de temperatura avaliada (10-80 °C), mostrando versatilidade de atuação tanto em temperaturas altas quanto baixas. Noormohamadi R e colaboradores(2013) e Yamada C e colaboradores(2017) demonstraram elevada atividade a 60 °C para lipases produzidas por *Pseudomonas sp.* e *Bacillus thermoamylovorans* NB501, respectivamente. Todavia, atividade hidrolítica em baixas temperaturas também já foi observada para lipases produzidas por diversos microrganismos psicrófilos, como *Bacillus sphaericus* MTCC 7526, que apresentou ação lipolítica acima de 80 % nas temperaturas de 5 a 35 °C (Joseph B e Ramteke PW, 2013).

Os cátions adicionados à reação enzimática não influenciaram a atividade enzimática de nenhum dos isolados lipolíticos. Sharma P e colaboradores (2017) relataram efeito similar para lipases sintetizadas por *B. methylotrophicus* PS3, em que a presença de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  não influenciaram a atividade hidrolítica, enquanto  $\text{Fe}^{2+}$  diminuiu essa atividade.

Diferentes influências de íons sobre lipases já foram descritas para bactérias do gênero *Bacillus*, incluindo aumento de atividade na presença de  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ , e inibição da atividade lipolítica por  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  e  $\text{Co}^{2+}$ (Ghori MI, Iqbal MJ, Hameed A, 2011). Lipases produzidas por *Enterobacter sp.* foram induzidas na presença de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{K}^+$ , e inibidas por  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$ (Farrokh P, Yakhchali B, Karkhane AA, 2014).

Atividade lipolítica aumentada com a adição de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Ba}^{2+}$  e reduzida na presença de  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{2+}$  foi reportada para *P. fluorescens* Pf0-1 (Liu W, Li M, Yan Y, 2017).

## 6 CONCLUSÃO

As linhagens de *Bacillus* e *Lysinibacillus* isoladas a partir de amostras de solo do bioma Cerrado, em Uberaba, MG, foram capazes de produzir celulases, amilases, xilanases ou lipases extracelulares, com alta atividade hidrolítica.

As enzimas produzidas por tais isolados apresentaram grande diversidade em relação a influência do pH, temperatura e presença de íons metais na reação: algumas enzimas alcançaram máxima atividade em pH neutro, básico ou ácido, a maioria foi versátil em relação às variações de temperatura e não sofreu influência pela presença de íons metais na reação.

Esse trabalho reforça a diversidade bacteriana existente em amostras de solo, sendo o primeiro a descrever o isolamento e caracterização de bactérias produtoras de enzimas de interesse industrial a partir da exploração da biodiversidade existente em solos de mata preservada no Cerrado brasileiro da região do Triângulo Mineiro.

## 7 REFERÊNCIAS

Acer Ö, Bekler FM, Pirinçcioğlu H, Güven RG, Güven K. Purification and Characterization of Thermostable and Detergent-Stable  $\alpha$ -Amylase from *Anoxybacillus* sp. AH1. *Food Technol Biotechnol*. 2016 Mar; 54 (1): 70–77.

Acharya S, Chaudhary A. Bioprospecting Thermophiles for Cellulase Production: A Review. *Braz J Microbiol*. 2012 Jul-Sep; 43(3): 844–856.

Ahmed I, Yokota A, Yamazoe A, Fujiwara T. Proposal of *Lysinibacillus boronitolerans* gen. nov. sp. nov., and transfer of *Bacillus fusiformis* to *Lysinibacillus fusiformis* comb. nov. and *Bacillus sphaericus* to *Lysinibacillus sphaericus* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2007 May; 57(Pt 5): 1117-1125.

Al-Abdalall AH, Al-Khaldi EM. Recovery of silver from used X-ray film using alkaline protease from *Bacillus subtilis* sub sp. *Subtilis*. *Afr J Biotechnol*. 2016 Jun 29; 15(26): 1413-1416.

Almalki MA. Solid State Fermentation of Agro-Residues for the Production of Amylase from *Bacillus subtilis* for Industrial Applications. *Int J Curr Microbiol App Sci*. 2018; 7 (3): 1341-1348.

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*. 1990 Oct; 215 (3): 403-410.

Alves PDD, Siqueira FF, Facchin S, Horta CCR, Victória JMN, Kalapothakis E. Survey of Microbial Enzymes in Soil, Water, and Plant Microenvironments. *Open Microbiol J*. 2014 Apr; 8: 25–31.

Ammonieh H, Harba M, Akeed Y, Al-Halabi M, Bakri Y. Isolation and identification of local *Bacillus* isolates for xylanase biosynthesis. *Iran J Microbiol*. 2014 Apr; 6 (2): 127–132.

Apun K, Jong BC, Salleh MA. Screening and isolation of a cellulolytic and amylolytic *Bacillus* from sago pith waste. *J GenAppl Microbiol*. 2000 Oct; 46(5): 263-267.

Arifin AR, Kim SJ, Yim JH, Suwanto A, Kim HK. Isolation and biochemical characterization of *Bacillus pumilus* lipases from the Antarctic. *J Microbiol Biotechnol*. 2013 May; 23 (5): 661-667.

Asha BM, Revathi M, Yadav A, Sakthivel N. Purification and characterization of a thermophilic cellulase from a novel cellulolytic strain, *Paenibacillus barcinonensis*. *J Microbiol Biotechnol*. 2012 Nov; 22 (11): 1501-1509.

Awasthi MK, Wong JWC, Kumar S, Awasthi SK, Wang Q, Wang M, Ren X, Zhao J, Chen H, Zhang Z. Biodegradation of food waste using microbial cultures producing thermostable  $\alpha$ -amylase and cellulase under different pH and temperature. *Bioresour Technol*. 2018 Jan; 248 (Pt B): 160-170.

Azadian F, Badoei-dalfard A, Namaki-Shoushtari A, Karami Z, Hassanshahian M. Production and characterization of an acido-thermophilic, organic solvent stable

cellulase from *Bacillus sonorensis* HSC7 by conversion of lignocellulosic wastes. *J Genetic Eng Biotechnol.* 2017 Jun; 15 (1): 187-196.

Bajpai P. Application of Enzymes in the Pulp and Paper Industry. *Biotechnol Prog.* 1999 Mar; 15(2):147-57.

Baker PJ, Numata K. Polymerization of Peptide Polymers for Biomaterial Applications. In: Yilmaz F. *Polymer Science. InTech*, 2013 Jan 23. Chap 9. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/polymer-science/polymerization-of-peptide-polymers-for-biomaterial-applications>>. Acessado em: 11 de Janeiro de 2017.

Banerjee G, Scott-Craig JS, Walton JD. Improving Enzymes for Biomass Conversion: A Basic Research Perspective. *BioEnerg Res.* 2010 Mar; 3(1): 82-92.

Bano S, Qader SAU, Aman A, Syed MN, Azhar A. Purification and Characterization of Novel  $\alpha$ -Amylase from *Bacillus subtilis* KIBGE HAS. *AAPS Pharm Sci Tech.* 2011 Mar; 12 (1): 255–261.

Battan B, Dhiman SS, Ahlawat S, Mahajan R, Sharma J. Application of Thermostable Xylanase of *Bacillus pumilus* in Textile Processing. *Indian J Microbiol.* 2012 Jun; 52(2): 222–229.

Beattie AJ, Hay M, Magnusson B, de Nys R, Smeathers J, Vincent JFV. Ecology and bioprospecting. *Austral Ecol.* 2011 May 1; 36 (3): 341-356.

Beloqui A, María PD, Golyshin PN, Ferrer M. Recent trends in industrial microbiology. *Curr Opin Microbiol.* 2008 Jun; 11 (3):240-248.

Bhalla A, Bischoff KM, Sani RK. Highly thermostable xylanase production from a thermophilic *Geobacillus sp.* strain WsUcF1 utilizing lignocellulosic biomass. *Front Bioeng Biotechnol.* 2015 Jun 16; 3:84.

Bhandari V, Ahmod NZ, Shah HN, Gupta RS. Molecular signatures for *Bacillus* species: demarcation of the *Bacillus subtilis* and *Bacillus cereus* clades in molecular terms and proposal to limit the placement of new species into the genus *Bacillus*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2013 Jul;63(Pt 7):2712-2726.

Bhat MK. Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnol Adv.* 2000 Aug; 18 (5):355-383.

Bhosale H, Shaheen U, Kadam T, Characterization of a Hyperthermostable Alkaline Lipase from *Bacillus sonorensis* 4R. *Enzy Res.* 2016; 2016:e4170684, 11 pages.

Bibi Z, Ansari A, Zohra RR, Aman A, Qader SAU. Production of xylan degrading endo-1, 4-b-xylanase from thermophilic *Geobacillus stearothermophilus* KIBGE-IB29. *J Radia Res Appl Sci.* 2014 Oct; 7 (4): 478-485

Bisht SS, Panda AA. Biochemical Characterization and 16S rRNA Sequencing of Few Lipase-Producing Thermophilic Bacteria from Taptapani Hot Water Spring, Orissa, India. *Biotechnol Res Int.* 2011 Apr; 2011: 452710.

Bocchini DA, Gomes E, Da Silva R. Xylanase production by *Bacillus circulans* D1 using maltose as carbon source. *Appl Biochem Biotechnol*. 2008 Mar; 146 (1-3): 29-37.

Boucherba N, Gagaoua M, Bouanane-Darenfed A, Bouiche C, Bouacem K, Kerbous MY, Maafa Y, Benallaoua S. Biochemical properties of a new thermo- and solvent-stable xylanase recovered using three phase partitioning from the extract of *Bacillus oceanisediminis* strain SJ3. *Bioresour Bioprocess*. 2017 Jul; 4 (1): 29.

Brackin R, Robinson N, Lakshmanan P, Schmidt S. Microbial function in adjacent subtropical forest and agricultural soil. *Soil BiolBiochem*. 2013 Feb; 57: 68-77.

Brasil, MMA – Ministério do Meio Ambiente. 2018. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biodiversidade/convenção-da-diversidade-biológica>>. Acessado em 12 de Maio de 2018.

Brasil, MDIC - Ministério da Indústria, Comércio Exterior e Serviços. 2018. Disponível em: <<http://www.mdic.gov.br/comercio-exterior/estatisticas-de-comercio-exterior/comex-vis/frame-ppi?ppi=3161>>. Acessado em 12 de Maio de 2018.

Bravo D, Braissant O, Cailleau G, Verrecchia E, Junier P. Isolation and characterization of oxalotrophic bacteria from tropical soils. *Arch Microbiol*. 2015 Jan; 197 (1):65-77.

Burhan A, Nisa U, Gokhan C, Omer C, Ashabil A, Osman G. Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkaliphilic *Bacillus* sp. isolate ANT-6. *Process Biochem*. 2003 May 30; 38(10):1397–1403.

Butt MS, Tahir-Nadem M, Ahmad Z, Sultan MT. Xylanases and Their Applications in Baking Industry. *Food Tech Biotechnol*. 2008 Jan; 46(1): 22-31.

Chakdar H, Kumar M, Pandiyan K, Singh A, Nanjappan K, Kashyap PL, Srivastava AK. Bacterial xylanases: biology to biotechnology. *3 Biotech*. 2016 Dec; 6(2): 150.

Chen L, Gu W, Xu HY, Yang GL, Shan XF, Chen G, Wang CF, Qian AD. Complete genome sequence of *Bacillus velezensis* 157 isolated from *Eucommia ulmoides* with pathogenic bacteria inhibiting and lignocellulolytic enzymes production by SSF. *3 Biotech*. 2018 Feb; 8 (2): 114.

Cheng J, Huang S, Jiang H, Zhang Y, Li L, Wang J, Fan C. Isolation and characterization of a non-specific endoglucanase from a metagenomic library of goat rumen. *World J Microbiol Biotechnol*. 2016 Jan; 32 (1): 12.

Chi Z, Chi Z, Liu G, Wang F, Ju L, Zhang T. *Saccharomycopsis fibuligera* and its applications in biotechnology. *Biotechnol Adv*. 2009 Jul-Aug; 27(4):423-431.

Chikerema SM, Pfukenyi DM, Hang'ombe BM, L'Abée-Lund TM, Matope G. Isolation of *Bacillus anthracis* from soil in selected high-risk areas of Zimbabwe. *J Appl Microbiol*. 2012 Dec; 113 (6) :1389-1395.

Cho SJ, Kim MH, Lee YO. Effect of pH on soil bacterial diversity. *J Ecol Environ*. 2016 Dec; 40: 10.

Chuprom J, Bovornreungroj P, Ahmad M, Kantachote D, Dueramae S. Approach toward enhancement of halophilic protease production by *Halobacterium* sp. strain LBU50301 using statistical design response surface methodology. *Biotechnol Rep*. 2016 Jun; 10: 17–28.

Cordeiro CAM, Martins MLL, Luciano AB; da Silva RF. Production and properties of Xylanase from thermophilic *Bacillus* sp. *Braz Arch Biol Technol*. 2002 Dec; 45(4): 413-418.

Couto SR, Sanromán MA. Application of solid-state fermentation to food industry - A review. *J Food Eng*. 2006 Oct; 76(3): 291-302.

Cuesta SM, Rahman SA, Furnham N, Thornton JM. The Classification and Evolution of Enzyme Function. *Biophys J*. 2015 Sep; 109: 1082–1086.

Cui H, Yang M, Wang L, Xian CJ. Identification of a New Marine Bacterial Strain SD8 and Optimization of Its Culture Conditions for Producing Alkaline Protease. *PLoS ONE*. 2015 Dec; 10(12): e0146067.

Dalvi P, Anthappan P, Darade N, Kanoongo N, Adivarekar R. Amylase and pectinase from single source for simultaneous desizing and scouring. *Indian J Fibre Text Res*. 2007 Dec; 32(4): 459-465.

Dash BK, Rahman MM, Sarker PK. Molecular Identification of a Newly Isolated *Bacillus subtilis* BI19 and Optimization of Production Conditions for Enhanced Production of Extracellular Amylase. *Biomed Res Int*. 2015 Jun; 2015: 859805.

David S, Femi B, Gbenga A, Saanu AB. Purification and Characterization of  $\alpha$ -Amylase from *Bacillus subtilis* Isolated from Cassava Processing Sites. *J Bioremediat Biodegrad* 2017 Oct; 8 (6):1-7.

Deb P, Talukdar SA, Mohsina K, Sarker PK, Sayem SMA. Production and partial characterization of extracellular amylase enzyme from *Bacillus amyloliquefaciens* P-001. *Springer Plus*. 2013 Dec; 2 (1): 154.

de Azeredo LAI, Freire DMG, Soares RMA, Leite SGF, Coelho RRR. Production and partial characterization of thermophilic proteases from *Streptomyces* sp. isolated from Brazilian cerrado soil. *Enzy Microbial Technol*. 2004 Mar; 34 (3): 354–358.

Devaraj K, Aathika S, Periyasamy K, Periyaraman PM, Palaniyandi S, Subramanian S. Production of thermostable multiple enzymes from *Bacillus amyloliquefaciens* KUB29. *Nat Prod Res*. 2018 Jan: 1-4. <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1425857>

Dienes D, Egyházi A, Réczey K. Treatment of recycled fiber with *Trichoderma* cellulases. *IndCrops Prod*. 2004 Jul; 20(1): 11-21.

- Dionisi HM, Lozada M, Olivera NL. Bioprospection of marine microorganisms: biotechnological applications and methods. *Rev Argent Microbiol.* 2012 Jan-Mar; 44 (1): 49-60.
- Divakaran D, Chandran A, Chandran RP. Comparative study on production of  $\alpha$ -Amylase from *Bacillus licheniformis* strains. *Braz J Microbiol.* 2011 Dec; 42 (4): 1397–1404.
- dos Santos ER, Teles ZNS, Campos NM, de Souza DAJ, Bispo ASR, Nascimento RP. Production of  $\alpha$ -Amylase from *Streptomyces* sp. SLBA-08 Strain Using Agro-Industrial By-Products. *Brazilian Arch Biol Technol.* 2012 Sep; 55 (5): 793-800.
- Dutta P, Deb A, Majumdar S. Optimization of the Medium for the Production of Extracellular Amylase by the *Pseudomonas stutzeri* ISL B5 Isolated from Municipal Solid Waste. *Int J Microbiol.* 2016 Dec; 2016: 4950743.
- Du R, Yan J, Li S, Zhang L, Zhang S, Li J, Zhao G, Qi P. Cellulosic ethanol production by natural bacterial consortia is enhanced by *Pseudoxanthomonastaiwanensis*. *Biotechnol Biofuel.* 2015; 8: 10.
- Ellaiah P, Srinivasulu B, Kunamneni A. A review on microbial alkaline proteases. *J Sci Ind Res.* 2002 Sep; 61(9): 690-704.
- Endo K, Hakamada Y, Takizawa S, Kubota H, Sumitomo N, Kobayashi T, Ito S. A novel alkaline endoglucanase from an alkaliphilic *Bacillus* isolate: enzymatic properties, and nucleotide and deduced amino acid sequences. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2001 Oct; 57 (1-2): 109-16.
- Farrokh P, Yakhchali B, Karkhane AA. Cloning and characterization of newly isolated lipase from *Enterobacter* sp. Bn12. *Braz J Microbiol.* 2014; 45 (2): 677–687.
- Fossi BT, Tavea F, Fontem LA, Ndjouenkeu R, Wanja S. Microbial interactions for enhancement of  $\alpha$ -amylase production by *Bacillus amyloliquefaciens* 04BBA15 and *Lactobacillus fermentum* 04BBA19. *Biotechnol Rep.* 2014 Dec; 4: 99–106.
- Fotouh DMA, Bayoumi RA, Hassan MA. Production of Thermoalkaliphilic Lipase from *Geobacillus thermoleovorans* DA2 and Application in Leather Industry. *Enzyme Res.* 2016 Jan; 2016: 9034364.
- Fuwa H. A new method for microdetermination of amylase activity by the use of amylose as the substrate. *J Biochem.* 1954 Sep; 41(5): 583-603.
- Gallegos-Monterrosa R, Maróti G, Bálint B, Kovács AT. Draft Genome Sequence of the Soil Isolate *Lysinibacillus fusiformis* M5, a Potential Hypoxanthine Producer. *Genome Announc.* 2016 Nov; 4 (6): e01272-16.
- Gaur R, Tiwari S. Isolation, production, purification and characterization of an organic-solvent-thermostable alkaliphilic cellulase from *Bacillus vallismortis* RG-07. *BMC Biotechnol.* 2015 Mar 19; 15:b19.



Ghio S, Insani EM, Piccinni FE, Talia PM, Grasso DH, Campos E. GH10 XynA is the main xylanase identified in the crude enzymatic extract of *Paenibacillus* sp. A59 when grown on xylan or lignocellulosic biomass. *Microbiol Res*. 2016 Mar; 186: 16–26.

Ghori MI, Iqbal MJ, Hameed A. Characterization of a novel lipase from *Bacillus* sp. isolated from tannery wastes. *Braz J Microbiol*. 2011 Mar; 42 (1): 22–29.

Global Market Insights. Nome Enzymes Market Size By Product (Proteases, Lipases, Carbohydrases, Polymerases & Nucleases), By Application (Detergents, Food & beverages, Animal Feed, Biofuels), Industry Analysis Report, Regional Outlook (U.S., Canada, Germany, UK, France, Italy, Sweden, Austria, Poland, Russia, China, India, Japan, Indonesia, Thailand, Malaysia, Australia, Brazil, Argentina, Mexico, South Africa, UAE, Saudi Arabia, Kuwait, Egypt), Growth Potential, Price Trends, Competitive Market Share & Forecast, 2016 – 2024. 2016. Disponível em: <<https://www.gminsights.com/industry-analysis/enzymes-market>>. Acessado em 6 de Janeiro de 2017.

Goldbeck R, Filho FM. Screening, Characterization, and Biocatalytic Capacity of Lipases Producing Wild Yeasts from Brazil Biomes. *Food Sci Biotechnol*. 2013 Feb; 22 (1): 79-87.

Gopinath SCB, Anbu P, Arshad MKM, Lakshmipriya T, Voon CH, Hashim U, Chinni SV. Biotechnological Processes in Microbial Amylase Production. *BioMed ResInter*. 2017 Feb; 2017: 9 pages, ID 1272193.

Goyal V, Mittal A, Bhuwal AK, Singh G, Yadav A, Aggarwal NK. Parametric Optimization of Cultural Conditions for Carboxymethyl Cellulase Production Using Pretreated Rice Straw by *Bacillus* sp. 313SI under Stationary and Shaking Conditions. *Biotechnol Res Int*. 2014 Apr; 2014: 651839.

Gupta R, Gigras P, Mohapatra H, Goswami VK, Chauhan B. Microbial  $\alpha$ -amylases: a biotechnological perspective. *ProcessBiochem*. 2003 Jun 30; 38(11): 1599-1616.

Gupta R, Gupta N, Rathi P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2004 Jun; 64(6): 763-781.

Gurung N, Ray S, Bose S, Rai V. A Broader View: Microbial Enzymes and Their Relevance in Industries, Medicine, and Beyond. *Biomed Res Int*. 2013; 2013: 18 pages.

Hankin R, Anagnostakis SL. The use of solid media for detection of enzymes production by fungi. *Mycol*. 1975; 67 (3): 596-607.

Harris AD, Ramalingam C. Xylanases and its Application in Food Industry: A Review. *J Exp Sci*. 2010; 1(7): 1-11.

Hasan F, Shah AA, Hameed A. Industrial applications of microbial lipases. *Enzy Microbiol Tech*. 2006 Jun 26; 39(2): 235–251.

