

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Larice Aparecida Rezende Santana

**Potencial da biodigestão anaeróbia como fonte de bactérias produtoras
de enzimas hidrolíticas de interesse biotecnológico**

Juiz de Fora
2024

Larice Aparecida Rezende Santana

**Potencial da biodigestão anaeróbia como fonte de bactérias produtoras
de enzimas hidrolíticas de interesse biotecnológico**

Tese de doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas da
Universidade Federal de Juiz de
Fora, como requisito à obtenção do
título de Doutora.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a. Mirian Pereira Rodarte
Coorientador: Dr. Marcelo Henrique Otenio

Juiz de Fora
2024

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Santana, Larice Aparecida Rezende.

Potencial da biodigestão anaeróbia como fonte de bactérias produtoras de enzimas hidrolíticas de interesse biotecnológico / Larice Aparecida Rezende Santana. -- 2024.

111 p. : il.

Orientadora: Mirian Pereira Rodarte

Coorientador: Marcelo Henrique Otenio

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2024.

1. Enzimas hidrolíticas. 2. Biodigestão anaeróbia. 3. Biotecnologia. 4. Microrganismos. I. Rodarte, Mirian Pereira, orient. II. Otenio, Marcelo Henrique, coorient. III. Título.

Larice Aparecida Rezende Santana

Potencial da biodigestão anaeróbia como fonte de bactérias produtoras de enzimas hidrolíticas de interesse biotecnológico

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos Ativos.

Aprovada em 16 de dezembro de 2024.

BANCA EXAMINADORA

Dra. Mirian Pereira Rodarte - Orientadora
Universidade Federal de Juiz de Fora

Dr. Marcelo Henrique Otênio - Coorientador
Embrapa - Gado de Leite

Dra. Vanessa Aglaê Martins Teodoro
Universidade Federal de Juiz de Fora

Dra. Juliana de Carvalho da Costa
Universidade Federal de Juiz de Fora

Dra. Elis Marina Turini Claro

Dra. Fernanda Mara Fernandes

Centro Universitário FAMINAS

Juiz de Fora, 16/12/2024.



Documento assinado eletronicamente por **Mirian Pereira Rodarte, Professor(a)**, em 16/12/2024, às 12:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marcelo Henrique Otenio, Usuário Externo**, em 16/12/2024, às 13:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Vanessa Aglaê Martins Teodoro, Professor(a)**, em 16/12/2024, às 13:08, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Elis Marina Turini Claro, Usuário Externo**, em 16/12/2024, às 13:09, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fernanda Mara Fernandes, Usuário Externo**, em 17/12/2024, às 09:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Juliana de Carvalho da Costa, Professor(a)**, em 17/12/2024, às 11:48, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufjf (www2.ufjf.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **2159444** e o código CRC **65299054**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus pelas oportunidades concedidas, pela proteção ao longo do caminho, pelas bênçãos recebidas e pela força e luz que me sustentaram durante toda esta jornada.

Agradeço à minha família e aos amigos pelo amor, carinho, incentivo, apoio incondicional e por estarem sempre ao meu lado, tornando cada etapa deste caminho mais especial.

Sou muito grata à minha orientadora, Professora Dra. Mirian Pereira Rodarte, e ao meu coorientador, Dr. Marcelo Henrique Otenio. Obrigada por todo apoio, confiança, dedicação, ensinamentos, incentivo, paciência e por serem um suporte essencial nos momentos mais desafiadores.

Expresso minha imensa gratidão aos técnicos de laboratório Ernando Ferreira Motta, Jéssica Chagas e Júnior César Fernandes pela confiança, apoio, incentivo, contribuições, assistência na realização das análises. Aos meus estagiários Ana Gleicia Silva Melo, Diego Santos Cunha, João Pedro de Freitas Bedim, Marina Alves, Paula Franklin, Sofia Teixeira Venâncio e Talita Furtado, que foram fundamentais para o desenvolvimento do projeto o meu muito obrigada pela dedicação e carinho.