Hirano K, Kurosaki M, Nihei S, Hasegawa H, Shinoda S, Haruki M, Hirano N. Enzymatic diversity of the *Clostridium thermocellum* cellulosome is crucial for the degradation of crystalline cellulose and plant biomass. *Sci Rep*. 2016 Oct 19; 6: 35709.

Hmidet N, Ali NE-H, Haddar A, Kanoun S, Alya S-K, Nasri M. Alkaline proteases and thermostable  $\alpha$ -amylase co-produced by *Bacillus licheniformis* NH1: Characterization and potential application as detergent additive. *BiochemEng J*. 2009 Dec 1; 47(1-3): 71-79.

Huang S, Deng G, Yang Y, Wu Z, Wu L. Optimization of Endoglucanase Production from a Novel Bacterial Isolate, *Arthrobacter* sp. HPG166 and Characterization of Its Properties. *Braz Arch Biol Technol*. 2015 Oct; 58 (5): 692-701.

Huse SM, Desthlefsen L, Huber JA, Welch DM, Relman DA, Sogin ML. Exploring Microbial Diversity and Taxonomy Using SSU rRNA Hypervariable Tag Sequencing. *PLoS Genet*. 2008 Nov; 4 (11): e1000255.

Hyun HH, Zeikus JG. General Biochemical Characterization of Thermostable Extracellular beta-Amylase from *Clostridium thermosulfurogenes*. *Appl Environ Microbiol*. 1985 May; 49(5): 1162-1167.

Irfan M, Tayyab A, Hasan F, Khan S, Badshah M, Shah AA. Production and Characterization of Organic Solvent-Tolerant Cellulase from *Bacillus amyloliquefaciens* AK9 Isolated from Hot Spring. *Appl Biochem Biotechnol*. 2017 Aug; 182 (4): 1390–1402.

Ismaya WT, Hasan K, Subroto T, Natalia D, Soemitro S. Chromatography as the Major Tool in the Identification and the Structure-Function Relationship Study of Amylolytic Enzymes from *Saccharomycopsis fibuligera* R64. In: Calderon L. *Chromatography - The Most Versatile Method of Chemical Analysis*. Intech. 2012 Oct 24. Chap 11. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/chromatography-the-most-versatile-method-of-chemical-analysis/chromatography-as-the-major-tool-in-the-identification-and-the-structure-function-relationship-study>>. Acessado em 12 de Janeiro de 2017.

Jaeger KE, Reetz MT. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends Biotechnol*. 1998 Sep; 16(9): 396-403.

Jiewei T, Zuchao L, Peng Q, Lei W, Yongqiang T. Purification and Characterization of a Cold-Adapted Lipase from *Oceanobacillus* Strain PT-11. *Plos One*. 2014 Jul; 9(7): e101343.

Jisha VN, Smitha RB, Pradeep S, Sreedevi S, Unni KN, Sajith S, Priji P, Josh MS, Benjamin S. Versatility of microbial proteases. *Adv Enzy Res*. 2013 Sep; 1(3): 39-51.

Joseph B, Ramteke PW. Extracellular solvent stable cold-active lipase from psychrotrophic *Bacillus sphaericus* MTCC 7526: partial purification and characterization. *Ann Microbiol*. 2013 Feb; 63: 363–370.

Joseph B, Ramteke PW, Thomas G. Cold active microbial lipases: Some hot issues and recent developments. *Biotechnol Adv*. 2008 Sep-Oct; 26(5): 457-470.

Jung J, Philippot L, Park W. Metagenomic and functional analyses of the consequences of reduction of bacterial diversity on soil functions and bioremediation in diesel-contaminated microcosms. *Sci Rep*. 2016 Mar; 6: 23012.

Jung MY, Kim JS, Paek WK, Styrak I, Park IS, Sin Y, Paek J, Park KA, Kim H, Kim HL, Chang YH. Description of *Lysinibacillus sinduriensis* sp. nov., and transfer of *Bacillus massiliensis* and *Bacillus odysseyi* to the genus *Lysinibacillus* as *Lysinibacillus massiliensis* comb. nov. and *Lysinibacillus odysseyi* comb. nov. with emended description of the genus *Lysinibacillus*. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2012 Oct;62(Pt 10):2347-2355.

Kamble RD, Jadhav AR. Isolation, Purification, and Characterization of Xylanase Produced by a New Species of *Bacillus* in Solid State Fermentation. *Inter J Microbiol*. 2012; 2012: e683193, 8 pages.

Kanmani P, Kumaresan K, Aravind J. Gene cloning, expression, and characterization of the *Bacillus amyloliquefaciens* PS35 lipase. *Braz J Microbiol*. 2015 Oct-Dec; 46 (4): 1235-1243.

Karigar CS, Rao SS. Role of Microbial Enzymes in the Bioremediation of Pollutants: A Review. *Enzy Res*. 2011; 2011: 11pages.

Kaseke ZM, Okaiyeto K, Nwodo UU, Mabinya LV, Okoh AI. Optimization of Cellulase and Xylanase Production by *Micrococcus* Species under Submerged Fermentation. *Sustain*. 2016; 8 (1168):10.3390.

Khandeparker R, Parab P, Amberkar U. Recombinant Xylanase from *Bacillus tequilensis* BT21: Biochemical Characterisation and Its Application in the Production of Xylobiose from Agricultural Residues. *Food Technol Biotechnol*. 2017 Jun; 55 (2): 164–172.

Kim Y-K, Lee S-C, Cho Y-Y, Oh Y-J, Ko YH. Isolation of Cellulolytic *Bacillus subtilis* Strains from Agricultural Environments. *ISRN Microbiol*. 2012 Feb; 2012: 650563.

Kirk O, Borchert TV, Fuglsang CC. Industrial enzyme applications. *Curr Opin Biotechnol*. 2002 Aug; 13(4): 345-351.

Knob A, Terrasan CRF, Carmona EC.  $\beta$ -Xylosidases from filamentous fungi: an overview. *W J Microbiol Biotechnol*. 2010 Mar; 26(3): 389-407.

Koc M, Cokmus C, Cihan AC. The genotypic diversity and lipase production of some thermophilic bacilli from different genera. *Braz J Microbiol*. 2015 Dec; 46 (4): 1065–1076.

Kong D, Wang Y, Zhao B, Li Y, Song J, Zhai Y, Zhang C, Wang H, Chen X, Zhao B, Ruan Z. *Lysinibacillus halotolerans* sp. nov., isolated from saline-alkaline soil. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2014 Aug; 64 (8): 2593-2598.

Kubicek CP. Systems biological approaches towards understanding cellulose production by *Trichoderma reesei*. *J Biotechnol*. 2013 Jan 20; 163(2): 133–142.

Kumar L, Kumar D, Nagar S, Gupta R, Garg N, Kuhad RC, Gupta VK. Modulation of xylanase production from alkaliphilic *Bacillus pumilus* VLK-1 through process optimization and temperature shift operation. 3 Biotech. 2014 Aug; 4 (4): 345–356.

Kumar PS, Yaashikaa PR, Saravanan A. Isolation, characterization and purification of xylanase producing bacteria from sea sediment. Biocat Agri Biotechnol. 2018 Jan; 13 (2018): 299-303.

Kumar R, Singh S, Singh OV. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. J IndMicrobiol Biotechnol. 2008 May; 35(5): 377-391.

Kumar S, Haq I, Prakash J, Singh SK, Mishra S, Raj A. Purification, characterization and thermostability improvement of xylanase from *Bacillus amyloliquefaciens* and its application in pre-bleaching of kraft pulp. 3 Biotech. 2017 May; 7 (1): 20.

Kumar S, Khare SK. Chloride Activated Halophilic  $\alpha$ -Amylase from *Marinobacter* sp. EMB8: Production Optimization and Nanoimmobilization for Efficient Starch Hydrolysis. Enzy Res. 2015; 2015: e859485, 9 pages.

Latorre JD, Velasco XH, Wolfenden RE, Vicente JL, Wolfenden AD, Menconi A, Bielke LR, Hargis BM, Tellez G. Evaluation and Selection of *Bacillus* Species Based on Enzyme Production, Antimicrobial Activity, and Biofilm Synthesis as Direct-Fed Microbial Candidates for Poultry. Front Vet Sci. 2016 Oct; 3: 95.

Lauber CL, Hamady M, Knight R, Fierer N. Pyrosequencing-based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale. Appl Environ Microbiol. 2009 Aug; 75(15): 5111-5120.

Li S, Yang X, Yang S, Zhu M, Wang X. Technology Prospecting on Enzymes: Application, Marketing and Engineering. Comput Struct Biotechnol J. 2012; 2(3): e201209017.

Lian J, Choi J, Tan YS, Howe A, Wen Z, Jarboe LR. Identification of Soil Microbes Capable of Utilizing Cellobiosan. PLoS One. 2016 Feb; 11 (2): e0149336.

Liang Y-L, Zhang Z, Wu M, Wu Y, Feng JX. Isolation, Screening, and Identification of Cellulolytic Bacteria from Natural Reserves in the Subtropical Region of China and Optimization of Cellulase Production by *Paenibacillus terrae* ME27-1. Biomed Res Int. 2014 Jun; 2014: 512497.

Lisov AV, Belova OV, Lisova ZA, et al. Xylanases of *Cellulomonas flavigena*: expression, biochemical characterization, and biotechnological potential. AMB Express. 2017; 7: 5.

Liu W, Li M, Yan Y. Heterologous expression and characterization of a new lipase from *Pseudomonas fluorescens* Pf0–1 and used for biodiesel production. Sci Rep. 2017 Nov; 7: 15711.

López-Mondéjar R, Zühlke D, Becher D, Riedel K, Baldrian P. Cellulose and hemicellulose decomposition by forest soil bacteria proceeds by the action of structurally variable enzymatic systems. *Sci Rep*. 2016 Apr; 6: 25279.

LPSN – List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. *Bacillus*. <<http://www.bacterio.net/bacillus.html>> Acessado em 29 de Junho de 2018.

LPSN – List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. *Lysinibacillus*. <<http://www.bacterio.net/lysinibacillus.html>> Acessado em 29 de Junho de 2018.

Lu M, Wang S, Fang Y, Li H, Liu S, Liu H. Cloning, expression, purification, and characterization of cold-adapted  $\alpha$ -amylase from *Pseudoalteromonas arctica* GS230. *Protein J*. 2010 Nov; 29 (8): 591-597.

Madar D, Dekel E, Bren A, Zimmer A, Porat Z, Alon U. Promoter activity dynamics in the lag phase of *Escherichia coli*. *BMC Syst Biol*. 2013 Dec; 7:136.

Maki M, Leung KT, Qin W. The prospects of cellulase-producing bacteria for the bioconversion of lignocellulosic biomass. *Int J BiolSci*. 2009 Jul 29; 5(5): 500–516.

Martínez-Rosales C, Castro-Sowinski S. Antarctic bacterial isolates that produce cold-active extracellular proteases at low temperature but are active and stable at high temperature. *Polar Res*. 2011 Apr 22; 30: 7123.

Maurer K-H. Detergent proteases. *Curr Opin Biotechnol*. 2004 Aug; 15(4): 330-334.

Mechri S, Kriaa M, Berrouina MBE, Benmradi MO, Jaouadi NZ, Rekik H, Bouacem K, Darenfed AB, Chebbi A, Sayadi S, Chamkha M, Bejar S, Jaouadi B. Optimized production and characterization of a detergent-stable protease from *Lysinibacillus fusiformis* C250R. *Int J Biol Macromol*. 2017 Aug; 101: 383-397.

Meidong R, Doolgindachbaporn S, Jamjan W, Sakai K, Tashiro Y, Okugawa Y, Tongpim S. A novel probiotic *Bacillus siamensis* B44v isolated from Thai pickled vegetables (Phak-dong) for potential use as a feed supplement in aquaculture. *J Gen Appl Microbiol*. 2017 Sep 5; 63 (4): 246-253.

Meilleur C, Hupé JF, Juteau P, Shareck F. Isolation and characterization of a new alkali-thermostable lipase cloned from a metagenomic library. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2009 Jun; 36 (6): 853-861.

Meng F, Ma L, Ji S, Yang W, Cao B. Isolation and characterization of *Bacillus subtilis* strain BY-3, a thermophilic and efficient cellulase-producing bacterium on untreated plant biomass. *Lett Appl Microbiol*. 2014 Sep; 59 (3): 306-312.

Metzger JO, Bornscheuer U. Lipids as renewable resources: current state of chemical and biotechnological conversion and diversification. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2006 Jun; 71(1): 13-22.

Miller GL. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal Chem*. 1959 Mar; 31(3): 426–428.

- Mobarak-Qamsari E, Kasra-Kermanshahi R, Moosavi-nejad Z. Isolation and identification of a novel, lipase-producing bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* KM110. Iran J Microbiol. 2011 Jun; 3(2): 92–98.
- Murugan S, Arnold D, Pongiya UD, Narayanan PM. Production of Xylanase from *Arthrobacter* sp. MTCC 6915 Using Saw Dust As Substrate under Solid State Fermentation. Enzy Res. 2011 Aug; 2011: 696942.
- Nascimento RP, Coelho RRR, Marques S, Alves L, Gírio FM, Bon EPS, Amaral-Collação MT. Production and partial characterization of xylanase from *Streptomyces* sp. strain AMT-3 isolated from Brazilian cerrado soil. Enzy Microbiol Tech. 2002 Sep; 31 (4): 549–555.
- Nascimento RP, d'Avila-Levy CM, Souza RF, Branquinha MH, Bon EP, Pereira N Jr, Coelho RR. Production and partial characterization of extracellular proteinases from *Streptomyces malaysiensis*, isolated from a Brazilian cerrado soil. Arch Microbiol. 2005 Nov; 184 (3): 194-8.
- Nagar S, Mittal A, Gupta VK. A Cost Effective Method for Screening and Isolation of Xylan Degrading Bacteria Using Agro Waste Material. Asi J Bio Sci. 2012 Aug; 5(8): 384-394.
- Nannipieri P, Ascher J, Ceccherini MT, Landi L, Pietramellara G, Renella G. Microbial diversity and soil functions. Eur J Soil Sci. 2003 Dec; 54(4): 655-670.
- Naureen Z, Rehman NU, Hussain H, Hussain J, Gilani SA, Housni SKA, Mabood F, Khan AL, Farooq S, Abbas G, Harrasi AA. Exploring the Potentials of *Lysinibacillus sphaericus* ZA9 for Plant Growth Promotion and Biocontrol Activities against Phytopathogenic Fungi. Front Microbiol. 2017 Aug; 8: 1477.
- NCBI-National Center of Biotechnology Information, Taxonomy Browser <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=1386&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>> Acessado em 29 de Junho de 2018.
- Niu Q, Zhang G, Zhang L, Ma Y, Shi Q, Fu W. Purification and characterization of a thermophilic 1,3-1,4- $\beta$ -glucanase from *Bacillus methylotrophicus* S2 isolated from booklice. J Biosci Bioeng. 2016 May; 121 (5): 503-508.
- Noormohamadi R, Tabandeh F, Shariati P, Otadi M. Characterization of a lipase from a newly isolated *Pseudomonas* sp. Iran J Microbiol. 2013 Dec; 5 (4): 422–427.
- Oh H, Seo DJ, Jeon SB, Park H, Jeong S, Chun HS, Oh M, Choi C. Isolation and Characterization of *Bacillus cereus* Bacteriophages from Foods and Soil. Food Environ Virol. 2017 Sep; 9 (3): 260-269.
- Oliveira SD, Santos LR, Schuch DMT, Silva AB, Salle CTP, Canal CW. Detection and identification of salmonellas from poultry-related samples by PCR. Vet Microbiol. 2002; 87: 25-35.



- Pandey A, Soccol CR, Nigam P, Soccol VT. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. *BioTech*. 2000 Aug; 74(1): 69-80.
- Patil KJ, Chopda MZ, Mahajan RT. Lipase biodiversity. *Indian J Sci Technol*. 2011 Aug; 4(8): 971-982.
- Paudel YP, Qin W. Characterization of Novel Cellulase-producing Bacteria Isolated From Rotting Wood Samples. *Appl Biochem Biotechnol*. 2015 Nov; 177 (5): 1186-98.
- Peixoto-Nogueira S de C, Michelin M, Betini JHA, Jorge JA, Terenzi HF, Polizeli MLTM. Production of xylanase by *Aspergilli* using alternative carbon sources: application of the crude extract on cellulose pulp biobleaching. *J IndMicrobiolBiotechnol*. 2009 Jan; 36(1): 149-155.
- Peng Q, Wang X, Shang M, Huang J, Guan G, Li Y, Shi B. Isolation of a novel alkaline-stable lipase from a metagenomic library and its specific application for milkfat flavor production. *Microb Cell Fact*. 2014 Jan 4; 13: 1.
- Pinjari AB, Kotari V. Characterization of extracellular amylase from *Bacillus* sp. Strain RU1. *J Appl Biol Biotechnol*. 2018 May; 6 (3): 29-34.
- Privé F, Newbold CJ, Kaderbhai NN, Girdwood SG, Golyshina OV, Golyshin PN, Scollan ND, Huws SA. Isolation and characterization of novel lipases/esterases from a bovine rumen metagenome. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2015 Jan; 99 (13): 5475–5485.
- Pohlson E, Fandino AO, Marxsen J. Bacterial Community Composition and Extracellular Enzyme Activity in Temperate Streambed Sediment during Drying and Rewetting. *PLoS One*. 2013 Dec; 8 (12): e83365.
- Polizeli MLTM, Rizzatti ACS, Monti R, Terenzi HF, Jorge JA, Amorim DS. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Appl MicrobiolBiotechnol*. 2005 Jun; 67(5): 577-591.
- Potprommanee L, Wang X-Q, Han Y-J, Nyobe D, Peng YP, Huang Q, Liu J, Liao YL, Chang K-L. Characterization of a thermophilic cellulase from *Geobacillus* sp. HTA426, an efficient cellulase-producer on alkali pretreated of lignocellulosic biomass. *PLoS One*. 2017 Apr; 12 (4): e0175004.
- Prado HFA, Pavezzi FC, Leite RSR, de Oliveira VM, Sette LD, da Silva R. Screening and Production Study of Microbial Xylanase Producers from Brazilian Cerrado. *Appl Biochem Biotechnol*. 2010 May; 161 (8): 333–346.
- Prakash P, Jayalakshmi SK, Prakash B, Rubul M, Sreeramulu K. Production of alkaliphilic, halotolerant, thermostable cellulase free xylanase by *Bacillus halodurans* PPKS-2 using agro waste: single step purification and characterization. *World J Microbiol Biotechnol*. 2012 Jan; 28 (1): 183-192.
- Purves K, Macintyre L, Brennan D, Hreggviðsson GO, Kuttner E, Ásgeirsdóttir ME, Young LC, Green DH, Ebel RE, Duncan KR. Using Molecular Networking for Microbial Secondary Metabolite Bioprospecting. *Metabolites*. 2016 Mar; 6 (1): 2.

- Quirino BF, Pappas GJ, Tagliaferro AC, Collevatti RG, Neto EL, Silva MR da, Bustamante MM, Krüger RH. Molecular phylogenetic diversity of bacteria associated with soil of the savanna-like Cerrado vegetation. *Microbiol Res*. 2009; 164(1): 59-70.
- Rabbani M, Bagherinejad MR, Sadeghi HMM, Shariat ZS, Etemadifar Z, Moazen F, Rahbari M, Mafakher L, Zaghian S. Isolation and characterization of novel thermophilic lipase-secreting bacteria. *Braz J Microbiol*. 2013 Dec; 44 (4): 1113–1119.
- Rabbani M, Sadeghi HMM, Moazen F, Rahimi M, Salehi G. Cloning and Expression of Randomly Mutated *Bacillus subtilis*  $\alpha$ -Amylase Genes in HB101. *Biotechnol Res Int*. 2011 Jun; 2011: 305956.
- Rabha M, Sharma S, Acharjee S, Sarmah BK. Isolation and characterization of *Bacillus thuringiensis* strains native to Assam soil of North East India. *3 Biotech*. 2017 Oct; 7 (5): 303.
- Rahman SS, Siddique R, Tabassum N. Isolation and identification of halotolerant soil bacteria from coastal Patenga area. *BMC Res Notes*. 2017 Oct; 10: 531.
- Raj A, Kumar S, Singh SK, Kumar M. Characterization of a New *Providencia* sp. Strain X1 Producing Multiple Xylanases on Wheat Bran. *Sci World J*. 2013 Nov; 2013: 386769.
- Rao MB, Tanksale AM, Ghatge MS, Deshpande VV. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. *MicrobiolMolBiol Rev*. 1998 Sep; 62(3): 597–635.
- Rastogi G, Bhalla A, Adhikari A, Bischoff KM, Hughes SR, Christopher LP, Sani RK. Characterization of thermostable cellulases produced by *Bacillus* and *Geobacillus* strains. *Bioresour Technol*. 2010 Nov; 101(22): 8798-8806.
- Ratanakhanokchai K, Waeonukul R, Pason P, Tachaapaikoon C, Kyu KL, Sakka K, Kosugi A, Mori Y. Paenibacillus curdolanolyticus Strain B-6 Multienzyme Complex: A Novel System for Biomass Utilization. In: Matovic MD. *Biomass Now - Cultivation and Utilization*. InTech, 2013 Apr 30. Chap 16. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/biomass-now-cultivation-and-utilization/paenibacillus-curdolanolyticus-strain-b-6-multienzyme-complex-a-novel-system-for-biomass-utilization>>. Acessado em: 11 de Janeiro de 2017.
- Romano N, Gioffré A, Sede SM, Campos E, Cataldi A, Talia P. Characterization of cellulolytic activities of environmental bacterial consortia from an Argentinian native forest. *Curr Microbiol*. 2013 Aug; 67 (2): 138-147.
- Rooney AP, Price NPJ, Ehrhardt C, Swezey JL, Bannan JD. Phylogeny and molecular taxonomy of the *Bacillus subtilis* species complex and description of *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* subsp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2009 Oct; 59(Pt 10):2429-36.
- Sahoo RK, Subudhi E, Kumar M. Quantitative approach to track lipase producing *Pseudomonas* sp. S1 in nonsterilized solid state fermentation. *Lett Appl Microbiol*. 2014 Jun; 58 (6):610-6.