Agradeço ao Laboratório de Microbiologia do Rúmen e todos meus colegas que fazem parte do grupo, por compartilharem experiências e me auxiliarem no desenvolvimento dos experimentos. Meu reconhecimento também vai ao Laboratório de Biotecnologia e Fisiologia Vegetal, em especial ao responsável Leônidas Paixão Passos e à bolsista de iniciação científica FAPEMIG Yara Beatriz Moreira, assim como ao Laboratório de Microbiologia do Leite, especialmente à responsável Carla Christine Lange e à bolsista de Bolsa de Desenvolvimento em C, T & I Larissa da Costa Teodoro, pela assistência, pelo acesso aos equipamentos e pela realização das análises.

À Universidade Federal de Juiz de Fora, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas e seus funcionários, expresso minha gratidão pelo apoio e suporte ao longo desta jornada acadêmica.

Ao Conselho Nacional Brasileiro de Ciência Desenvolvimento Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

(CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Embrapa pelo apoio financeiro recebido.

RESUMO

Enzimas microbianas hidrolíticas, como amilase, celulase, xilanase, lipase e protease, são biocatalisadores com aplicações em vários segmentos industriais. A digestão anaeróbia é um bioprocesso considerado uma fonte de microrganismos produtores dessas enzimas, mas ainda é um ambiente pouco explorado. Este estudo teve como objetivo isolar e identificar bactérias hidrolíticas com potencial biotecnológico em três modelos diferentes de biorreatores anaeróbios, Batelada, *Upflow Anaerobic Sludge Blanket* (UASB) e Lagoa Coberta. A pesquisa também está alinhada aos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável, com ênfase no ODS 12: "Assegurar padrões de produção e de consumo sustentáveis". As bactérias produtoras de enzimas hidrolíticas foram selecionadas com base na sua capacidade de hidrolisar amido, celulose e hemicelulose, xilose, triacilgliceróis e caseína. As características morfofisiológicas dos isolados bacterianos foram avaliadas por meio da coloração de Gram e de testes bioquímicos específicos. As atividades enzimáticas foram determinadas utilizando métodos colorimétricos. O sequenciamento parcial do gene 16S rRNA foi empregado para identificar os isolados que apresentaram as maiores atividades enzimáticas. Foram isoladas quinhentas e sessenta e cinco bactérias produtoras de enzimas hidrolíticas, com características similares às bactérias pertencentes aos gêneros *Acetobacter*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Corynebacterium* e *Pseudomonas*. Dentre os isolados, treze apresentaram atividade enzimática de média a alta na avaliação qualitativa. Dentre esses, seis isolados se destacaram para a produção de lipase, com valores de atividade enzimática variando entre 189,65 e 5220,73 U mL⁻¹, o que indica um potencial biotecnológico significativo, mesmo sem otimização do processo. O sequenciamento parcial do gene 16S rRNA permitiu a identificação de um isolado como *Pseudomonas aeruginosa*. Diante desses resultados, o bioprocesso avaliado representa uma fonte promissora de microrganismos produtores de enzimas hidrolíticas de interesse biotecnológico, com potencial para aplicação na indústria farmacêutica, além de outras áreas industriais.

Palavras-chave: enzimas hidrolíticas; biodigestão anaeróbia; biotecnologia; microrganismos.

ABSTRACT

Hydrolytic microbial enzymes, such as amylase, cellulase, xylanase, lipase, and protease, are biocatalysts with applications across various industrial sectors. Anaerobic digestion is a bioprocess considered a source of microorganisms producing these enzymes, yet it remains a largely unexplored environment. This study aimed to isolate and identify hydrolytic bacteria with biotechnological potential in three different models of anaerobic bioreactors: Batch, Upflow Anaerobic Sludge Blanket (UASB), and Covered Lagoon. The research is also aligned with the Sustainable Development Goals, with an emphasis on SDG 12: “Ensure sustainable consumption and production patterns.” Hydrolytic enzyme-producing bacteria were selected based on their ability to hydrolyze starch, cellulose, hemicellulose, xylose, triacylglycerols, and casein. Morphophysiological characteristics of the bacterial isolates were evaluated through Gram staining and specific biochemical tests. Enzymatic activities were determined using colorimetric methods. Partial sequencing of the 16S rRNA gene was employed to identify the isolates exhibiting the highest enzymatic activities. A total of 565 hydrolytic enzyme-producing bacteria were isolated, displaying characteristics similar to bacteria belonging to the genera *Acetobacter*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Corynebacterium*, and *Pseudomonas*. Among these, thirteen isolates showed medium to high enzymatic activity in the qualitative assessment. Of these, six isolates stood out for lipase production, with enzymatic activity values ranging from 189.65 to 5,220.73 U mL⁻¹, indicating significant biotechnological potential even without process optimization. Partial sequencing of the 16S rRNA gene identified one isolate as *Pseudomonas aeruginosa*. Based on these findings, the evaluated bioprocess represents a promising source of microorganisms producing hydrolytic enzymes of biotechnological interest, with potential applications in the pharmaceutical industry as well as other industrial sectors.