Sanjivkumar M, Silambarasan T, Palavesam A, Immanuel G. Biosynthesis, purification and characterization of  $\beta$ -1,4-xylanase from a novel mangrove associated actinobacterium *Streptomyces olivaceus* (MSU3) and its applications. *Protein Expr Purif.* 2017 Feb; 130: 1-12.

Saranya P, Kumari HS, Rao BP, Sekaran G. Lipase production from a novel thermo-tolerant and extreme acidophile *Bacillus pumilus* using palm oil as the substrate and treatment of palm oil-containing wastewater. *Send to Environ Sci Pollut Res Int.* 2014 Mar; 21 (5): 3907-3919.

Saravanan D, Radhakrishnan M, Balagurunathan R. Bioprospecting of bacteria from less explored ecosystem. *J Chem Pharm Res.* 2015; 7(3): 852-857.

Saxena R, Singh R. Amylase production by solid-state fermentation of agro-industrial wastes using *Bacillus sp.*. *Braz J Microbiol.* 2011 Dec; 42 (4): 1334–1342.

Sepahy AA, Ghazi S, Sepahy MA. Cost-Effective Production and Optimization of Alkaline Xylanase by Indigenous *Bacillus mojavensis* AG137 Fermented on Agricultural Waste. *Enzyme Res.* 2011 Aug; 2011: 593624.

Sethi S, Datta A, Gupta BL, Gupta S. Optimization of Cellulase Production from Bacteria Isolated from Soil. *ISRN Biotechnol.* 2013 Feb 19; 2013:985685.

Sessitsch A, Weilharter A, Gerzabek MH, Kirchmann H, Kandeler E. Microbial Population Structures in Soil Particle Size Fractions of a Long-Term Fertilizer Field Experiment. *Appl Environ Microbiol.* 2001 Sep; 67(9): 4215-4224.

Shafee N, Aris SN, Rahman RNZA, Basri M, Salleh AB. Optimization of Environmental and Nutritional Conditions for the Production of Alkaline Protease by a Newly Isolated Bacterium *Bacillus cereus* Strain 146. *J Appl Sci Res.* 2005; 1(1): 1-8.

Shah S, Sharma S, Gupta MN. Biodiesel Preparation by Lipase-Catalyzed Transesterification of *Jatropha* Oil. *Energ Fuel.* 2004 Jan 3; 18(1): 154-159.

Sharma M, Mehta S, Kumar A. Purification and Characterization of Alkaline Xylanase Secreted from *Paenibacillus macquariensis*. *Adv Microbiol.* 2013 Mar; 3 (1): 32-41.

Sharma P, Sharma N, Pathania S, Handa S. Purification and characterization of lipase by *Bacillus methylotrophicus* PS3 under submerged fermentation and its application in detergent industry. *J Gen Eng Biotechnol.* 2017 Dec; 15 (2): 369-377.

Siala R, Hammemi I, Sellimi S, Vallaeyts T, Kamoun AS, Nasri M. *Arthrobacter arilaitensis* Re117 as a Source of Solvent-Stable Proteases: Production, Characteristics, Potential Application in the Deproteinization of Shrimp Wastes and Evaluation in Liquid Laundry Commercial Detergents. *Adv Biosci Biotechnol.* 2015 Feb 15; 6: 105-119.

Seong Y, Ryu ST, Lee SB, Moon TW. Purification and Characterization of Branching Specificity of a Novel Extracellular Amylolytic Enzyme from Marine

- Hyperthermophilic *Rhodothermus marinus*. *J Microbiol Biotechnol*. 2008; 18(3): 457–464.
- Simair AA, Qureshi AS, Khushk I, Ali CH, Lashari S, Bhutto MA, Mangrio GS, Lu C. Production and Partial Characterization of  $\alpha$ -Amylase Enzyme from *Bacillus* sp. BCC 01-50 and Potential Applications. *Biomed Res Int*. 2017 Jan; 2017: 9173040.
- Singh JS, Pandey VC, Singh DP. Efficient soil microorganisms: A new dimension for sustainable agriculture and environmental development. *Agric Ecosyst Environ*. 2011 Mar; 140(3): 339–353.
- Singh R, Kumar M, Mittal A, Mehta PK. Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. *3 Biotech*. 2016 Dec; 6(2): 174.
- Sirisha E, Rajasekar N, Narasu ML. Isolation and Optimization of Lipase Producing Bacteria from Oil Contaminated Soils. *Adv Biol Res*. 2010 Jan; 4(5): 249-252.
- Sivaramakrishnan S, Gangadharan D, Nampoothiri KM, Soccol CR, Pandey A.  $\alpha$ -Amylases from Microbial Sources – An Overview on Recent Developments. *Food Technol Biotechnol*. 2006 Apr; 44(2): 173-184.
- Soni A, Oey I, Silcock P, Bremer P. *Bacillus* Spores in the Food Industry: A Review on Resistance and Response to Novel Inactivation Technologies. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. 2016 Nov; 15 (6): 1139-1148.
- Souza PM, Bittencourt ML de A, Caprara CC, Freitas M de, Almeida RPC de, Silveira D, Fonseca YM, Filho EXF, Junior AP, Magalhães PO. A biotechnology perspective of fungal proteases. *Braz J Microbiol*. 2015 June; 46(2): 337-346.
- Souza PM, Magalhães PO. Application of Microbial  $\alpha$ -amilase in Industry - A Review. *Braz J Microbiol*. 2010 Oct-Dec; 41(4): 850–861.
- Srinivas TNR, Kumar PA, Madhu S, Sunil B, Sharma TVRS, Shivaji S. *Cesiribacter andamanensis* gen. nov., sp. nov., isolated from a soil sample from a mud volcano. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2011 Jul 23; 61(7):1521-1524.
- Sumantha A, Larroche C, Pandey A. Microbiology and Industrial Biotechnology of Food-Grade Proteases: A Perspective. *Food Technol Biotechnol*. 2006 Jan; 44(2): 211-220.
- Sun JQ, Xu L, Wu XL. *Lysinibacillus alkalisoli* sp. nov., isolated from saline-alkaline soil. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2017 Jan; 67 (1): 67-71.
- Sundarram A, Murthy TPK.  $\alpha$ -Amylase Production and Applications: A Review. *J Appl Environ Microbiol*. 2014 Jun; 2(4): 166-175.
- Tallur PN, Sajjan DB, Mulla SI, Talwar MP, Pragasam A, Nayak VM, Ninnekar HZ, Bhat SS. Characterization of antibiotic resistant and enzyme producing bacterial strains isolated from the Arabian Sea. *3 Biotech*. 2016 Jun; 6 (1): 28.

- Teather RM, Wood PJ. Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Appl Environ Microbiol.* 1982 Apr; 43(4): 777–780.
- Thakur S, Sharma NK, Thakur N, Savitri, Bhalla TC. Organic solvent tolerant metallo protease of novel isolate *Serratia marcescens* PPB-26: production and characterization. *3 Biotech.* 2016 Dec; 6(2): 180.
- Tiwari R, Singh PK, Singh S, Nain PKS, Nain L, Shukla P. Bioprospecting of novel thermostable  $\beta$ -glucosidase from *Bacillus subtilis* RA10 and its application in biomass hydrolysis. *Biotechnol Biofuels.* 2017 Oct; 10: 246.
- Torsvik V, Ovreas L, Thingstad TF. Prokaryotic Diversity-Magnitude, Dynamics, and Controlling Factors. *Science.* 2002 May 10; 296(5570):1064-1066.
- Townsley L, Caro L, Kelkar H, Shank EA. Draft Genome Sequence of *Bacillus luciferensis* Isolated from Soil. *Genome Announc.* 2016 Oct; 4 (5): e01140-16.
- van der Maarel MJEC, van der Veen B, Uitdehaag JCM, Leemhuis H, Dijkhuizen L. Properties and applications of starch-converting enzymes of the  $\alpha$ -amylase family. *J Biotechnol.* 2002 Mar 28; 94(2):137-155.
- Verma N, Thakur S, Bhatt AK. Microbial Lipases: Industrial Applications and Properties (A Review). *Int Res J Biol Sci.* 2012 Dec; 1(8): 88-92.
- Vester JK, Glaring MA, Stougaard P. Improved cultivation and metagenomics as new tools for bioprospecting in cold environments. *Extremoph.* 2015 Jan; 19(1):17-29.
- Vijayaraghava P, Vincent SGP. A simple method for the detection of protease activity on agar plates using Bromocresolgreen Dye. *J Biochem Tech.* 2013 Jun; 4 (3): 628-630.
- Vilain S, Luo Y, Hildreth MB, Brözel VS. Analysis of the Life Cycle of the Soil Saprophyte *Bacillus cereus* in Liquid Soil Extract and in Soil. *Appl Environ Microbiol.* 2006 Jul; 72 (7): 4970–4977.
- Wang F, Li F, Chen G, Liu W. Isolation and characterization of novel cellulase genes from uncultured microorganisms in different environmental niches. *Microbiol Res.* 2009 Nov; 164 (6): 650-657.
- Wang P, Wang P, Tian J, Yu X, Chang M, Chu X, Wu N. A new strategy to express the extracellular  $\alpha$ -amylase from *Pyrococcus furiosus* in *Bacillus amyloliquefaciens*. *Sci Rep.* 2016 Feb; 6: 22229.
- Wang Q, Hou Y, Ding Y, Yan P. Purification and biochemical characterization of a cold-active lipase from Antarctic sea ice bacteria *Pseudoalteromonas* sp. NJ 70. *Mol Biol Rep.* 2012 Jun; 39: 9233–9238.
- Watanabe H, Tokuda G. Animal cellulases. *Cell Mol Life Sci.* 2001 Aug; 58(9): 1167-1178.

Willerding AL, de Oliveira LA, Moreira FW, Germano MG, Chagas AF. Lipase Activity among Bacteria Isolated from Amazonian Soils. *Enzyme Res.* 2011 Oct; 2011: 720194.

Winkler UK, Stuckmann M. Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. *J Bacteriol.* 1979 Jun; 138(3): 663–670.

Wohlgemuth R. Biocatalysis-key to sustainable industrial chemistry. *Curr Opin Biotechnol.* 2010 Dec; 21(6): 713-724.

Woo HL, Hazen TC, Simmons BA, DeAngelis KM. Enzyme activities of aerobic lignocellulolytic bacteria isolated from wet tropical forest soils. *Syst Appl Microbiol.* 2014 Feb; 37 (1): 60-67.

Wu B, Zheng S, Pedroso MM, Guddat LW, Chang S, He B, Schenk G. Processivity and enzymatic mechanism of a multifunctional family 5 endoglucanase from *Bacillus subtilis* BS-5 with potential applications in the saccharification of cellulosic substrates. *Biotechnol Biofuels.* 2018 Jan; 11: 20.

Xie F, Quan S, Liu D, Ma H, Li F, Zhou F, Chen G. Purification and characterization of a novel  $\alpha$ -amylase from a newly isolated *Bacillus methylotrophicus* strain P11-2. *Process Biochem.* 2014; 49 (1): 47–53.

Yamada C, Sawano K, Iwase N, Matsuoka M, Arakawa T, Nishida S, Fushinobu S. Isolation and characterization of a thermostable lipase from *Bacillus thermoamylovorans* NB501. *J Gen Appl Microbiol.* 2017 Jan 25; 62 (6): 313-319.

Ye M, Sun L, Yang R, Wang Z, Qi KZ. The optimization of fermentation conditions for producing cellulase of *Bacillus amyloliquefaciens* and its application to goose feed. *R Soc Open Sci.* 2017 Oct; 4 (10): 171012.

Yin LJ, Lin HH, Chiang YI, Jiang ST. Bioproperties and purification of xylanase from *Bacillus* sp. YJ6. *J Agric Food Chem.* 2010 Jan 13; 58 (1): 557-562.

Yoon KH. Cloning of a *Bacillus subtilis* AMX-4 xylanase gene and characterization of the gene product. *J Microbiol Biotechnol.* 2009 Dec; 19 (12): 1514-1519.

Zarafeta D, Kissas D, Sayer C, Gudbergsdottir SR, Ladoukakis E, Isupov MN, Chatziioannou A, Peng X, Littlechild JA, Skretas G, Kolisis FN. Discovery and Characterization of a Thermostable and Highly Halotolerant GH5 Cellulase from an Icelandic Hot Spring Isolate. *PLoS One.* 2016 Jan 7; 11 (1): e0146454.

Zhang Y-HP, Himmel ME, Mielenz JR. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. *Biotechnol Adv.* 2006 Sep-Oct; 24(5): 452-481.

Zhao F, Feng Y, Chen R, Zhang J, Lin X. *Lysinibacillus alkaliphilus* sp. nov., an extremely alkaliphilic bacterium, and emended description of genus *Lysinibacillus*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2015 Aug; 65(8): 2426-2431.

Zhao S, Yan T, He Q, Yang L, Yin X, Li C, Mao L, Liao LS, Huang J, Xie S, Nong D, Zhang Z, Jing L, Xiong Y, Duan C, Liu J, Feng J. Comparative genomic, transcriptomic and secretomic profiling of *Penicillium oxalicum*HP7-1 and its cellulase and xylanase hyper-producing mutant EU2106, and identification of two novel regulatory genes of cellulase and xylanase gene expression. *Biotechnol Biofuels*. 2016 Sep 23; 9: 203.

Zvereva EA, Fedorova TV, Kevbrin VV, Zhilina TN, Rabinovich ML. Cellulase activity of a haloalkaliphilic anaerobic bacterium, strain Z-7026. *Extremophiles*. 2006 Feb; 10 (1): 53-60.

**APÊNDICE A (artigo submetido)****Protease screening of soil bacteria isolated from preserved environments in the Cerrado biome, Brazil**

Bianca Aguiar Alves<sup>a</sup>, Alessandra Barbosa Ferreira Machado<sup>a</sup>, Aline Dias Paiva<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Campus I - Praça Manoel Terra, 330, CEP 38025-015, Uberaba-MG, Brasil

\*Corresponding author:

Aline Dias Paiva

Laboratory of Microbiology  
Department of Microbiology, Immunology and Parasitology.  
Institute of Biological and Natural Sciences, Federal University of Triângulo Mineiro,  
Uberaba, MG, Brazil  
Phone: +55 34 37006480

Email address: [aline.paiva@uftm.edu.br](mailto:aline.paiva@uftm.edu.br)

E-mail adress:

Highlights:

- 32 bacterial strains with proteolytic activity were isolated from soil samples from preserved environments in the Cerrado biome, in Uberaba, Brazil.
- Five strains were selected as the best protease producers: AP-10 (201.111 U/mL), AP-2 (188.611 U/mL), AB-4 (184.444 U/mL), AE-2 (211.944 U/mL) and MB-3 (260.555 U/mL).
- The 5 isolates selected were identified as belonging to the genus *Bacillus*.

**Abstract**

This study describes the isolation of protease-producing bacteria from soil samples collected from preserved environments in the Cerrado biome, in Uberaba, Brazil. Proteolytic activity was confirmed in 32 of the 121 bacterial strains isolated. Based on the enzymatic quantification, five strains were selected as the best protease producers, AP-10 (201.111 U/mL), AP-2 (188.611 U/mL), AB-4 (184.444 U/mL), AE-2 (211.944 U/mL) and MB-3 (260.555 U/mL). These isolates were identified as *Bacillus toyonensis* BCT7112 (isolate AB-4), *Bacillus licheniformis* DSM (isolates AP-2 and AE-2), *Bacillus siamensis* PD A10 (isolate AP-10) and *Bacillus thuringiensis* NBRC 101235 (isolate MB-3). *B. licheniformis* AE-2, *B. thuringiensis* MB-3 and *B. licheniformis* AP-2 produced pH-stable proteases, and high hydrolytic activity was observed in all the pH values evaluated (2 to 12). *B. siamensis* AP-10, *B. licheniformis* AE-2, *B. toyonensis* AB-4 and *B. licheniformis* AP-2 produced thermostable proteases, which were active in all evaluated temperatures of 10 to 80 °C. The proteolytic activity was not influenced by the presence of the metal ions. To our knowledge, this is the first time that protease-producing bacteria isolated from Brazilian Cerrado biome are described, and the proteases produced have potential biotechnological application.

**Keywords:** bioprospecting, protease, *Bacillus*, enzymatic activity, industrial biotechnology

**Importance section**

The study provides valuable information about the potential of Cerrado biome as a reservoir of microorganisms of biotechnological interest and demonstrates important findings of significance to this field of research.

## 1. Introduction

Proteases are enzymes that catalyze the hydrolysis of peptide bonds, resulting in protein degradation into peptides and amino acids, and also can act in specific post-translational modification reactions (Souza *et al.*, 2015). Proteolytic enzymes stand out among the enzymes used for industrial applications, representing about 60 % of all commercial enzymes worldwide (Saggu *et al.*, 2017). Proteases can be applied in different industrial sectors, including food industry, detergent additives, textiles, pharmaceuticals, waste treatment, diagnostic reagents, medical application, leather tanning and silver recovery (Marathe *et al.*, 2017; Al-Abdalall *et al.*, 2016; Jisha *et al.*, 2013; Sumantha *et al.*, 2006).

Proteolytic enzymes are classified according to their mechanism of action and active site structure into endopeptidases, which act on the peptide bonds of the inner region (such as serine protease, cysteine protease, aspartic protease and metalloprotease), and exopeptidases, which act at the ends of the polypeptide chain (aminopeptidase and carboxypeptidase) (Rao *et al.*, 1998).

Proteases are synthesized by all living organisms, being essential for cellular metabolism. Microorganisms are able to produce different types of extracellular enzymes, and proteolytic enzymes obtained from microbial sources are very attractive when compared to those from plants or animals, due to several conditions: microorganisms can be cultured in short time and can produce large quantities of the desired enzyme; the majority of microbial proteases are secreted into the extracellular medium, being easier to purify, have lower cost, higher stability and longer shelf life (Sharma *et al.*, 2017).

The currently commercially available proteases are not sufficient to meet the increasing demands of the world market. Hence, there is a stimulus for the search of new enzymes, with suitable characteristics for industrial use. A good alternative for enzyme prospecting is to explore the biodiversity that allows a discovery of microbial strains capable of producing proteases with the desirable features.

This study describes the screening and identification of protease-producing bacteria from soil samples collected from preserved environments in the Cerrado biome,



in Uberaba, Brazil. The proteolytic enzymes were quantified and partially characterized in different pH values and incubation temperatures.

## **2. Material and Methods**

### **2.1 Sample collection and screening of protease-producing bacteria**

Soil samples were collected, in April 2017, in preserved environments in the Cerrado biome, in Uberaba, Minas Gerais, Brazil. Three areas, surrounded by natural vegetation, were selected and the samples were collected at a depth of 10 cm. The soil samples were stored in sterile plastic tubes in thermal box, protect from heat and light exposure, until their arrival at the laboratory, where the samples were kept refrigerated until the analyses.

Protease-producing bacteria were screened as described by Fulzele *et al.* (2011), with modifications. Briefly, 1 g of each soil sample was suspended in 9 mL of sterile saline solution (0.85 % NaCl), homogenized for 1 min, followed by 1 h of resting at room temperature. Aliquots of 0.1 mL of the suspensions were spread on skim milk agar medium (pH 7), containing 0.5 % peptone, 0.3 % yeast extract, 2 % skim milk powder and 2 % agar. The plates were incubated at 37 °C, under aerobic and microaerophilic conditions. After 24-48 h, the plates were evaluated regarding the presence of clear hydrolysis zones around the bacterial colonies, indicative of substrate degradation.

In order to confirm the proteolytic activity, all the colonies surrounded by clear zones were transferred to new plates containing skim milk medium. Pure cultures were submitted to Gram staining and preserved at -20 °C in 20 % glycerol-containing BHI medium.

Protease-producing bacteria were then analyzed by the Enzymatic Index (EI), expressed by the relationship between the hydrolysis zone diameter and the colony diameter (Hankin and Anagnostakis, 1975). Bacterial isolates showing  $EI \geq 1.5$  were selected for further experiments.

### **2.2 16S rRNA gene sequence analysis**

The protease-producing isolates were submitted to identification by 16S rRNA gene sequencing. Total DNA was extracted using the phenol-chloroform method

(Oliveira *et al.*, 2002). The integrity of the extracted DNA was verified by agarose gel electrophoresis (0.8 %) using 1X TAE buffer (40 mM Tris base, 20 mM acetic acid and 1 mM EDTA - pH 8.0). The gel was stained with ethidium bromide ( $0.2 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) and visualized using UV transilluminator. DNA concentration and purity were measured by NanoDrop (*Thermo Scientific*), and the samples were diluted to  $50 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$  and stored at  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ .

16S rRNA gene was amplified using the pair of universal primers 27F (AGAGTTTGATCMTGGCTCA) and 1492R (TACGGYTACCTTGTTACGAC). The PCR reaction (25  $\mu\text{L}$ ) was composed by 17.325  $\mu\text{L}$  milli-Q water, 2.5  $\mu\text{L}$  10X buffer, 1.25  $\mu\text{L}$   $\text{MgCl}_2$  (50 mM), 0.625  $\mu\text{L}$  dNTPs (10 mM), 1  $\mu\text{L}$  primer F (10 pM/ $\mu\text{L}$ ), 1  $\mu\text{L}$  primer R (10 pM/ $\mu\text{L}$ ), 0.3  $\mu\text{L}$  Taq DNA Polymerase (5 U/ $\mu\text{L}$ ) (*ThermoScientific*) and 1  $\mu\text{L}$  DNA (50 ng/ $\mu\text{L}$ ). The PCR conditions included an initial denaturation step at  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  for 5 min, followed by 35 cycles of denaturation at  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  for 30 s, annealing at  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  for 30 s, and primer extension at  $72 \text{ }^\circ\text{C}$  for 1 min. The amplification cycle was followed by a final extension at  $72 \text{ }^\circ\text{C}$  for 7 min. The amplification reactions were performed in DNA thermal cycler GeneAmp PCR System 9700 (*Applied Biosystems*). The PCR products were analyzed by agarose gel electrophoresis (1.2 %), stained with ethidium bromide ( $0.2 \mu\text{g/mL}$ ) and visualized using UV transilluminator.

The amplicons were purified using Invisorb® Fragment CleanUp kit (*Stratec Molecular*), following the manufacturer instructions. The samples were quantified with NanoDrop and the sequencing was performed by the chain termination method (Sanger Method). Two reactions were performed, using the forward and the reverse primers. All consensus sequences obtained were compared to those available in GenBank database (NCBI), using the BLASTn approach (Altschul *et al.*, 1990). All sequences obtained were deposited in GenBank database.

### 2.3 Phylogenetic analyses

All sequences were manually edited and trimmed to remove ambiguous regions. The sequences were aligned by the Clustal W multiple sequence alignment program. The phylogenetic tree was reconstructed with MEGA 7.0 program, and the Maximum Likelihood method was used. *Brevibacillus brevis* YNP-1 was used as the outgroup. Bootstrap analysis (1000 replicates) was performed with Kimura-2-parameter model to obtain confidence estimates for the phylogenetic tree.

## 2.4 Protease production along bacterial cell growth

Skim milk broth (same composition described) was inoculated with 1 % of an overnight culture of the selected bacterial isolates and incubated at 37 °C, in aerobic or microaerophilic conditions, for up to 96 h. At time intervals of 24 h, samples were taken to determine the optical density (600 nm) in a spectrophotometer UV-1600 (*Pró-Análise*) and also to separate the cells by centrifugation (12000 g, 15 min). The supernatant was used as crude protease preparation and its proteolytic activity was measured by agar well assay, in which the crude enzyme preparations were added into wells made in skim milk agar (Vijayaraghava and Vincent, 2013). The plates were incubated at 37 °C, in aerobic or microaerophilic conditions, and proteolytic activity was assessed from the presence of clear zones around the wells.

## 2.5 Protease activity assay

The proteolytic activity of the crude preparations was performed as described by Secades and Guijarro (1999), using azocasein as substrate. Crude protease preparations (120 µL) were incubated with 480 µL of azocasein (1 %) in Tris-HCl (0.1 M, pH 8.5), for 30 minutes, at 30 °C. The reactions were stopped by adding 600 µL of trichloroacetic acid (10 %), left on ice for 30 min, the precipitates were removed by centrifugation (13000 g, 10 min) and 800 µL of supernatant were collected and mixed to 200 µL of NaOH (1.8 M). The absorbance was measured in a spectrophotometer, at 420 nm. One unit (U) of protease activity was defined as the amount of enzyme to produce an increase in absorbance ( $A_{420}$ ) of 0.01 unit, after 30 min, at 30 °C.

## 2.6 Partial Characterization of the proteases

In order to partially characterize the proteases, the effect of pH, temperature and the presence of metal ions during reaction were evaluated. The enzymatic reaction was performed by incubating the crude protease preparations with the specific substrate under the selected conditions and protein activity assay was carried out as described above.

### 2.6.1 Effect of pH on enzyme activity

The effect of pH on protease activity was assayed using pH values, ranging from 2 to 12, and appropriate buffers (pH 2: 0.2 M potassium chloride-HCl; pH 4 and 6: 0.5

M sodium acetate; pH 7 and 8: 0.05 M sodium phosphate; pH 10: 0.05 M Tris-HCl; pH 12: 0.1 M sodium phosphate-NaOH) under standard conditions. The highest enzymatic activity observed was considered as 100 %, and the relative activity was calculated for the other pH values as the percentage of activity in proportion to the highest activity.

#### 2.6.2 *Effect of temperature on enzyme activity*

The influence of temperature on protease activity was determined by incubating the reaction mixture at different temperatures (10 to 80 °C, with increments of 10 °C), under standard assay conditions. The relative activity (%) was calculated as described.

#### 2.6.3 *Effect of metal ions on enzyme activity*

The effect of metal ions on protease activity was investigated using CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>, NaCl and FeSO<sub>4</sub> (5 mM). The crude protease preparations were incubated with different metal ions, for 5 minutes, at room temperature, and the protease activity was measured using the optimal conditions of pH and temperature for each enzyme, defined in the experiments described above. The relative activity (%) was calculated as described.

### 2.7 Statistical analyses

Unpaired t Test with Welch's correction and one-way analysis of variance (ANOVA) with Dunnett's multiple comparisons test ( $p < 0.05$ ) were performed using GraphPad Prism software version 7.04.

## 3. Results

### 3.1 Isolation and screening of protease-producing bacteria

From soil samples collected in preserved environments in the Cerrado biome, 121 colonies were obtained after inoculation of  $10^{-3}$  to  $10^{-5}$  dilutions on skim milk agar, and incubation at 37 °C, for up to 2 days. The isolates were named on the basis of the atmosphere used for isolation and the sample source, followed by the number of the isolate. The isolates obtained in aerobic conditions were identified as A, while the

isolates obtained in microaerophilic conditions were named as M; bacterial isolates from sample 1 were named as B and from sample 2 were named as P, while the isolates from sample 3 were defined as E.

The proteolytic activity, evidenced by the formation of hydrolytic zones around the bacterial colonies, after subculture in skim milk agar, was confirmed in 32 of the 121 isolated colonies, of which 11 isolates were obtained from soil sample 1, 15 isolates from soil sample 2, and 6 isolates from soil sample 3. After morphological characterization, it was observed that 31 of the proteolytic bacteria were Gram positive and 31 had rod shaping; 23 isolates were isolated in aerobiosis, and 9 in microaerophilic conditions (Table 1).

The Enzymatic Index varied from 1.1 to 3.5, and 15 protease-producing isolates showed  $EI \geq 1.5$  (Table 1). These 15 isolates were selected for analyzing protease production in fermentation broth.

### **3.2 Protease production during bacterial growth and quantification of the extracellular enzymes**

The bacterial growth was monitored in skim milk broth, over 96 hours. Most of the isolates ( $n=11$ ) reached the stationary phase after 48 h of growth. Protease production was observed already in the first 24 h of growth, and it was maintained over the 96 h of bacterial growth monitoring (Table 2).

Based on these results, enzymatic quantification assays were performed, using azocasein as substrate, and the protease produced was quantified after 24 and 48 h of bacterial growth. Among the 15 isolates, after 24 h of growth, maximum protease activity (113.056 U/mL) was obtained from isolate AP-1; after 48 h of growth, the isolate MB-3 showed maximum protease yield (260.555 U/mL). In total, 7 isolates showed higher production of extracellular proteases after 48 h of growth ( $p < 0.05$ ), whereas only two isolates show significantly higher production in 24 h. The other isolates showed no significant difference in the rate of enzyme production during the incubation period analyzed ( $p > 0.05$ ) (Figure 1).

Based on the protease activity indexes, the 5 hyper protease producing isolates, AB-4 (184.444 U/mL), AP-2 (188.611 U/mL), AP-10 (201.111 U/mL), AE-2 (211.944 U/mL) and MB-3 (260.555 U/mL), were then selected for the further studies.

### 3.3 Genetic identification of protease-producing bacteria

Total bacterial DNA was efficiently extracted by the phenol-chloroform method, resulting in a final concentration of 229.7 to 893.9 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  and low contamination by proteins and salts (suitable 260/280 and 260/230 ratios). The amplification of 16S rRNA gene, using the 27F and 1492R universal primers, generated amplicons in the size of 1500 bp (expected size of 1465 bp). The purified PCR products were sequenced and the sequences were compared to those available in the GenBank database. The percentages of identity for the best score in GenBank were at least equal to 97 % with the size of the analyzed fragment.

According to the partial 16S rRNA gene sequences obtained, all 5 protease-producing isolates were identified as belonging to the genus *Bacillus* and showed high identities with four different species: *Bacillus toyonensis* BCT7112 (isolate AB-4), *Bacillus licheniformis* DSM 13 (isolates AP-2 and AE-2), *Bacillus siamensis* PD A10 (isolate AP-10) and *Bacillus thuringiensis* NBRC 101235 (isolate MB-3) (Table 3).

The 16S rRNA gene sequences of the proteolytic bacterial isolates were deposited in the GenBank sequence database under accession numbers **MH346227** (*B. toyonensis* AB-4), **MH329347** (*B. licheniformis* AP-2), **MH329349** (*B. licheniformis* AE-2), **MH329348** (*B. siamensis* AP-10) and **MH329350** (*B. thuringiensis* MB-3).

Analyses of the phylogenetic tree have showed that *B. siamensis* AP-10 was related to *B. licheniformis* AP-2 and *B. licheniformis* AE-2, while *B. toyonensis* AB-4 and *B. thuringiensis* MB-3 were related as close groups, confirming that they belong to nearby phylogenetic groups (Figure 2).

### 3.4 Diversity of the proteases produced

The diversity of the extracellular proteases produced was evaluated regarding the maintenance of the hydrolytic activity in different pH values, in a range of temperature and presence of metal ions.

The hydrolytic activity of the crude protease preparations varied depending on the pH. The crude protease preparations obtained from the isolates *B. licheniformis* AE-2, *B. thuringiensis* MB-3 and *B. licheniformis* AP-2 were the most pH stable, and the same proteolytic activity was observed in all pH values evaluated (2-12) ( $p > 0.05$ ) (Figure 3b, 3c, 3e). The isolate *B. siamensis* AP-10 produced enzymes with higher protease activity at pH values 4 to 12 ( $p > 0.05$ ); while that at pH 2 this activity was

reduced ( $p < 0.05$ ) (Figure 3a). Regarding the extract obtained from *Bacillus toyonensis* AB-4 higher protease activity was observed between pH 7 to 10 ( $p > 0.05$ ); however, the enzymatic activity of these extracts has been reduced at pH values of 2, 4, 6 and 12 ( $p < 0.05$ ) (Figure 3d).

The temperature exerted a high influence on proteolytic activity of the crude preparations. The activity of the proteases produced by the isolates *B. siamensis* AP-10, *B. licheniformis* AE-2, *B. toyonensis* AB-4 and *B. licheniformis* AP-2 showed optimum temperature in all values in all evaluated temperatures of 10 to 80 °C ( $p > 0.05$ ) (Figure 4a, 4b, 4c, 4e). The crude proteases obtained from the isolate *B. thuringiensis* MB-3 presented greater activity in 50 and 60 °C ( $p > 0.05$ ), while that for the other values there was a reduction on activity ( $p < 0.05$ ) (Figure 4d).

The proteolytic activity was not influenced by the presence of the metal ions. None of the five isolates had induction or inhibition of their activity with the addition of these ions (Figure 5).

#### 4. Discussion

Diverse microorganisms have been investigated in an effort to obtain new enzyme-producing isolates, and in order to increase productivity and enzyme stability. The search for new microbial species is stimulated by industrial and manufacturing companies, looking for species with particular characteristics.

Microbes from several habitats have been examined by many researchers to obtain industrially suitable enzymes. Among them, it is possible to highlight the fungal genera *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Humicola*, *Thermoascus* and *Thermomyces* (Souza *et al.*, 2015). In addition, several bacterial genera such as *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Halomonas*, *Arthrobacter*, *Serratia*, *Alcaligenes* and *Aeromonas* (Shafee *et al.*, 2005; Cui *et al.*, 2015) have also been given attention to protease production.

Protease-producing bacteria play essential roles in degrading organic nitrogen in different environments, but little is known about the diversity of proteolytic bacteria in Brazilian Cerrado soils. In this study, the identification of cultivable protease-producing bacteria isolated from soil collected in the Cerrado biome, Brazil, and the diversity of the extracellular proteases synthesized by these bacteria were evaluated. To our

knowledge, this is the first report focused on protease-producing bacteria isolated from a preserved Brazilian Cerrado biome.

The molecular identification of the top five protease-producing bacteria isolated showed that all belonged to the genus *Bacillus*, which is composed of a great diversity of Gram-positive, aerobic or facultative anaerobic, rod-shaped and endospore-forming bacteria, widely distributed in nature (Sumpavapol *et al.*, 2010). This finding is consistent with the results reported by Pant *et al.* (2015) and Contesini *et al.* (2018), demonstrating that *Bacillus* is an important producer of extracellular proteases. Moreover, *Bacillus* strains are easily cultivable in laboratory and largely used for industrial production of biomolecules, such as enzymes, including those listed as Generally Recognized as Safe (GRAS), by the American Food and Drug Administration (Schallmey *et al.*, 2004), which would facilitate the use of *Bacillus* strains in future biotechnological applications.

Among the species identified in this study, *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus licheniformis* have already been reported as producers of alkaline proteases that can be used in the detergent industry (Marathe *et al.*, 2017). In addition, *Bacillus toyonensis* BCT 7112 has probiotic activity and is used as the active ingredient of the TOYOCERIN®, an additive used in animal nutrition (Jiménez *et al.*, 2013). Proteases produced by *B. toyonensis* are probably involved in its probiotic trait, being able to promote growth, assist the immune system and induce digestive enzymes, such as protease, lipase and amylase, improving health (Adorian *et al.*, 2018; Williams *et al.*, 2009).

In general, enzymes are produced by metabolically active bacteria, during the exponential phase of growth, to degrade the media substrate and increase bacterial growth. As bacterial proteases can be constitutive or partially induced, their production may also occur during the stationary phase, as a manifestation of nutrient scarcity (Gupta *et al.*, 2002). Therefore, the establishment of the incubation period for obtaining such enzymes is critical, and it varies from some hours to a week, depending on the microorganism and culture conditions (Sharma *et al.*, 2017).

In this study, although all the isolates have showed production and secretion of proteases in the first 24 h of growth, most of the isolates (n=11) reached the end of the exponential phase after 48 h of growth, in which the maximum proteolytic activity was



obtained for 7 isolates. Sundararajan *et al.* (2011) found similar production of proteases by a strain of *Bacillus*, for which the highest enzymatic activity was observed in the exponential phase. Still in agreement with our results, an incubation period of 48 h was reported for other authors as the optimal for protease production for a variety of soil bacteria (Mothe and Sultanpuram, 2016; Asha and Palaniswamy, 2018).

The isolates AP-2 and AE-2 were identified as *Bacillus licheniformis*, indicating that they could be the same isolate. However, they showed different characteristics of the protease produced, in terms of hydrolytic activities (different clear zone diameters in the well diffusion method). These results prove that although the isolates AP-2 and AE-2 belong to the same species, they are distinct strains. In this sense, the characterization of the protein emerges as a fundamental step in evaluating the enzymatic action. Parameters as temperature, pH and presence of cofactors in a reaction must be identified to optimize its catalytic action.

Although the ideal pH of each enzyme varies according to the producer strain, being described proteases that act in neutral pHs, such as those produced by *B. licheniformis* K7A (Hadjidj *et al.*, 2018) and *B. licheniformis* NH1 (Thakur *et al.*, 2016), as well as proteases whose highest activity is obtained in acidic pH (Xu *et al.*, 2015). The crude protease preparations obtained from *B. licheniformis* AE-2, *B. thuringiensis* MB-3 and *B. licheniformis* AP-2 were the most pH-stable, showing higher hydrolytic activity in all the pH values evaluated (2-12), a feature that deserves to be highlighted due to its industrial interest. Similar characteristic was found for a protease produced by *Bacillus* sp., which was highly active in a pH range of 3-12, maintaining at least 80 % of its activity, being such a characteristic considered ideal for biotechnological applications (Uttaree and Charoenpanich, 2016).

Some *Bacillus* strains have been reported to produce alkaline proteases, such as those produced by *B. toyonensis* AB-4, isolated in this study, which act at optimum pH ranging from 7 to 10. Agasthya *et al.* (2013) also reported a proteolytic strain acting at optimum alkaline pH, but at a temperature of 47 °C.

The catalytic activity of the crude protease preparations obtained from *B. siamensis* AP-10, *B. licheniformis* AE-2, *B. toyonensis* AB-4 and *B. licheniformis* AP-2 were not drastically influenced by the temperature variation evaluated in the present study. On the other hand, for the isolate *B. thuringiensis* MB-3 the maximum protease

activity was achieved at 50 and 60 °C. In agreement with these results, maximum activity at 50 or 60 °C was also observed for several other proteases produced by *Bacillus* strains (Qureshi *et al.*, 2018; Dorra *et al.*, 2018; Bashir *et al.*, 2018).

The presence of cations was not influenced the activity of the proteases produced by the five protease-producing bacteria. Which was not expected, since it has been reported that divalent cations like  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  induces and stabilizes the molecular structure of many enzymes, protecting them from possible conformational changes occurring during denaturation at high temperatures (Sousa *et al.*, 2007; Ellaiah *et al.*, 2002).

Different effects were reported to *B. thuringiensis* (Harer *et al.*, 2018) and *B. licheniformis* (Hadjidj *et al.*, 2018), for which the presence of the metal ions  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  and  $\text{Mn}^{2+}$  increased the activity of their proteases. The increase of protease activity in the presence of divalent cations, as  $\text{Fe}^{2+}$  and  $\text{Cu}^{2+}$ , was also reported for other bacteria, such as *Serratia marcescens* PPB-26 (Thakur *et al.*, 2016).

## 5. Conclusion

Five *Bacillus* strains isolated from preserved soils collected in the Cerrado biome, in Uberaba, Brazil were able to produce extracellular proteases and showed high activity in degrading azocasein.

This is the first study that investigated the protease-producing bacteria in Brazilian Cerrado biome, to our knowledge, and provided new insights on the bacterial community in the Cerrado soils, implying that this ecosystem may be a reservoir for novel and diverse enzymes, with characteristics of industrial interest.

## Acknowledgements

This work was supported by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG).

## References

- Adorian, T.J., Jamali, H., Farsani, H.G., Darvishi, P., Hasanpour, S., Bagheri, T., Roozbehfar, R., 2018. Effects of Probiotic Bacteria *Bacillus* on Growth Performance, Digestive Enzyme Activity, and Hematological Parameters of Asian Sea Bass, *Lateolabrax niloticus* (Bloch). *Probiotics Antimicrob Proteins*. <https://doi.org/10.1007/s12602-018-9393-z>.
- Agasthya, A.S., Sharma, N., Mohan, A., Mahal, P., 2013. Isolation and Molecular Characterisation of Alkaline Protease Producing *Bacillus thuringiensis*. *Cell Biochem Biophys*. 66, 45–51.
- Al-Abdalall, A.H., Al-Khaldi, E.M., 2016. Recovery of silver from used X-ray film using alkaline protease from *Bacillus subtilis* subsp. *Subtilis*. *Afr J Biotech*. 15 (26), 1413-1416.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*. 215 (3), 403-410.
- Asha, B., Palaniswamy, M., 2018. Optimization of alkaline protease production by *Bacillus cereus* FT1 isolated from soil. *J Appl Pharma Sci*. 8 (2), 119-127.
- Bashir, F., Asgher, M., Hussain, F., Randhawa, M.A., 2018. Optimum Production, Immobilization (CLEAs) and Characterization of Thermotolerant Alkaline Protease by *Bacillus licheniformis*. *Biol Macromol*. <https://doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.03.009>.
- Contesini, F.J., de Melo, R.R., Sato, H.H., 2018. An overview of *Bacillus* proteases: from production to application. *Crit Rev Biotech*. 38 (3), 321-334.
- Cui, H., Yang, M., Wang, L., Xian, C.J., 2015. Identification of a New Marine Bacterial Strain SD8 and Optimization of Its Culture Conditions for Producing Alkaline Protease. *PLoS ONE*. 10 (12), e0146067.
- Dorra, G., Ines, K., Imen, B.S., Laurent, C., Sana, A., Tabbene, O., Pascal, C., Thierry, J., Ferid, L., 2018. Purification and characterization of a novel high molecular weight alkaline protease produced by an endophytic *Bacillus halotolerans* strain CT2. *Biol Macromol*. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.01.024>.

- Ellaiah, P., Srinivasulu, B., Kunamneni, A., 2002. A review on microbial alkaline proteases. *J Sci Ind Res.* 61 (9), 690-704.
- Fulzele, R., De Sa, E., Yadav, A., Shouche, Y., Bhadekar, R., 2011. Characterization of novel extracellular protease produced by marine bacterial isolated from the Indian ocean. *Braz J Microbiol.* 42 (4), 1364-1373.
- Gupta, R., Beg, Q.K., Lorenz, P., 2002. Bacterial alkaline proteases: Molecular approaches and industrial applications. *Appl Microbiol Biotech.* 59, 15-32.
- Hadjidj, R., Badis, A., Mechri, S., Eddouaouda, K., Khelouia, L., Annane, R., Hattab, M.E., Jaouadi, B., 2018. Purification, biochemical, and molecular characterization of novel protease from *Bacillus licheniformis* K7A. *Inter J Biol Macromol.* <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.03.167>.
- Hankin, R., Anagnostakis, S.L., 1975. The use of solid media for detection of enzymes production by fungi. *Mycol.* 67 (3), 596-607.
- Harer, S.L., Bhatia, M.S., Bhatia, N.M., 2018. Isolation, purification and partial characterization of thermostable serine alkaline protease from a newly isolated *Bacillus thuringiensis*-SH-II-1A. *Afri J Microbiol.* 17 (7), 178-188.
- Jiménez, G., Urdiain, M., Cifuentes, A., López-López, A., Blanch, A.R., Tamames, J., Kämpfer, P., Kolstø, A.B., Ramón, D., Martínez, J.F., Codoñer, F.M., Rosselló-Móra, R., 2013. Description of *Bacillus toyonensis* sp. nov., a novel species of the *Bacillus cereus* group, and pairwise genome comparisons of the species of the group by means of ANI calculations. *Syst Appl Microbiol.* 36 (6), 383-91.
- Jisha, V.N., Smitha, R.B., Pradeep, S., Sreedevi, S., Unni, K.N., Sajith, S., Priji, P., Josh, M.S., Benjamin, S., 2013. Versatility of microbial proteases. *Adv Enzy Res.* 1 (3), 3951.
- Marathe, S.K., Vashistht, M.A., Prashanth, A., Parveen, N., Chakraborty, S., Nair, S.S., 2017. Isolation, partial purification, biochemical characterization and detergent compatibility of alkaline protease produced by *Bacillus subtilis*, *Alcaligenes faecalis* and *Pseudomonas aeruginosa* obtained from sea water samples. *J Gen Eng Biotech.* 1-8.