Keywords: hydrolytic enzymes; anaerobic digestion; biotechnology; microorganisms.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	– Etapas da degradação do processo de biodigestão anaeróbia	18
Figura 2	– Esquema do biorreator modelo Lagoa coberta da fazenda experimental da Embrapa Gado de Leite.....	20
Figura 3	– Configuração experimental para biodigestão anaeróbia em batelada.....	21
Figura 4	– Esquema de um reator híbrido <i>UASB</i>	22
Fluxograma 1	– <i>Screening</i> e potencial de produção enzimática de bactérias hidrolíticas em biorreatores anaeróbios.....	39
Figura 5	– Biorreator Batelada.....	41
Figura 6	– Biorreator <i>UASB</i>	42
Figura 7	– Biorreator Lagoa Coberta.....	43
Figura 8	– Procedimento para a obtenção do extrato bruto enzimático.....	58
Figura 9	– Procedimento de análise para determinação da atividade enzimática qualitativa.....	60
Figura 10	– Eletroforese em gel de amplificação de PCR do gene 16S rRNA	85
Figura 11	– Curva padrão da maltose	108
Figura 12	– Curva padrão da glicose	109
Figura 13	– Curva padrão da xilose	110
Figura 14	– Curva padrão do p-nitrofenol	111

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	–	Características físico-químicas do capim-elefante	22
Tabela 2	–	Características físico-químicas do soro de queijo ricota	23
Tabela 3	–	Características físico-químicas de dejetos da pecuária leiteira	24
Tabela 4	–	Características físico-químicas de dejetos suínos	25
Tabela 5	–	Diversidade microbiana com potencial biotecnológico presentes em biorreatores anaeróbios operados com diferentes substratos	27
Tabela 6	–	Operação dos três modelos de biorreatores anaeróbios	40
Tabela 7	–	Meios de cultura específicos para bactérias hidrolíticas	45
Tabela 8	–	Composição do meio de cultivo Ágar Amido	46
Tabela 9	–	Composição do meio de cultivo Ágar Carboximetilcelulose	47
Tabela 10	–	Composição do meio de cultivo Ágar Xilano	48
Tabela 11	–	Testes bioquímicos com base na diferença da composição química da parede celular das bactérias isoladas	50
Tabela 12	–	Composição do meio de cultivo Triple Sugar Iron Ágar	53
Tabela 13	–	Composição do meio de cultivo Ágar Ureia.....	56
Tabela 14	–	Meios de Cultivo para as bactérias produtoras de enzimas hidrolíticas de interesse biotecnológico para obtenção do extrato bruto enzimático	57
Tabela 15	–	Atividade enzimática qualitativa com base no cálculo do índice enzimático	61
Tabela 16	–	Características morfofisiológicas que definiram o gênero dos isolados bacterianos	75
Tabela 17	–	Isolados bacterianos com potencial para produção de enzimas hidrolíticas	77
Tabela 18	–	Atividade enzimática dos isolados bacterianos.....	80
Tabela 19	–	Identificação molecular dos isolados bacterianos produtores de enzimas hidrolíticas	83
Tabela 20	–	Curva padrão de maltose	108
Tabela 21	–	Curva padrão da glicose	109
Tabela 22	–	Curva padrão da xilose	110

Tabela 23 – Curva padrão do p-nitrofenol	111
--	-----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BA	Biodigestão anaeróbia
BHI	Brain Heart Infusion
CA	Co-digestão anaeróbia
CH ₃ COOH	Ácido acético
CMC	Carboximetilcelulose
DNS	Ácido 3,5-dinitrosalicílico
EC 3	Hidrolases
EC 3.1.1.1	Carboxilesterase
EC 3.1.1.3	Triacilglicerol lipase
EC 3.2.1.1	α -amilase
EC 3.2.1.2	β -amilase
EC 3.2.1.3	Glucana 1,4- α -glicosidase
EC 3.2.1.4	4-(1,3;1,4)- β -D-glucana 4-glucano hidrolase
EC 3.2.1.8	Endo-1,4- β -xilanase
EC 3.2.1.20	α -glicosidase
EC 3.2.1.21	β -D-glicosídeo glucohidrolase
EC 3.2.1.37	Xilana 1,4- β -xilosidase
EC 3.2.1.74	Glucana 1,4- β -glicosidase
EC 3.2.1.91	Celulose 1,4- β -celobiosidase
EC 3.4.11.9	Xaa-pro aminopeptidase
EC 3.4.11.18	Metionil aminopeptidase
EC 3.4.21.62	Subtilisina

EC 3.4.24.3	Colagenase microbiana
H ₂	Hidrogênio
INMET	Instituto Nacional Meteorologia
K ₂ HPO ₄	Fosfato de potássio
MgSO ₄	Sulfato de magnésio
NaCl	Cloreto de sódio
ODS	Objetivos de Desenvolvimento Sustentável
pNPB	p-nitrofenil butirato
SIM	Indol Sulfeto Motilidade
TMPD	N,N,N',N'- tetrametil-p-fenilenodiamina
TRH	Tempo de retenção hidráulico
TSI	Triple Sugar Iron
U	Unidade de atividade enzimática

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1 BIODIGESTÃO ANAERÓBIA	18
2.2 ENZIMAS HIDROLÍTICAS	25
2.2.1 Amilase	30
2.2.2 Celulase	31
2.2.3 Xilanase	33
2.2.4 Lipase	34
2.2.5 Protease	35
3 OBJETIVOS	38
3.1 OBJETIVO GERAL	38
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
4 MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1 COLETA DE AMOSTRAS E OPERAÇÃO DOS BIORREATORES	40
4.2 ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS PRODUTORAS DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS	43
4.3 SELEÇÃO DAS BACTÉRIAS PRODUTORAS DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS ..	46
4.3.1. Seleção de bactérias produtoras de amilase	46
4.3.2 Seleção de bactérias produtoras de celulase	46
4.3.3 Seleção de bactérias produtoras de xilanase	47
4.3.4 Seleção de bactérias hidrolíticas produtoras de lipase	48
4.3.5 Seleção de bactérias hidrolíticas produtoras de protease	49
4.4 CONSERVAÇÃO E MANUTENÇÃO DE BACTÉRIAS HIDROLÍTICAS	49
4.5 CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA	49
4.5.1 Coloração de Gram	50
4.5.2 Teste da bile esculina	50
4.5.3 Teste da catalase	51
4.5.4 Teste do citrato	51
4.5.5 Teste de crescimento em cloreto de sódio 5%	51
4.5.6 Teste de crescimento em cloreto de sódio 6,5%	52
4.5.7 Teste de fermentação de glicose	52
4.5.8 Teste de fermentação de lactose	53
4.5.9 Teste de produção de indol	53
4.5.10 Teste de fermentação de manitol	54
4.5.11 Teste da motilidade	54

4.5.12 Teste da oxidase	54
4.5.13 Teste da Produção de sulfeto de hidrogênio	55
4.5.14 Teste de redução do nitrato	55
4.5.15 Teste da urease	55
4.6 IDENTIFICAÇÃO PRESUNTIVA DAS BACTÉRIAS HIDROLÍTICAS	56
4.7 ATIVIDADE ENZIMÁTICA QUALITATIVA	56
4.7.1 Extrato bruto enzimático	57
4.7.2 Determinação da atividade enzimática qualitativa	61
4.8 ATIVIDADE ENZIMÁTICA QUANTITATIVA	61
4.8.1 Determinação da atividade enzimática quantitativa da amilase	62
4.8.1.1 Curva padrão da maltose	63
4.8.2 Determinação da atividade enzimática quantitativa da celulase	64
4.8.2.1 Curva padrão da glicose	65
4.8.3 Determinação da atividade da xilanase	66
4.8.3.1 Curva padrão da xilose	67
4.8.4 Determinação da atividade de lipase	68
4.8.4.1 Curva padrão do p-nitrofenol	69
4.8.5 Determinação da atividade de protease	70
4.9 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR	71
4.9.1 Extração de DNA	71
4.9.2 Amplificação do gene 16S rRNA	72
4.9.3 Eletroforese em gel de agarose	72
4.9.4 Sequenciamento do gene 16S rRNA	73
4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA	73
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	74
5.1 CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA	74
5.2 ATIVIDADE ENZIMÁTICA	76
5.3 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR	83
6 CONCLUSÃO	87
6.1 PERSPECTIVAS FUTURAS	87
REFERÊNCIAS	89
ANEXO A – Curva padrão	108