- Mothe, T., Sultanpuram, V.R., 2016. Production, purification and characterization of a thermotolerant alkaline serine protease from a novel species *Bacillus caseinilyticus*. 3 *Biotech*. 6 (1), 53.
- Oliveira, S.D., Santos, L.R., Schuch, D.M.T., Silva, A.B., Salle, C.T.P., Canal, C.W., 2002. Detection and identification of salmonellas from poultry-related samples by PCR. *Vet Microbiol*. 87, 25-35.
- Pant, G., Prakash, A., Pavani, J.V.P., Bera, S., Deviram, G.V.N.S., Kumar, A., Panchpuri, M., Prasun, R.G., 2015. Production, optimization and partial purification of protease from *Bacillus subtilis*. *J Tai Uni Sci*. 9 (1), 50-55.
- Qureshi, A.S., Simair, A.A., Ali, C.H., Khushk, I., Khokhar, J.A., Ahmad, A., Danish, M., Lu, C., 2018. Production, Purification and Partial Characterization of Organo-Solvent Tolerant Protease from Newly Isolated *Bacillus* sp. BBXS-2. *Ferment Technol*. 7 (1), 1-9.
- Rao, M.B., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S., Deshpande, V.V., 1998. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. *Microbiol Mol Biol Rev*. 62 (3), 597–635.
- Saggu, S.K., Mishra, P.C., 2017. Characterization of thermostable alkaline proteases from *Bacillus infantis* SKS1 isolated from garden soil. *PLoS ONE*. 12 (11), e0188724.
- Secades, P., Guijarro, J.A., 1999. Purification and Characterization of an Extracellular Protease from the Fish Pathogen *Yersinia ruckeri* and Effect of Culture Conditions on Production. *Appl Environ Microbiol*. 65 (9), 3969–3975.
- Schallmeyer, M., Singh, A., Ward, O.P., 2004. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Can J Microbiol*. 50, 1–17.
- Shafee, N., Aris, S.N., Rahman, R.N.Z.A., Basri, M., Salleh, A.B., 2005. Optimization of Environmental and Nutritional Conditions for the Production of Alkaline Protease by a Newly Isolated Bacterium *Bacillus cereus* Strain 146. *J Appl Sci Res*. 1 (1), 1-8.
- Sharma, K.M., Kumar, R., Panwar, S., Kumar, A., 2017. Microbial alkaline proteases: Optimization of production parameters and their properties. *J Gen Eng Biotech*. 15 (1), 115-126.

- Sousa, F., Jus, S., Erbel, A., Kokol, V., Cavaco-Paulo, A., Gubitz, G.M., 2007. A novel metallo protease from *Bacillus cereus* for protein fibre processing. *Enzy Microbial Tech.* 40, 1772–1781.
- Souza, P.M. de, Bittencourt, M.L. de A., Caprara, C.C., Freitas, M. de, Almeida, R.P.C. de, Silveira, D., Fonseca, Y.M., Filho, E.X.F., Junior, A.P., Magalhães, P.O., 2015. A biotechnology perspective of fungal proteases. *Braz J Microbiol.* 46 (2), 337-346.
- Sumantha, A., Larroche, C., Pandey, A., 2006. Microbiology and Industrial Biotechnology of Food-Grade Proteases: A Perspective. *Food Tech Biotech.* 44 (2), 211-220.
- Sumpavapol, P., Tongyonk, L., Tanasupawat, S., Chokesajjawatee, N., Luxananil, P., Visessanguan, W., 2010. *Bacillus siamensis* sp. nov., isolated from salted crab (poo-khem) in Thailand. *Intern J Syst Evol Microbiol.* 60, 2364–2370.
- Sundararajan, S., Kannan, C.N., Chittibabu, S., 2011. Alkaline protease from *Bacillus cereus* VITSN04: Potential application as a dehairing agent. *J Biosci Bioeng.* 111 (2), 128–133.
- Thakur, S., Sharma, N.K., Thakur, N., Bhalla, T.C., 2016. Organic solvent tolerant metalloprotease of novel isolate *Serratia marcescens* PPB-26: production and characterization. *3 Biotech.* 6, 180.
- Uttatree, S., Charoenpanich, J., 2016. Isolation and characterization of a broad pH-and temperature-active, solvent and surfactant stable protease from a new strain of *Bacillus subtilis*. *Biocat Agri Biotech.* 8, 32-38.
- Vijayaraghava, P., Vincent, S.G.P., 2013. A simple method for the detection of protease activity on agar plates using Bromocresolgreen Dye. *J Biochem Tech.* 4 (3), 628-630.
- Williams, L.D., Burdock, G.A., Jiménez, G., Castillo, M., 2009. Literature review on the safety of Toyocerin®, a non-toxicogenic and non-pathogenic *Bacillus cereus* var *toyoi* preparation. *Regul Toxicol Pharm.* 55, 236–246.
- Xu, Y., Dai, M., Zang, J., Jiang, Q., Xia, W., 2015. Purification and Characterization of an Extracellular Acidic Protease of *Pediococcus pentosaceus* Isolated from Fermented Fish. *Food Sci Technol Res.* 21 (5), 739-744.

### Figure captions

**Figure 1.** Proteolytic activity of the 15 isolates with  $EI \geq 1.5$ . The proteolytic assay, using azocasein as substrate, was performed after 24 and 48 hours of incubation. Enzyme activity was expressed in U/mL. The results shown are the means of triplicate analyses and errors bars indicate  $\pm$  SDs of the means. Asterisks indicate significant differences ( $p < 0.05$ ) when compared the proteolytic activity of the same isolate after 24 and 48 hours of growth.

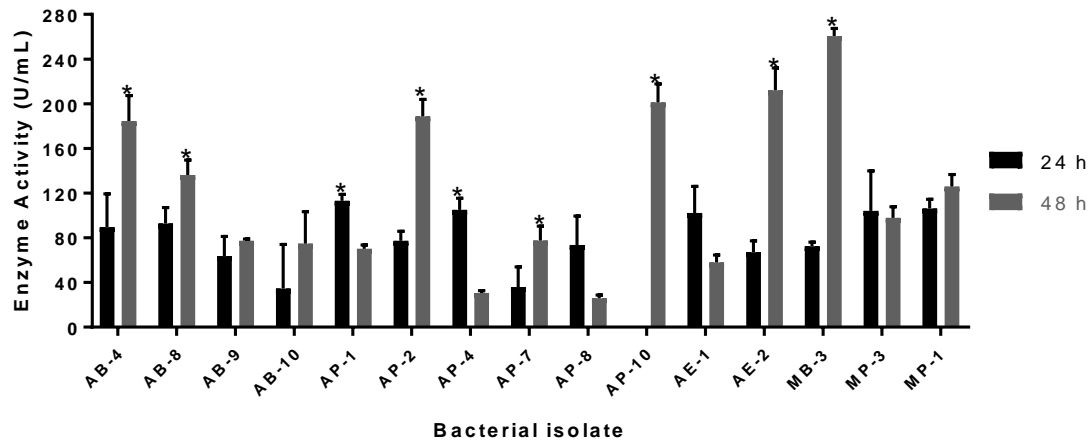
**Figure 2.** Molecular phylogenetic tree of the five bacterial isolates with higher proteolytic activity. The tree deduced from the 16S rRNA sequences was reconstructed with MEGA 7.0 by Maximum Likelihood method based on the Kimura-2-parameter model. The branch lengths measure in the number of substitutions per site and the bootstrap consensus tree inferred from 1000 replicates. *Brevibacillus brevis* YNP-1 was used as outgroup. The scale below shows substitution per site.

**Figure 3.** pH effect on the proteolytic activity of soil bacteria. Enzymatic activity of the crude protease preparations obtained from (A) *B. siamensis* AP-10, (B) *B. licheniformis* AE-2, (C) *B. thuringiensis* MB-3, (D) *Bacillus toyonensis* AB-4, and (E) *B. licheniformis* AP-2 were evaluated in a pH reactions range of 2 to 12, at 30 °C. The highest enzymatic activity was considered 100 %, and for the other the relative activity (%) was calculated. The results shown are the means of two biological replicates and errors bars indicate  $\pm$  SDs of the means. Asterisks indicate significant differences ( $p < 0.05$ ); higher number of asterisks represent a greater statistical difference.

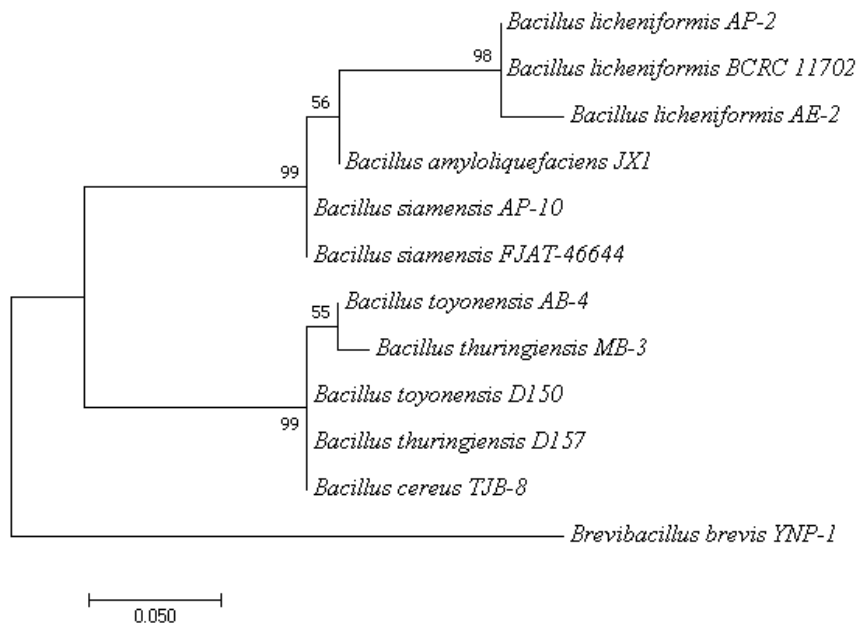
**Figure 4.** Effect of temperature on the proteolytic activity of soil bacteria. Enzymatic activity of the crude protease preparations obtained from (A) *B. siamensis* AP-10, (B) *B. licheniformis* AE-2, (C) *B. thuringiensis* MB-3, (D) *Bacillus toyonensis* AB-4, and (E) *B. licheniformis* AP-2 were evaluated at temperatures between 10 and 80 °C, using Tris-HCl buffer (0.1 M, pH 8). The highest enzymatic activity was considered 100 %, and for the other reactions the relative activity (%) was calculated. The results shown are the means of two biological replicates and errors bars indicate  $\pm$  SDs of the means. Asterisks indicate significant differences ( $p < 0.05$ ); higher number of asterisks represent a greater statistical difference.

**Figure 5.** Effect of metal ions (5 mM) on the proteolytic activity of soil bacteria. Enzymatic activity of the crude protease preparations obtained from (A) *B. siamensis* AP-10, (B) *B. licheniformis* AE-2, (C) *B. thuringiensis* MB-3, (D) *Bacillus toyonensis* AB-4, and (E) *B. licheniformis* AP-2 were evaluated in the presence of ions Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup>, and Fe<sup>2+</sup> at room temperature, under optimal conditions (pH and temperature). The highest enzymatic activity was considered 100 %, and for the other reactions the relative activity (%) was calculated. The results shown are the means of two biological replicates and errors bars indicate  $\pm$  SDs of the means. Asterisks indicate significant differences ( $p < 0.05$ ); higher number of asterisks represent a greater statistical difference.





**Figure 1.**



**Figure 2.**

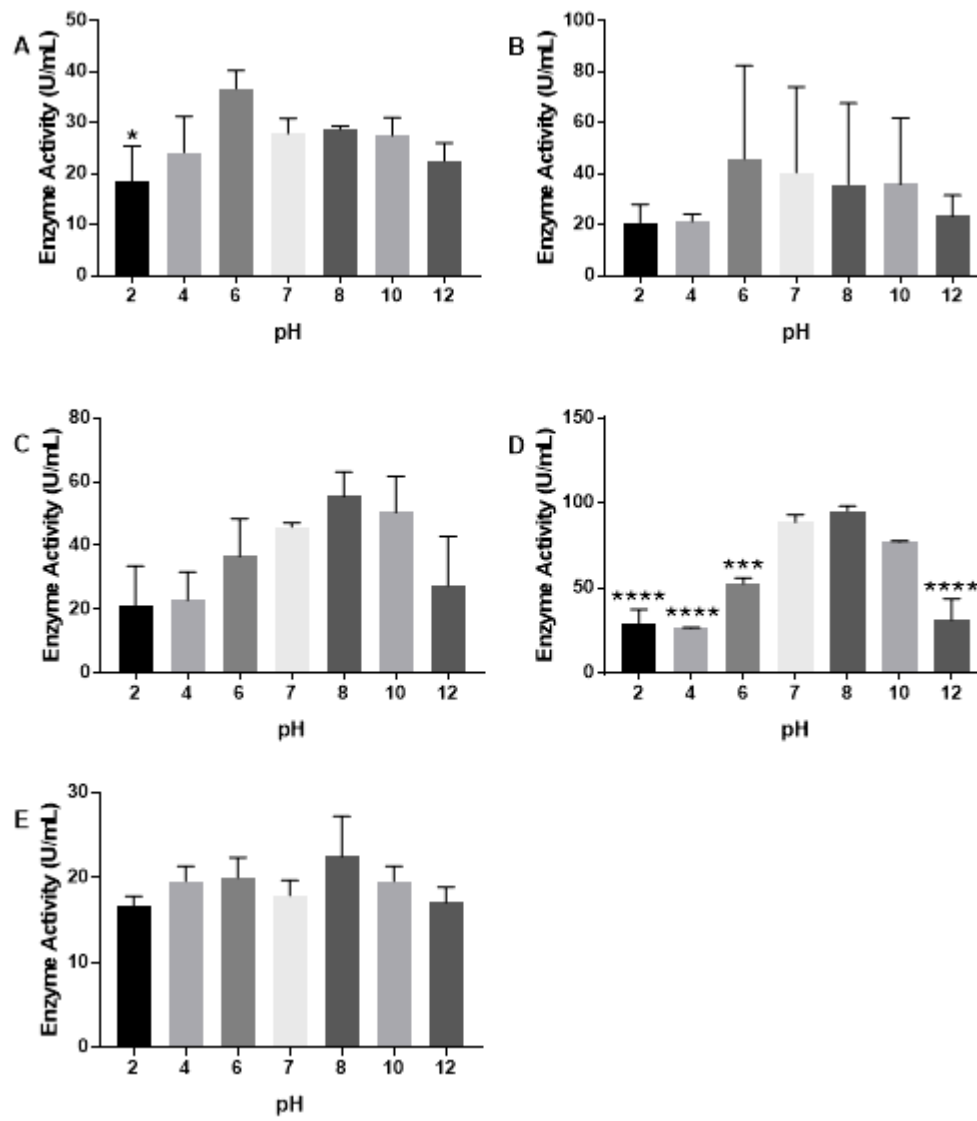


Figure 3.

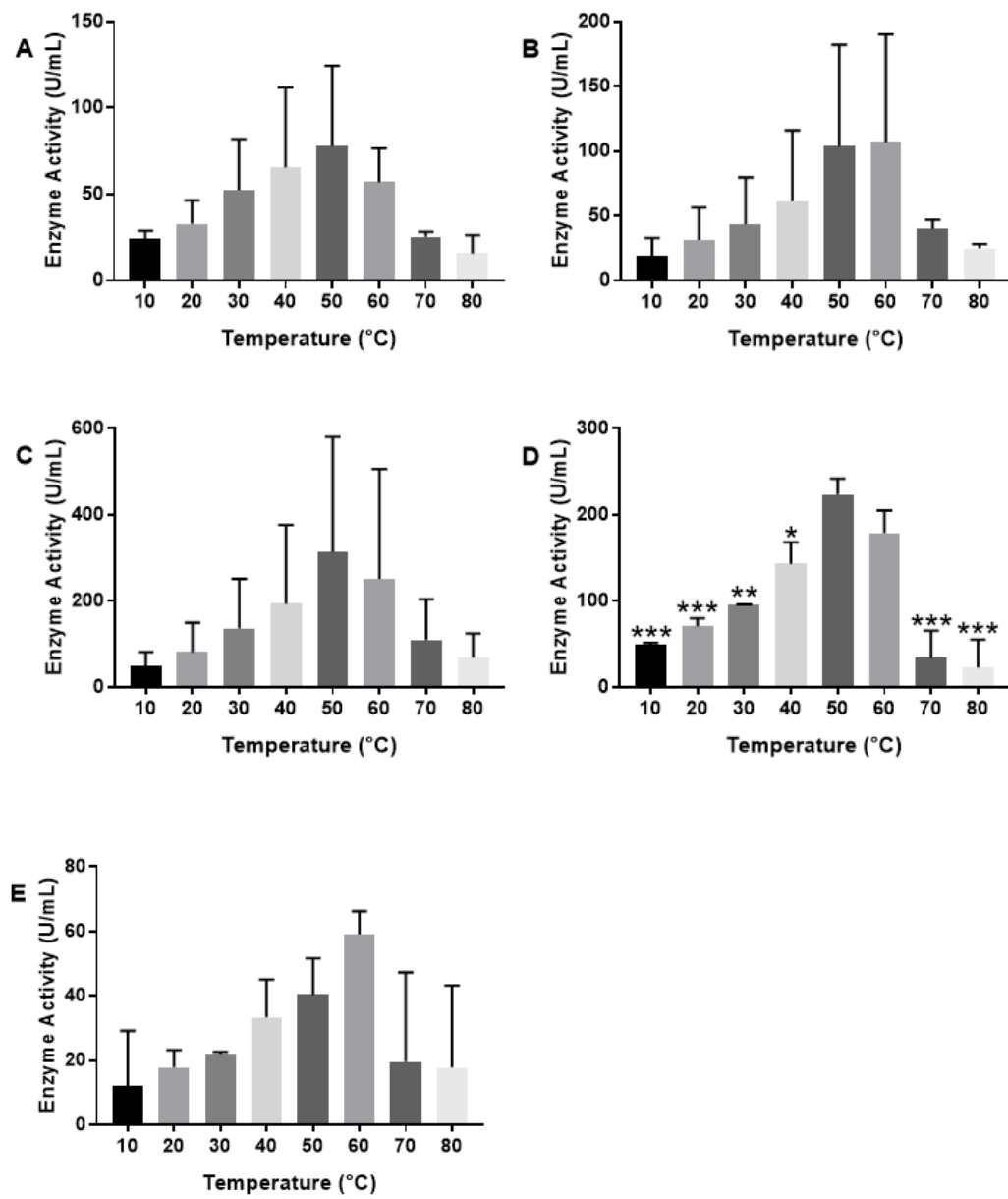


Figure 4.

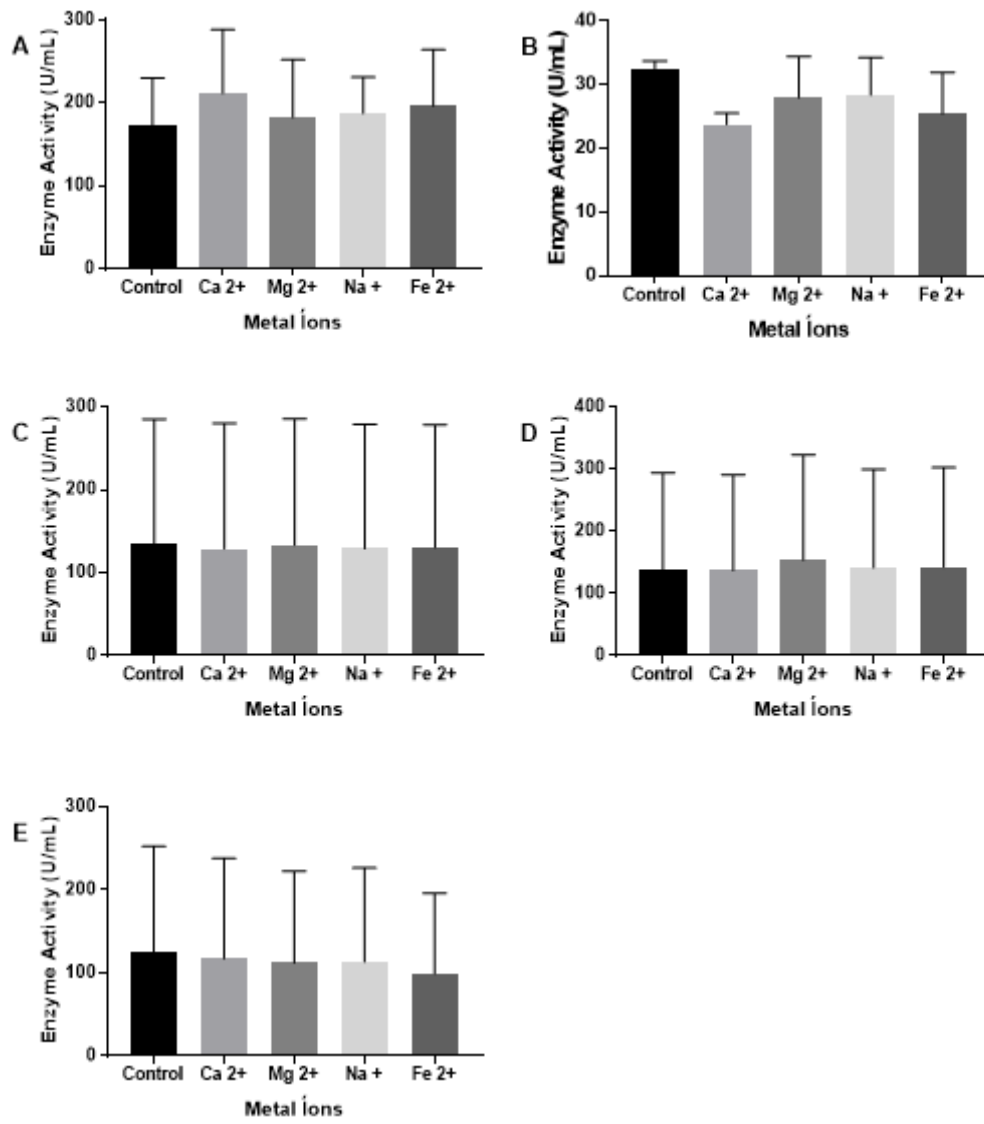


Figure 5.