1 INTRODUÇÃO

A biodigestão anaeróbia (BA), é um bioprocesso sustentável que se destaca por seu baixo custo operacional e alta eficiência na recuperação de energia. Esse bioprocesso é utilizado para tratamento de resíduos orgânicos complexos, onde a matéria orgânica é degradada por uma diversidade de microrganismos (WANG *et al.*, 2019). Esses microrganismos, além de serem essenciais para o funcionamento do bioprocesso, têm um elevado potencial biotecnológico, pois produzem compostos de alto valor agregado com diversas aplicações industriais, como as enzimas hidrolíticas (PASALARI *et al.*, 2021).

Os substratos utilizados na BA devem conter componentes nutricionais para o desenvolvimento dos microrganismos e para produção de metabólitos de interesse industrial (ADEKUNLE; OKOLIE, 2015). Como um único substrato nem sempre fornece todos os nutrientes necessários para o crescimento microbiano, a utilização de diferentes resíduos agroindustriais de forma concomitante é uma prática comum (RAINA; KUMAR; SARAN, 2022). Nesse contexto, a co-digestão anaeróbia (CA) surge como uma tecnologia sustentável, simples e eficiente, que tem sido empregada como um processo alternativo da BA, para a utilização conjunta de diferentes tipos de resíduos com características complementares (XU *et al.*, 2017). Essa abordagem não só melhora a distribuição de nutrientes, atuando como cofatores para enzimas microbianas, mas também oferece a possibilidade de conter todos os componentes necessários para a dinâmica populacional microbiana (PASALARI *et al.*, 2021).

Em processos biotecnológicos, as enzimas hidrolíticas de origem microbiana desempenham um papel crucial na degradação de biomoléculas complexas em produtos mais simples, sendo consideradas as principais enzimas industriais (CONSTANCIO *et al.*, 2020; LOHANI; HAVUKAINEN, 2018). Essas enzimas, incluindo amilases, celulasas, xilanases, lipases e proteases, desempenham um papel crucial em diversas aplicações industriais. Elas são fundamentais em setores como a indústria de alimentos, onde ajudam preservação de produtos; na produção de biocombustíveis, onde facilitam a conversão de biomassa em energia renovável; na indústria de cosméticos, proporcionando formulações mais eficientes; no setor farmacêutico, contribuindo para a fabricação de medicamentos; e nas indústrias de papel, celulose e têxtil,

onde melhoram a qualidade e a eficiência dos processos de produção (MOKRANI; NABTI, 2024).

Além de sua versatilidade, as enzimas microbianas oferecem transformações químicas eficientes e ambientalmente sustentáveis, apresentando alta estabilidade sob condições operacionais variadas (BABAGIL; NADAROGLU, 2022; CONSTANCIO *et al.*, 2020). Assim, a utilização de enzimas hidrolíticas microbianas não só contribui para a eficiência de processos industriais, mas também promove práticas mais sustentáveis, alinhando-se aos princípios da biotecnologia e da economia circular (ARORA; FATIMA, 2024).

A produção enzimática representa um campo promissor na biotecnologia, como na síntese de compostos de alto valor agregado (CONSTANCIO *et al.*, 2020). Essa produção é variável entre diferentes espécies microbianas, bem como entre cepas da mesma espécie, o que torna essencial a seleção de cepas com capacidade de gerar quantidades significativas de enzimas específicas para aplicações em escala industrial (FRANCHI *et al.*, 2018; UNDERKOFER; BARTON; RENNERT, 1958). Nesse contexto, a bioprospecção de microrganismos emerge como uma metodologia crucial, envolvendo o processamento e a triagem de amostras, seguidos do isolamento de microrganismos com potencial biotecnológico (ACHARYA; CHAUDHARY, 2012). Além de impulsionar avanços tecnológicos, essa abordagem está alinhada aos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS), com ênfase no ODS 12: "Assegurar padrões de produção e de consumo sustentáveis", ao promover uma gestão eficiente e o uso responsável dos recursos naturais.

Embora a BA e a CA sejam consideradas fontes de microrganismos com potencial biotecnológico, ainda são ambientes pouco explorados, oferecendo uma oportunidade significativa para novas descobertas no campo da biotecnologia (FRANCHI *et al.*, 2018; PASALARI *et al.*, 2021). Nesse contexto, é relevante destacar que não foram encontrados estudos que investigassem esses bioprocessos como fontes de microrganismos produtores de enzimas hidrolíticas. Portanto, neste trabalho, o isolamento de microrganismos com potencial biotecnológico a partir de biorreatores anaeróbios operados com substratos como dejetos bovinos e caldo de cana-de-açúcar representa uma alternativa promissora para aumentar a produção de metabólitos bioativos naturais.

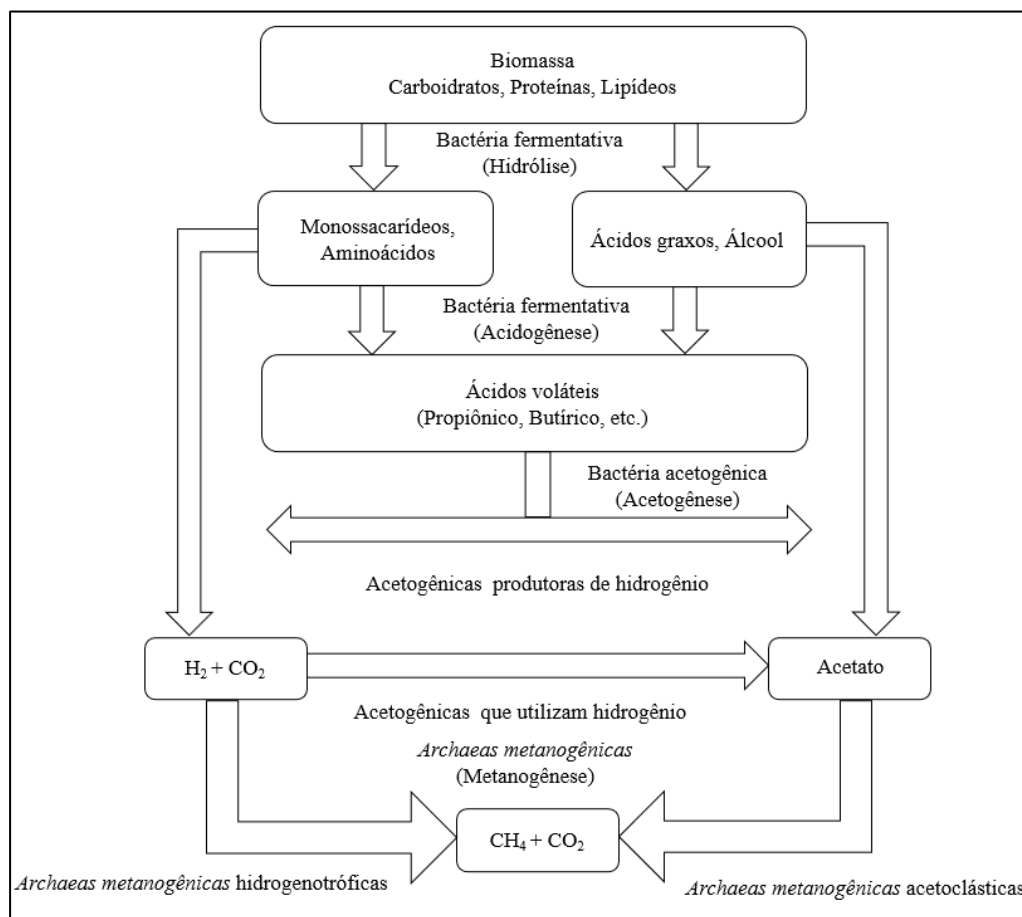
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 BIODIGESTÃO ANAERÓBIA

A biodigestão anaeróbia é um bioprocesso realizado por microrganismos anaeróbios e/ou anaeróbios facultativos, que decompõem matéria orgânica em compostos moleculares menores, resultando na produção de biogás, composto principalmente por metano, dióxido de carbono e outros gases residuais. O biogás destaca-se como uma fonte de energia renovável, enquanto o efluente gerado, devido aos seus nutrientes, apresenta potencial para uso como biofertilizante, contribuindo para práticas agrícolas mais sustentáveis (ATELGE *et al.*, 2020; JIN *et al.*, 2021).