**Table 1.** Characterization of the 32 protease-producing bacteria in relation to Gram staining, morphology, atmosphere and enzymatic index (EI).

Soil sample	Bacterial isolates	Gram staining	Morphology	Atmosphere for isolation	Enzymatic Index (EI)
1	AB-1	Positive	Rod	Aerobiosis	1.286
	AB-3	Positive	Pleomorphic	Aerobiosis	1.167
	AB-4	Positive	Rod	Aerobiosis	3.250
	AB-5	Positive	Rod	Aerobiosis	1.333
	AB-8	Positive	Rod	Aerobiosis	1.750
	AB-9	Positive	Rod	Aerobiosis	1.600
	AB-10	Positive	Rod	Aerobiosis	1.900
	AB-1.1	Positive	Rod	Aerobiosis	1.333
	MB-1	Positive	Rod	Microaerophilic	1.400
	MB-2	Positive	Rod	Microaerophilic	1.429
	MB-3	Positive	Rod	Microaerophilic	3.500
2	AP-1	Positive	Rod	Aerobiosis	2.500
	AP-2	Positive	Rod	Aerobiosis	2.000
	AP-3	Positive	Rod	Aerobiosis	1.429
	AP-4	Positive	Rod	Aerobiosis	1.600
	AP-5	Positive	Rod	Aerobiosis	1.100
	AP-7	Positive	Rod	Aerobiosis	1.500
	AP-8	Negative	Rod	Aerobiosis	2.500
	AP-9	Positive	Rod	Aerobiosis	1.200
	AP-10	Positive	Rod	Aerobiosis	2.750
	MP-1	Positive	Rod	Microaerophilic	1.400
	MP-2	Positive	Rod	Microaerophilic	1.300
	MP-3	Positive	Rod	Microaerophilic	1.500
	MP-4	Positive	Rod	Microaerophilic	1.133
	MP-5	Positive	Rod	Microaerophilic	1.176

	MP-1.1	Positive	Rod	Microaerophilic	1.500
3	AE-1	Positive	Rod	Aerobiosis	1.667
	AE-2	Positive	Rod	Aerobiosis	1.889
	AE-3	Positive	Rod	Aerobiosis	1.333
	AE-4	Positive	Rod	Aerobiosis	1.333
	AE-6	Positive	Rod	Aerobiosis	1.154
	AE-7	Positive	Rod	Aerobiosis	1.190

**Table 2.** Protease production during bacterial growth.

Bacterial isolates	Absorbance (600 nm)				Diameter of the clear zones around the agar wells (mm)			
	24 h	48 h	72 h	96 h	24 h	48 h	72 h	96 h
AB-4	2.136	5.480	5.440	4.590	23	24	24	24
AB-8	2.180	5.110	5.210	4.690	20	18	21	21
AB-9	2.196	5.180	5.780	5.140	22	20	22	23
AB-10	2.024	5.800	10.060	5.160	23	21	22	22
AP-1	2.212	5.440	5.710	5.280	9	10	6	7
AP-2	2.060	5.110	5.910	4.980	21	13	16	20
AP-4	1.080	4.590	4.550	3.040	24	23	21	25
AP-7	0.585	4.460	4.660	3.620	23	20	21	10
AP-8	0.476	3.810	5.030	6.080	23	26	27	24
AP-10	1.074	4.340	5.400	5.090	25	24	24	25
AE-1	1.172	4.830	4.790	3.040	25	22	24	25
AE-2	1.170	5.320	5.740	4.780	25	25	22	24
MB-3	2.144	4.590	5.470	4.950	25	25	26	26
MP-3	1.102	4.760	5.250	4.820	23	25	28	25

MP-1	2.510	2.620	2.680	2.180	25	25	25	25
------	-------	-------	-------	-------	----	----	----	----

Legend: The proteolytic samples with  $EI \geq 1.5$  were grown in skim milk broth, up to 96 h. The optical density of the cultures was measured every 24 h in spectrophotometer and the culture supernatant were tested for proteolytic activity in agar.

**Table 3.** Genetic identification of the five bacterial isolates with higher proteolytic activity.

<b>Sample</b>	<b>Alignment</b>	<b>Identity (%)</b>	<b>Access Number</b>
AB-4	<i>Bacillus toyonensis</i> BCT7112	99	NR_121761.1
AP-2	<i>Bacillus licheniformis</i> DSM 13	99	NR_118996.1
AP-10	<i>Bacillus siamensis</i> PD A10	99	NR_117274.1
AE-2	<i>Bacillus licheniformis</i> DSM 13	97	NR_118996.1
MB-3	<i>Bacillus thuringiensis</i> NBRC 101235	99	NR_112780.1

Legend: The analysis was performed by aligning the 16S (rRNA) partial sequence with the sequences available in GenBank, using Blast tool.

**APÊNDICE B (comprovante de submissão do artigo)****COPYRIGHT TRANSFER/SUPPLEMENTAL MATERIAL LICENSE AGREEMENT**

Dr. Aline Dias Paiva  
Universidade Federal do Triângulo Mineiro  
Departamento de Microbiologia, Imunologia e parasitologia

June 11, 2018

Campus I - Praça Manoel Terra, 330  
Uberaba, Minas Gerais 38025-015  
Brazil

JB00353-18

Authors: Aline Paiva, Bianca Alves, and Alessandra Ferreira-Machado (collectively the "Author")

Title: Protease screening of soil bacteria isolated from preserved environments in the Cerrado biome, Brazil (the "Work")

In consideration of publication of the Work in Journal of Bacteriology ("JB"), the American Society for Microbiology ("ASM") requires that the Author transfer the copyright in the Work (including the text, figures, tables, artwork, abstracts, cover art, and errata) to ASM and license to ASM certain non-exclusive rights in the Supplemental Material. This permits ASM to publish the Work and facilitates broader exposure for the Work, given ASM's publishing expertise.

## **I. Copyright Transfer and Representations**

### **1. Publisher's Agreement to Publish**

ASM agrees to publish the above-referenced Work in consideration for this transfer to ASM of all copyright rights in and to the Work, subject to the provisions of this agreement. It is understood that the Author will receive no royalty or other monetary compensation. In the event that ASM decides not to publish the Work, this agreement shall be terminated and all rights revert to the Author.

### **2. Author's Agreement and Representations**

The Author hereby assigns to ASM all right, title and interest under the Copyright Laws of the United States and all foreign countries in and to the above-referenced Work, for the duration of all terms of copyright and any renewals or extensions thereof. This assignment includes all derivative, republication, translation, electronic publishing and subsidiary rights of any nature, whether now known or hereafter developed. The



Author reserves all proprietary rights other than copyright, such as patent or trademark rights, if any. If the Work was created within the scope of Author's employment and an Author's employer owns the copyright, this copyright transfer agreement must be signed by the Author and an authorized representative of the employer.

The Author submitting this form represents and warrants the following: a) the Work is original and the Work (including data) has not been previously published in print or online, e.g., in a journal, book, conference report, symposium proceedings, or company white paper; b) the Work will not contain matter that is libelous or injurious or in violation of any right of privacy or any copyright, patent, or other proprietary rights of any third party; c) to the extent any third party materials not in the public domain have been used, the Author has secured written permission from the copyright owner(s) to use those materials; d) the Work is not currently under consideration for publication elsewhere; e) the Author signing below has the full power and authority to enter this agreement on Author's own behalf and on behalf of any and all coauthors, and that he or she is a joint author of the Work or has been authorized by the copyright owner to enter into this agreement; and f) that all persons listed as Authors are aware of the submission to ASM and have approved the submission of the Work, including all research presented therein, for publication by ASM.

If accepted for publication by JB, Author agrees not to submit the Work elsewhere.

The Author agrees to indemnify, defend and hold harmless ASM, its officers, members, affiliates, successors and assigns, for any and all costs which arise out of any claim against ASM regarding any third party rights that ASM is alleged to violate if such alleged violation resulted from ASM's use of the Work or a breach by the Author of any representation or warranty contained in this agreement.

### **3. Rights Retained by the Author**

ASM grants the Author and the employer for whom the Work was created (if applicable) a royaltyfree, non-exclusive limited license to: a) post the Work (after publication by ASM) on the Author's personal or university-hosted website, provided that proper credit is given to the original ASM publication, but not on any corporate, government, or similar website without ASM's prior written permission; and b) republish discrete portions of this Work in any other publication (including print, CD-ROM, and other electronic formats) of which he or she is author or editor, provided that proper credit is given to the original ASM publication. Otherwise, neither the entire Work, nor significant portions thereof, may be republished in print, electronic or other form without ASM's prior written permission. For purposes of website posting, "proper credit" means either the copyright lines shown on the top of the first page of the PDF version, or "Copyright © American Society for Microbiology, [insert journal name, volume number, page number, and year]" for the HTML version.

### **4. Special Notice for U.S. Government Employees and Contractors**

ASM understands that works authored solely by U.S. Government employees within the scope of their employment are not subject to U.S. copyright, and the transfer

provision of this agreement only applies to any foreign copyright protection that may attach to the Work. If the Work was written pursuant to a U.S. Government contract under which the U.S. Government has publication rights, then the above transfer is made subject to those contract rights. All other provisions of this agreement apply to U.S. Government employees and contractors.

#### 5. Special Notice for Grantee Authors

ASM allows National Institutes of Health (NIH) grantee and intramural Authors to provide a copy of the accepted **manuscript** to PubMed Central (PMC) for posting in the PMC Public Access Repository.

ASM also allows Authors whose work was supported by similar funding agencies that have public access requirements like that of NIH (e.g., the Wellcome Trust) to post their accepted **manuscripts** in publicly accessible electronic repositories maintained by those funding agencies. If a funding agency does not itself maintain such a site, then the Author may fulfill that requirement by depositing the **manuscript** in an appropriate institutional or subject-based open repository established by a government or noncommercial entity.

Since ASM makes the final, typeset articles from its primary-research journals available free of charge on the ASM Journals and PMC websites 6 months after final publication, ASM recommends that when submitting the accepted **manuscript** to PMC or a similar public access site, the Author specify that the **posting release date for the manuscript be no earlier than 6 months after the final publication of the typeset article by ASM.**

#### Select one of the following:

- I am an author of this Work, and I hereby transfer copyright as indicated above. I agree to all terms and conditions set forth in this agreement (also applicable for privately employed **and** U.S. Government authors of works prepared by **both** U.S. Government and non-government employees).
- This Work was authored solely by U.S. Government employees within the scope of their employment and is not subject to U.S. copyright. I agree that the copyright transfer provision of this agreement only applies to any foreign copyright protection that may attach to the Work.
- This Work was authored by NIH employees. A copy of the NIH Publishing Agreement and Manuscript Cover Sheet, modifying and superseding this document, will be supplied. All nonconflicting provisions in this document apply. *[Author: You will receive a PDF of this form by email after you press "I Agree." Put the same identifying information (control number, title, etc.) on the NIH Form and e-mail the scanned form to bzwadyk@asmusa.org, upload it with your manuscript as a related file, or fax it to 202-942-9355.]*
- The Work is subject to Crown Copyright. Author created the Work during the course of Author's employment with the Australian, Canadian, or UK Government. Copyright in the Work is owned by the Crown rather than the Author. The copyright transfer provision of this agreement does not apply, but in its place the Crown grants ASM a license to publish, distribute, reprint, and sublicense the Work in all forms and media.

This is a Work made for hire, and my employer owns the copyright. A copy of this form, signed by an authorized representative of my company, is supplied separately. I agree to all terms and conditions in this agreement other than copyright transfer.

Employer Name:

Signature (on behalf of employer):

Date:

*If you are not submitting supplemental material for publication, scroll to the bottom, check the signature box, and press "I Agree." If you are submitting supplemental material for publication, read the following agreement, check the applicable box and the signature box, and press "I Agree."*

## II. SUPPLEMENTAL MATERIAL LICENSE AGREEMENT

### 6. Author's License and Representations

Author hereby grants ASM a non-exclusive, world-wide license to publish the Supplemental Material submitted in connection with the publication of the Work by ASM, electronically or in any other format or medium, in whole or in part, alone or as part of a collective or derivative work, and to authorize others to do the same.

Author represents and warrants that: 1) Author is the creator of, and sole owner of the copyright in, the Supplemental Material; or 2) Author is the co-creator of, and co-owner of the copyright in, the Supplemental Material and is authorized to enter into this Agreement; or 3) Author is otherwise authorized to use the Supplemental Material and to grant the rights conveyed in this Agreement. Author will provide to ASM signed, written permission, signed by the copyright owner(s), for any Supplemental Material whose copyright is not owned by Author. Author further represents and warrants that none of the Supplemental Material has been, or will be, published in print or online prior to ASM's publication of the Article; and that use and publication of the Supplemental Material will not infringe or violate any third party's patent, copyright, trademark, privacy or other rights, nor will it cause physical injury or damage or endanger the safety or security of any reader or other person or entity. Author agrees to indemnify and hold ASM harmless from any damages, claims, liability or costs (including attorney's fees) caused by any violation of these representations and warranties.

## 7. Author's Acknowledgements

The Author understands and acknowledges that: 1) ASM will not edit the Supplemental Materials; and 2) the Supplemental Materials are not subject to modification after publication, although Author may use ASM's Errata and Author's Corrections to correct errors, pursuant to ASM's Instructions to Authors.

In the event that ASM decides not to publish the Supplemental Material, this License Agreement shall be terminated.

**Checking this box serves as the Author's signature on and agreement with the supplemental material license agreement.**

**Checking this box serves as the Author's signature on and agreement with the Copyright Transfer Agreement.**

local\_p\_i  
d: 78816  
time:  
1528761  
391 ip  
address:  
179.155.  
122.153

**APÊNDICE C (lista de participação de co-autores)**

Lista de participação de co-autores do artigo em Apêndice A:

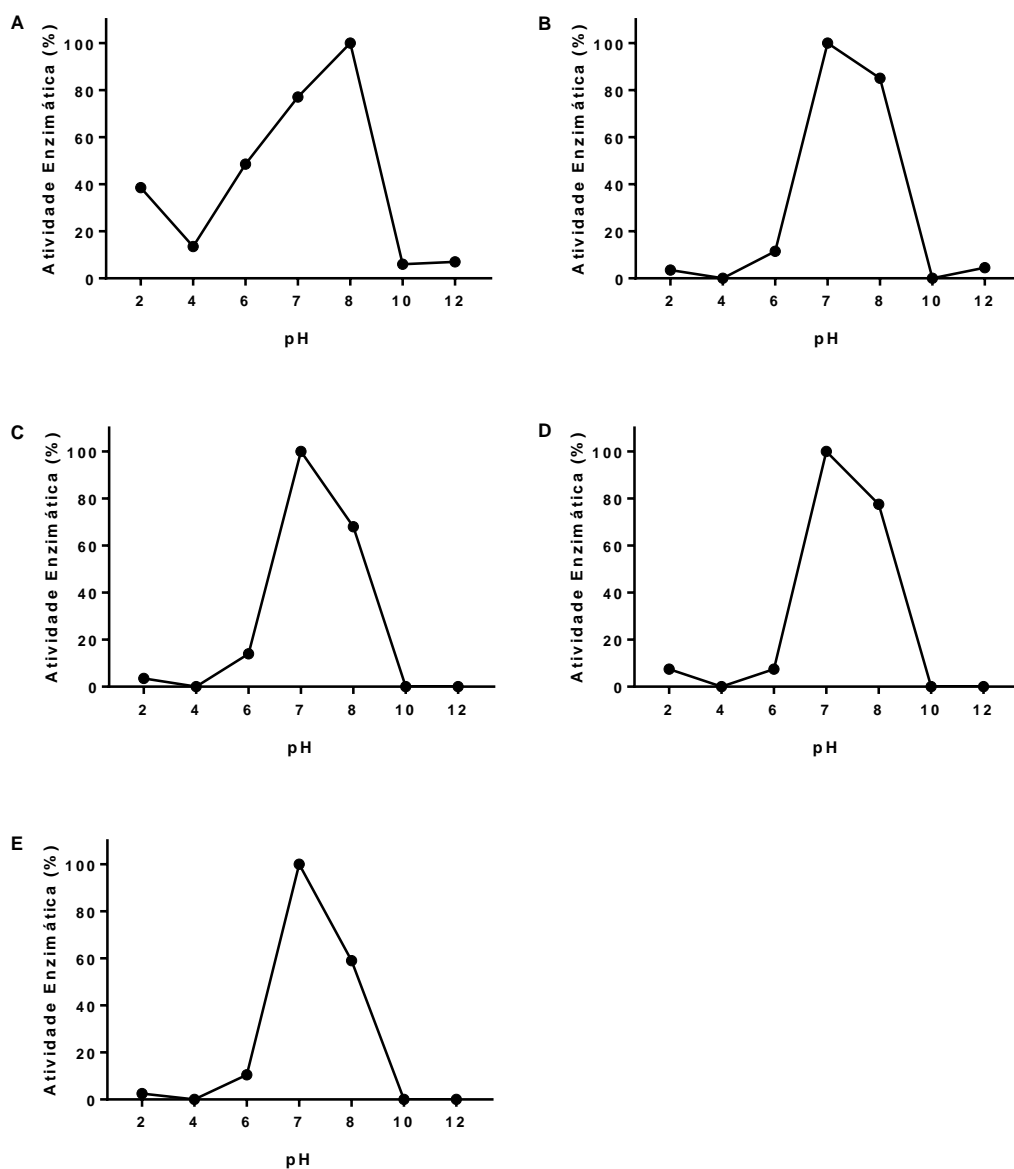
- Alessandra Barbosa Ferreira Machado:

Participação em:

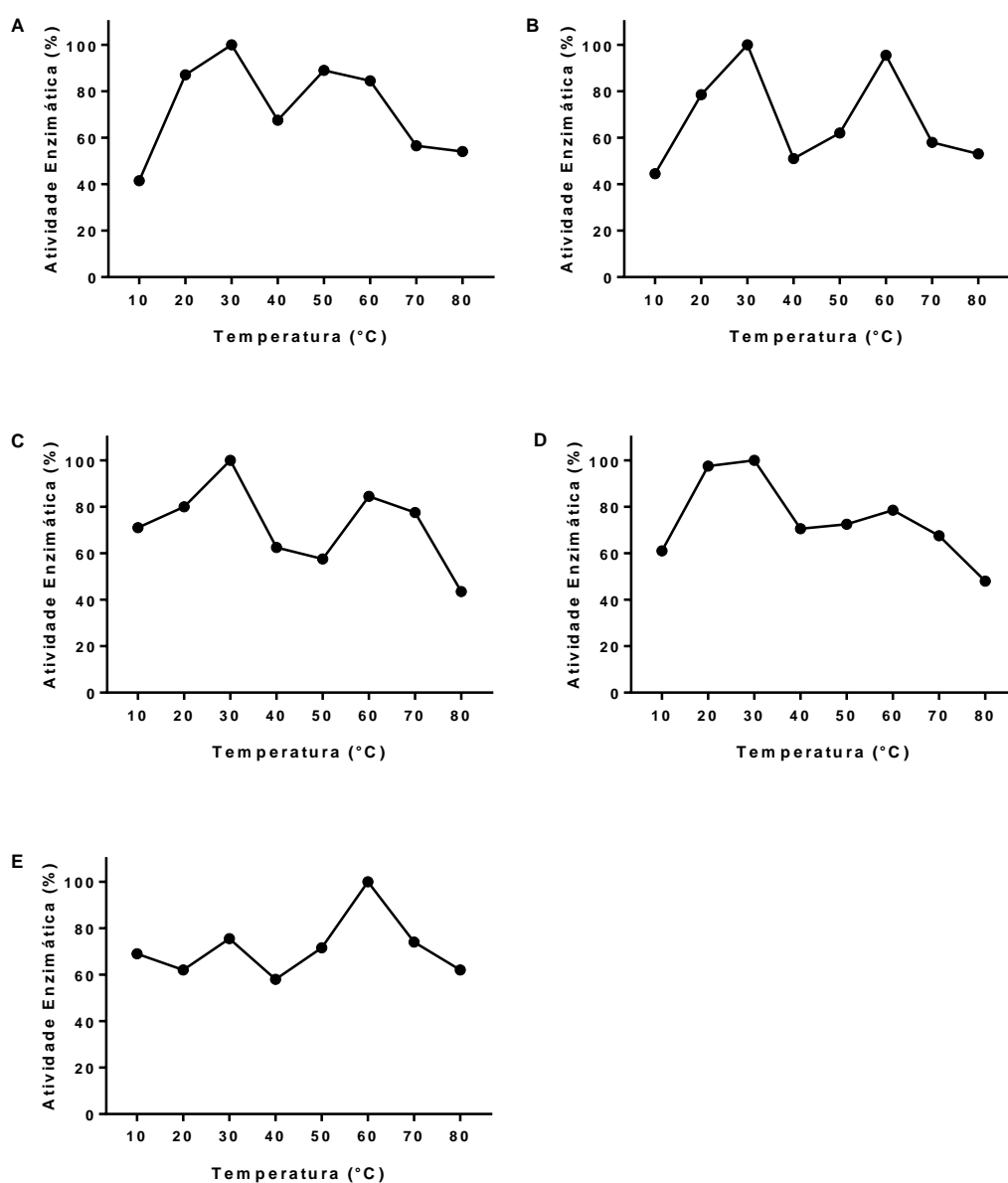
- ✓ Padronização de reações de PCR;
- ✓ Preparo de amostras para sequenciamento;
- ✓ Alinhamento das sequências obtidas;
- ✓ Análise filogenética;
- ✓ Redação do manuscrito.

## ANEXO

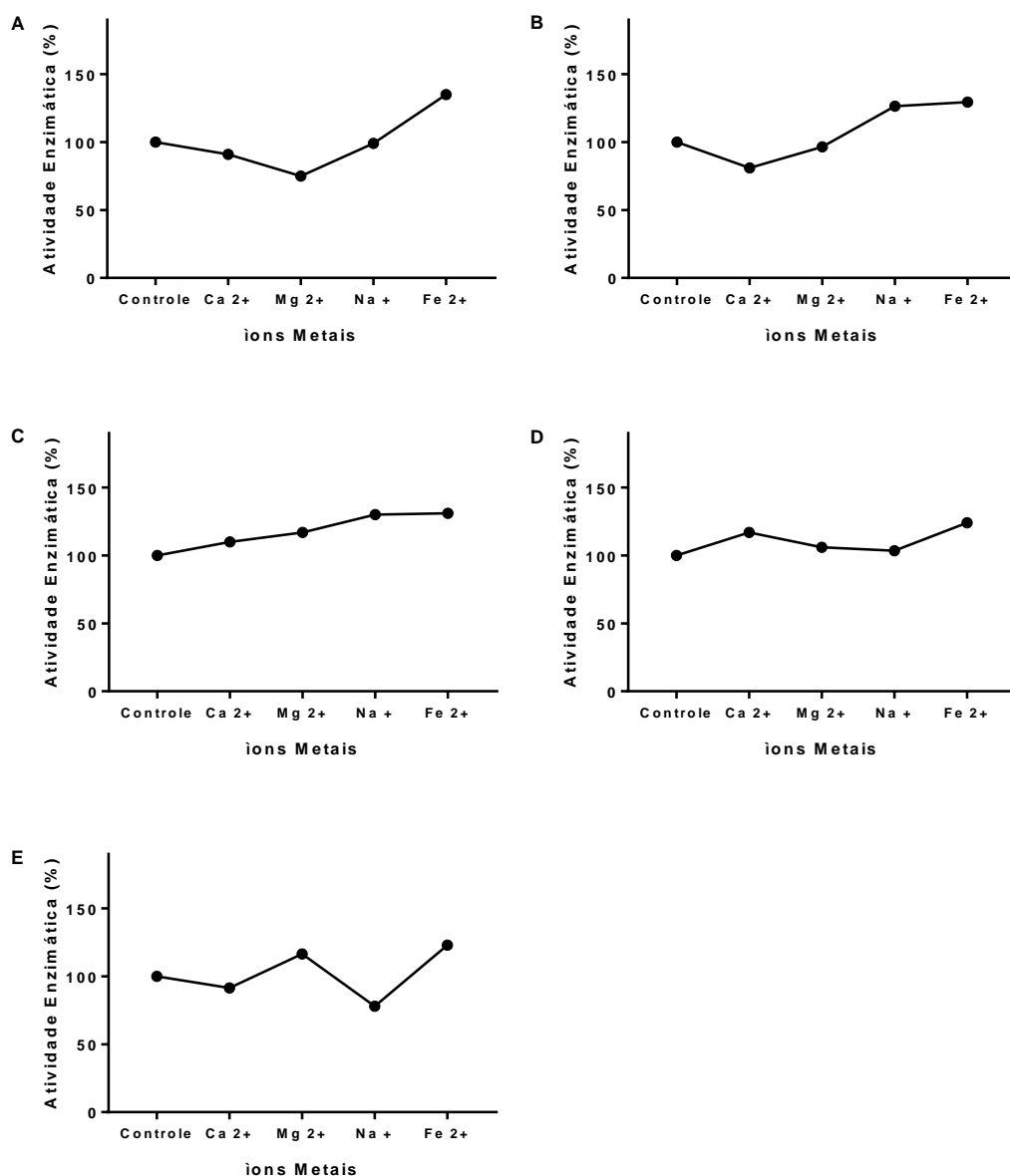
**Figura 1** - Efeito do pH (2-12) sobre a atividade celulolítica de extratos enzimáticos obtidos a partir de bactérias celulolíticas isoladas de solo preservado no bioma cerrado. (A) *B. siamensis*AB-9; (B) *B. toyonensis*AB-1; (C) *B. methylotrophicus*MP-7; (D) *B. methylotrophicus*MB-3; (E) *B. drentensis*ME-2. A maior atividade enzimática, obtida a 55 °C, foi considerada como 100 %, sendo calculada, para os demais pHs, a atividade relativa (%). Os resultados mostram a média de duplicatas biológicas.



**Figura 2-** Efeito da temperatura (10-80 °C) sobre a atividade celulolítica de extratos enzimáticos obtidos a partir de bactérias celulolíticas isoladas de solo preservado no bioma cerrado. (A) *B. siamensis*AB-9; (B) *B. toyonensis*AB-1; (C) *B. methylotrophicus*MP-7; (D) *B. methylotrophicus*MB-3; (E) *B. drentensis*ME-2. A maior atividade enzimática, obtida em tampão fosfato de sódio (0,05 M, pH 7,0), foi considerada como 100 %, sendo calculada, para as demais temperaturas, a atividade relativa (%). Os resultados mostram a média de duplicatas biológicas.

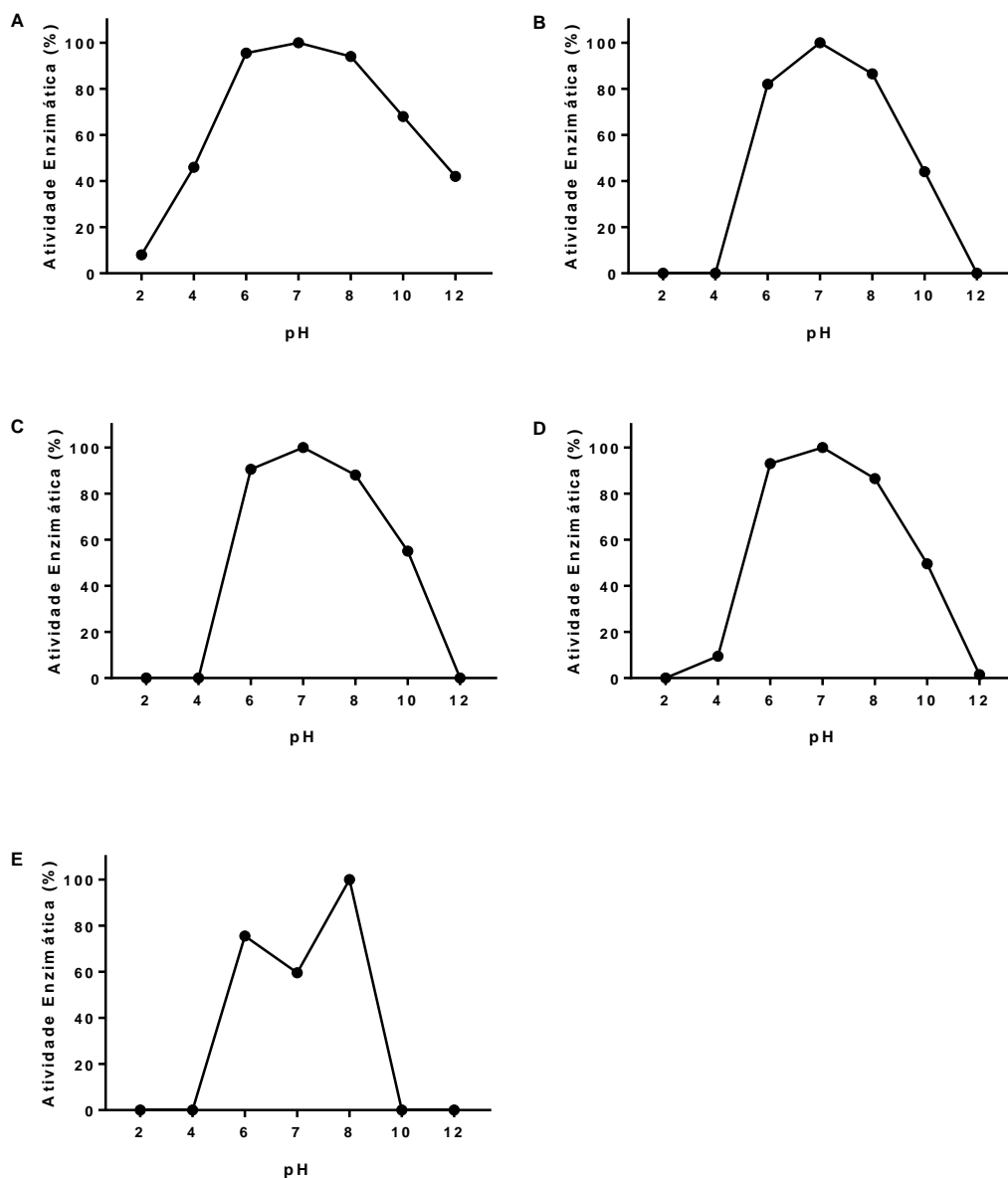


**Figura 3** - Efeito de íons metálicos ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  e  $\text{Fe}^{2+}$ ; 5 mM) sobre a atividade celulolítica de extratos enzimáticos obtidos a partir de bactérias celulolíticas isoladas de solo preservado no bioma cerrado. (A) *B. siamensis*AB-9; (B) *B. toyonensis*AB-1; (C) *B. methylotrophicus*MP-7; (D) *B. methylotrophicus*MB-3; (E) *B. drentensis*ME-2. A maior atividade enzimática, obtida sob condições ótimas de reação (pH e temperatura), foi considerada como 100 %, sendo calculada, para as demais condições, a atividade relativa (%). Os resultados mostram a média de duplicatas biológicas.

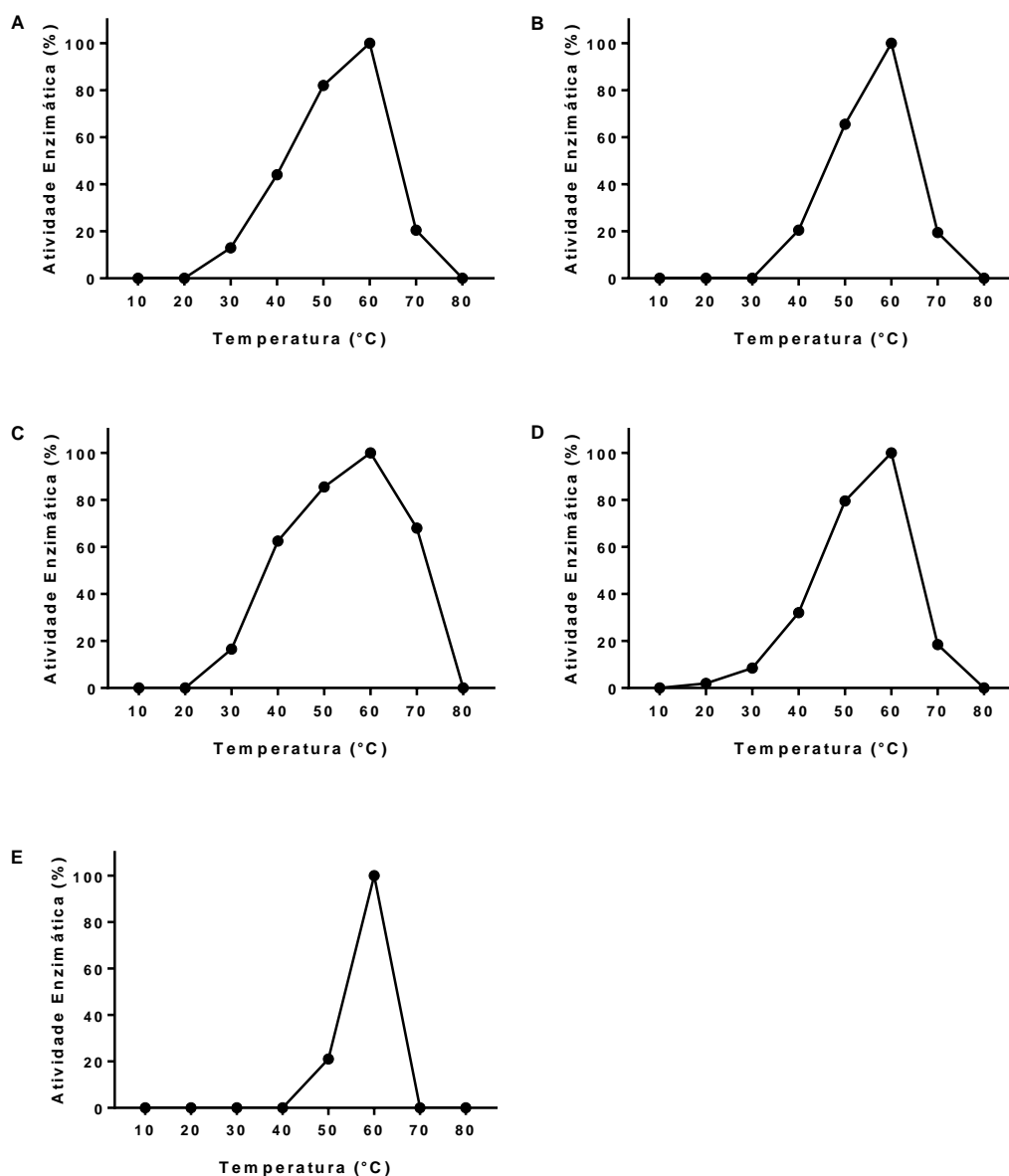




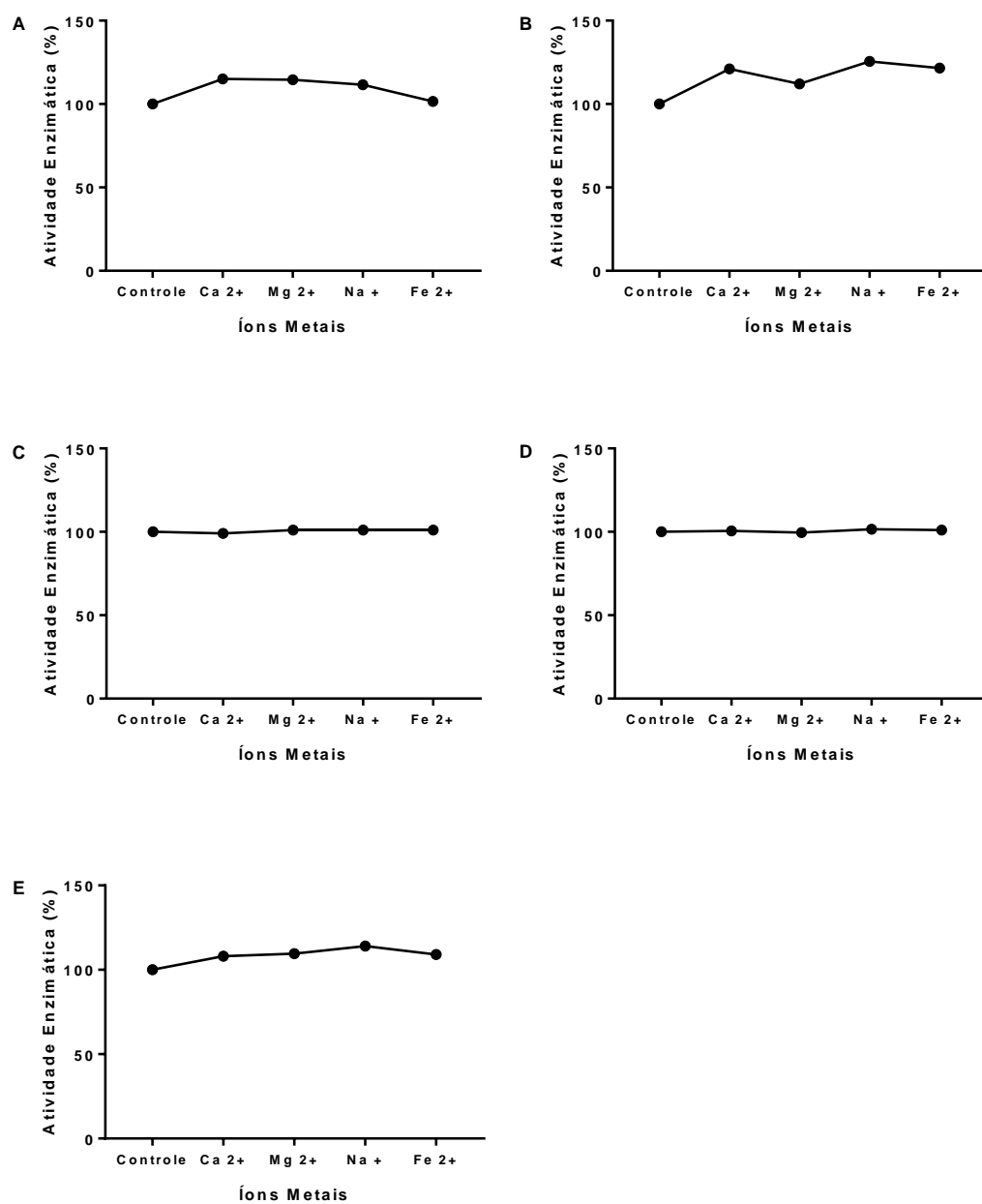
**Figura 4** - Efeito do pH (2-12) sobre a atividade amilolítica de extratos enzimáticos obtidos a partir de bactérias amilolíticas isoladas de solo preservado no bioma cerrado. (A) *B. methylotrophicus* AP-14; (B) *B. subtilis* AE-2; (C) *B. toyonensis* MB-1; (D) *B. toyonensis* MB-18; (E) *B. pseudomycooides* MB-22. A maior atividade enzimática, obtida a 55 °C, foi considerada como 100 %, sendo calculada, para os demais pHs, a atividade relativa (%). Os resultados mostram a média de duplicatas biológicas.



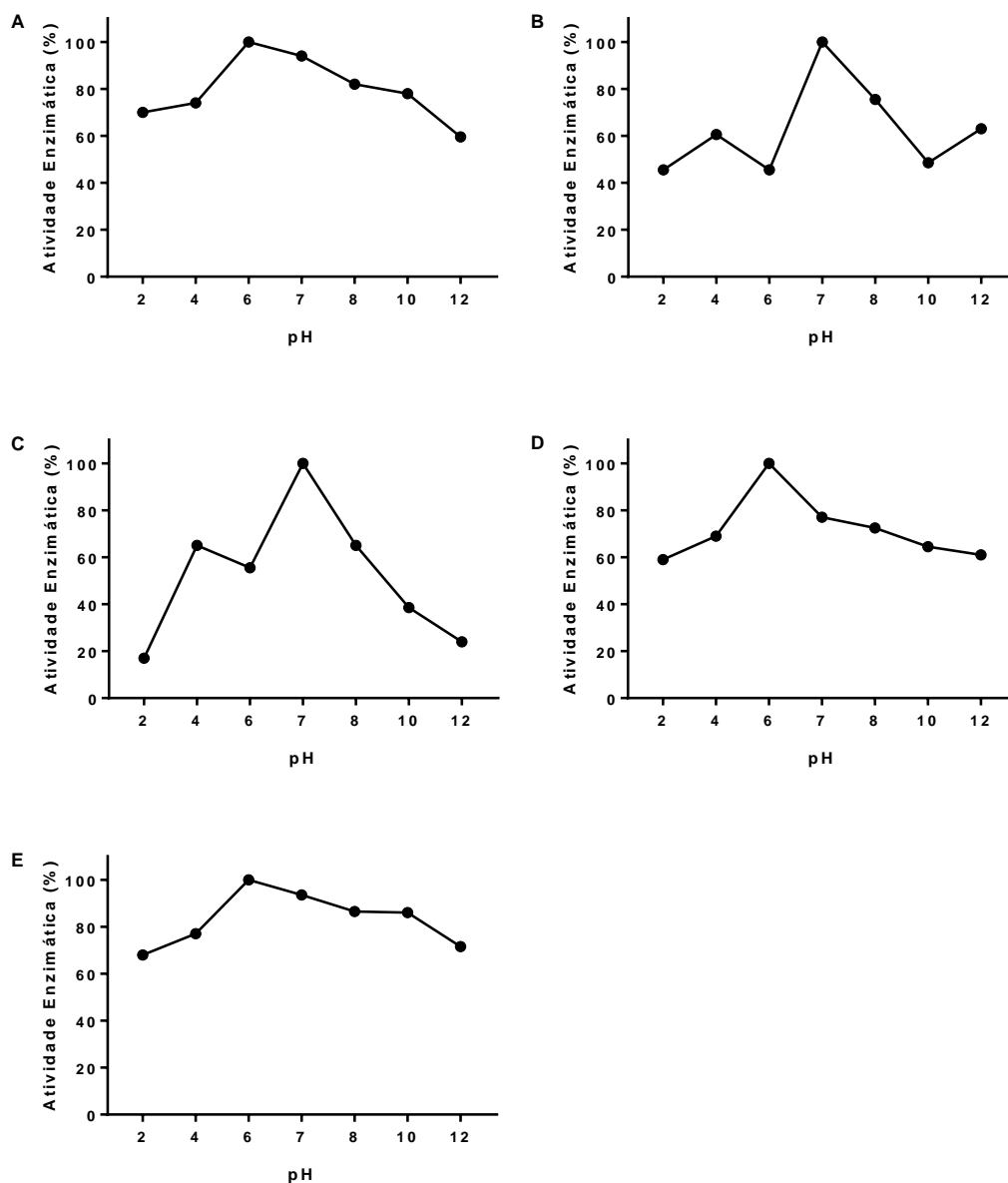
**Figura 5** - Efeito da temperatura (10-80 °C) sobre a atividade amilolítica de extratos enzimáticos obtidos a partir de bactérias amilolíticas isoladas de solo preservado no bioma cerrado. (A) *B. methylotrophicus* AP-14; (B) *B. subtilis* AE-2; (C) *B. toyonensis* MB-1; (D) *B. toyonensis* MB-18; (E) *B. pseudomycooides* MB-22. A maior atividade enzimática, obtida em tampão acetato de sódio (0,5 M, pH 5,5), foi considerada como 100 %, sendo calculada, para as demais temperaturas, a atividade relativa (%). Os resultados mostram a média de duplicatas biológicas.



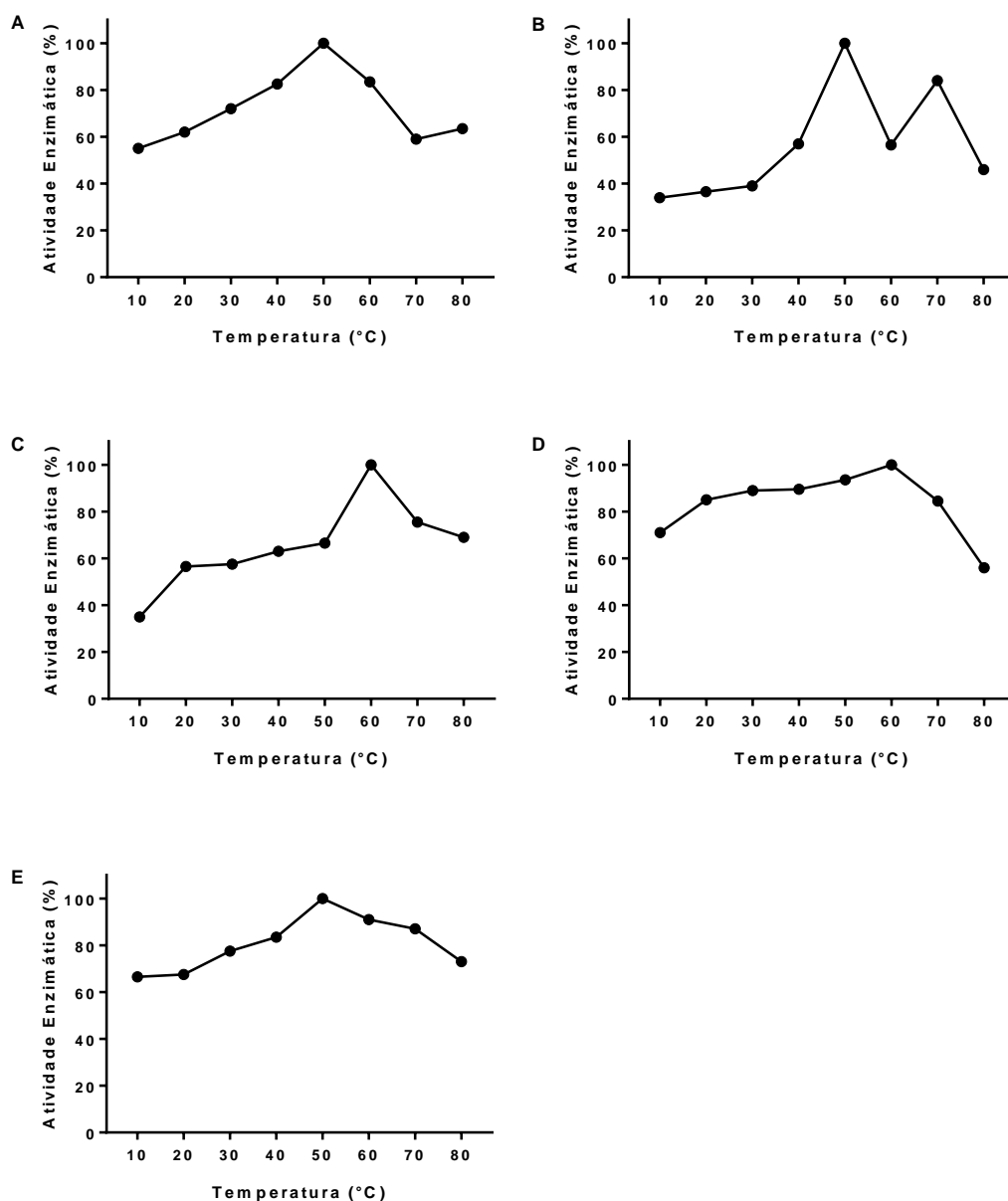
**Figura 6** - Efeito de íons metálicos ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  e  $\text{Fe}^{2+}$ ; 5 mM) sobre a atividade amilolítica de extratos enzimáticos obtidos a partir de bactérias amilolíticas isoladas de solo preservado no bioma cerrado. (A) *B. methylotrophicus* AP-14; (B) *B. subtilis* AE-2; (C) *B. toyonensis* MB-1; (D) *B. toyonensis* MB-18; (E) *B. pseudomycoides* MB-22. A maior atividade enzimática, obtida sob condições ótimas de reação (pH e temperatura), foi considerada como 100 %, sendo calculada, para as demais condições, a atividade relativa (%). Os resultados mostram a média de duplicatas biológicas.



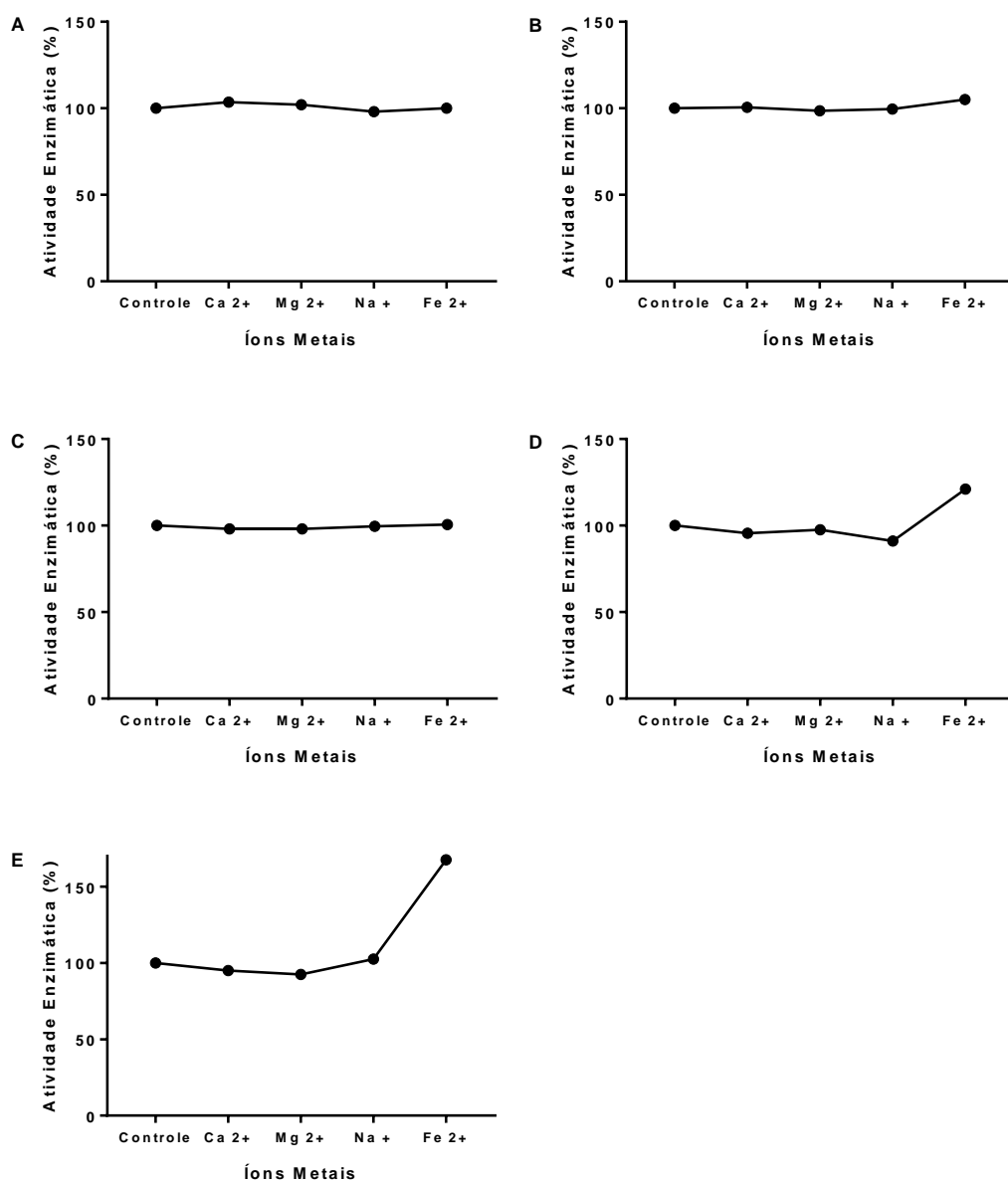
**Figura 7** - Efeito do pH (2-12) sobre a atividade xilanolítica de extratos enzimáticos obtidos a partir de bactérias xilanolíticas isoladas de solo preservado no bioma cerrado. (A) *B. velezensis* AP-6; (B) *B. toyonensis* MP-9; (C) *B. thuringiensis* ME-1; (D) *B. pseudomycoides* ME-16; (E) *B. thuringiensis* ME-20. A maior atividade enzimática, obtida a 55 °C, foi considerada como 100 %, sendo calculada, para os demais pHs, a atividade relativa (%). Os resultados mostram a média de duplicatas biológicas.



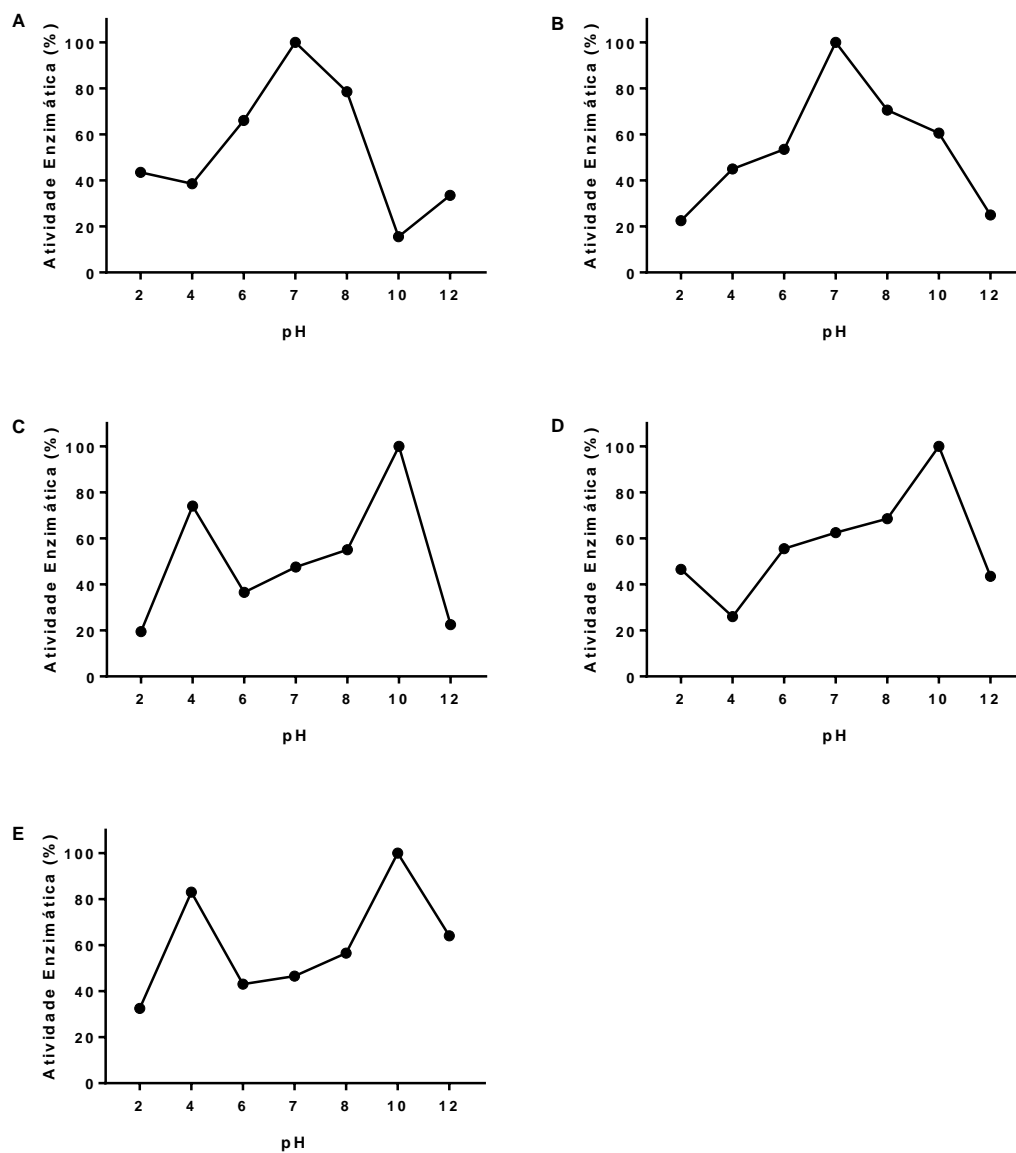
**Figura 8** - Efeito da temperatura (10-80 °C) sobre a atividade xilanolítica de extratos enzimáticos obtidos a partir de bactérias xilanolíticas isoladas de solo preservado no bioma cerrado. (A) *B. velezensis* AP-6; (B) *B. toyonensis* MP-9; (C) *B. thuringiensis* ME-1; (D) *B. pseudomycooides* ME-16; (E) *B. thuringiensis* ME-20. A maior atividade enzimática, obtida em tampão acetato de sódio fosfato de sódio (0,05 M, pH 7,0), foi considerada como 100 %, sendo calculada, para as demais temperaturas, a atividade relativa (%). Os resultados mostram a média de duplicatas biológicas.



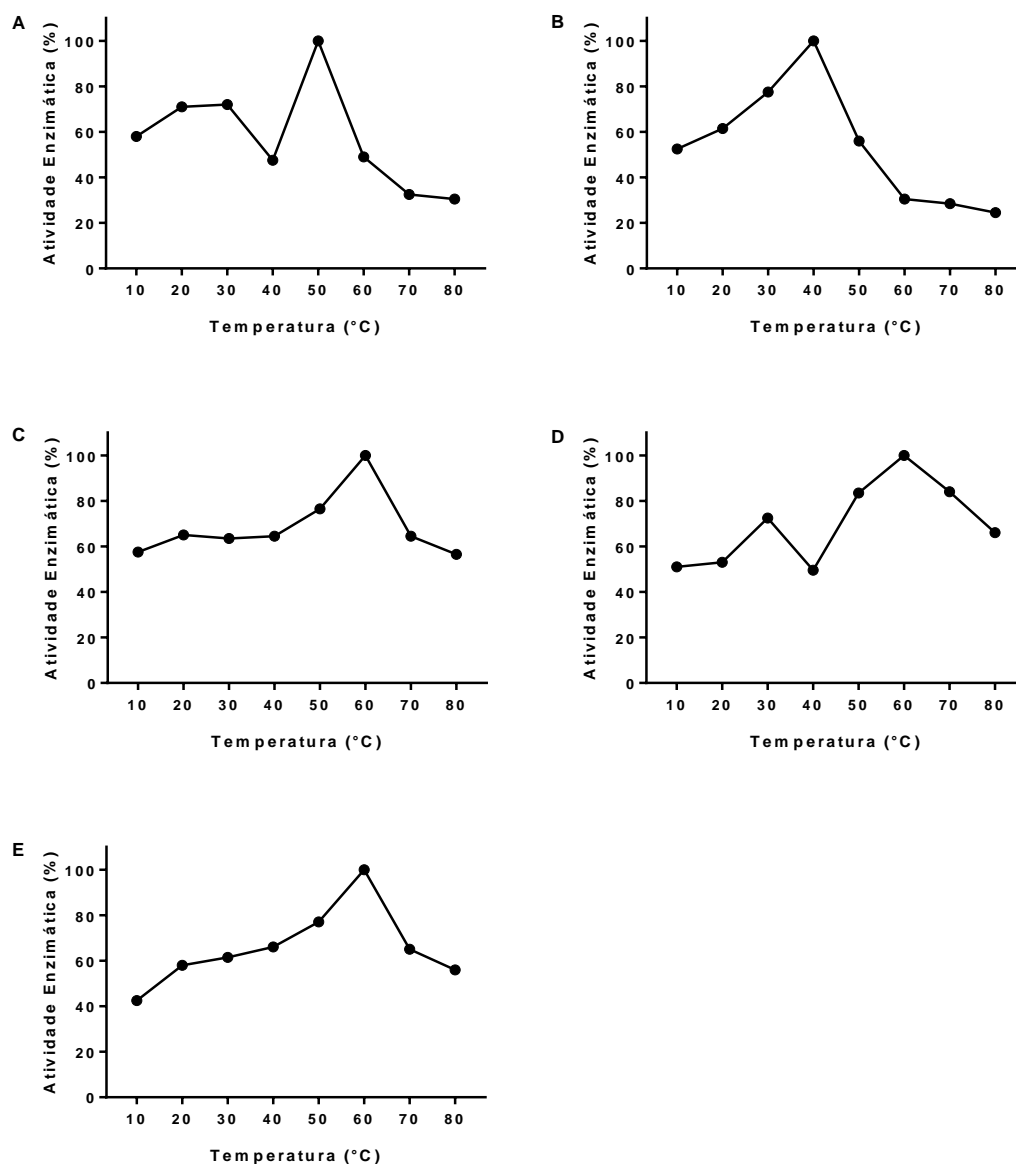
**Figura 9** - Efeito de íons metálicos ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  e  $\text{Fe}^{2+}$ ; 5 mM) sobre a atividade xilanolítica de extratos enzimáticos obtidos a partir de bactérias xilanolíticas isoladas de solo preservado no bioma cerrado. (A) *B. velezensis* AP-6; (B) *B. toyonensis* MP-9; (C) *B. thuringiensis* ME-1; (D) *B. pseudomycooides* ME-16; (E) *B. thuringiensis* ME-20. A maior atividade enzimática, obtida sob condições ótimas de reação (pH e temperatura), foi considerada como 100 %, sendo calculada, para as demais condições, a atividade relativa (%). Os resultados mostram a média de duplicatas biológicas.



**Figura 10** - Efeito do pH (2-12) sobre a atividade lipolítica de extratos enzimáticos obtidos a partir de bactérias lipolíticas isoladas de solo preservado no bioma cerrado. (A) *B. siamensis* AB-2; (B) *B. methylotrophicus* AB-3; (C) *L. macroides* AP-4; (D) *B. thuringiensis* MB-7; (E) *B. wiedmannii* MB-4. A maior atividade enzimática, obtida a 30 °C, foi considerada como 100 %, sendo calculada, para os demais pHs, a atividade relativa (%). Os resultados mostram a média de duplicatas biológicas.



**Figura 11** - Efeito da temperatura (10-80 °C) sobre a atividade lipolítica de extratos enzimáticos obtidos a partir de bactérias lipolíticas isoladas de solo preservado no bioma cerrado. (A) *B. siamensis* AB-2; (B) *B. methylotrophicus* AB-3; (C) *L. macroides* AP-4; (D) *B. thuringiensis* MB-7; (E) *B. wiedmannii* MB-4. A maior atividade enzimática, obtida em tampão tampão Tris-HCl (50 mM, pH 8), foi considerada como 100 %, sendo calculada, para as demais temperaturas, a atividade relativa (%). Os resultados mostram a média de duplicatas biológicas.





**Figura 12** - Efeito de íons metálicos ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  e  $\text{Fe}^{2+}$ ; 5 mM) sobre a atividade lipolítica de extratos enzimáticos obtidos a partir de bactérias lipolíticas isoladas de solo preservado no bioma cerrado. (A) *B. siamensis* AB-2; (B) *B. methylotrophicus* AB-3; (C) *L. macroides* AP-4; (D) *B. thuringiensis* MB-7; (E) *B. wiedmannii* MB-4. A maior atividade enzimática, obtida sob condições ótimas de reação (pH e temperatura), foi considerada como 100 %, sendo calculada, para as demais condições, a atividade relativa (%). Os resultados mostram a média de duplicatas biológicas.