A decomposição da matéria orgânica durante a BA ocorre por meio da ação de diferentes grupos microbianos, em quatro etapas: hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese (Figura 1) (PASALARI *et al.*, 2021).

Figura 1 – Etapas da degradação do processo de biodigestão anaeróbia



Fonte: Adaptado de PASALARI *et al.* (2021).

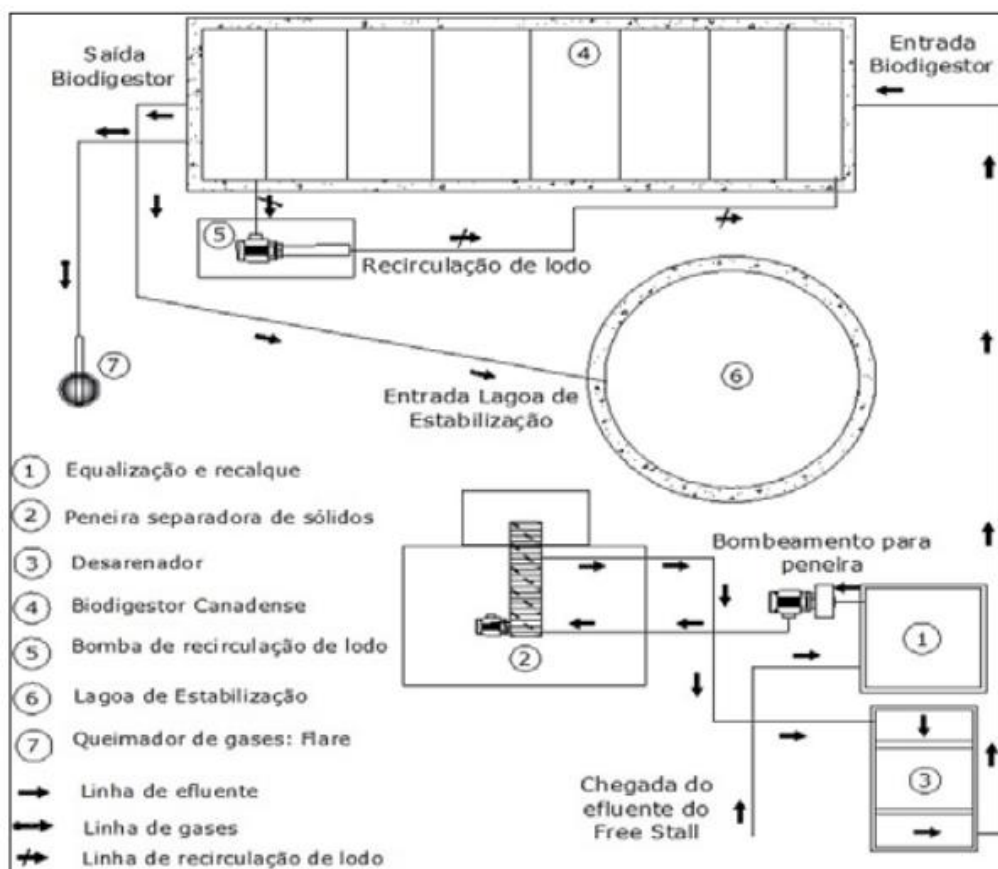
Na hidrólise, os microrganismos hidrolíticos dos filos *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria* e *Chloroflexi* produzem enzimas extracelulares como amilase, celulase, xilanase, lipase e protease (PASALARI *et al.*, 2021). Essas enzimas degradam e/ou solubilizam moléculas complexas insolúveis, como proteínas, lipídios e polissacarídeos em moléculas solúveis menores, como ácidos graxos, açúcares simples, aminoácidos, álcoois e aldeídos (AKINDOLIRE; RAMA; ROOPNARAIN, 2022; PRAMANIK *et al.*, 2019).

Na acidogênese, os produtos da hidrólise são transformados em ácidos graxos voláteis, como ácidos acéticos, butírico e propiônico e álcoois por microrganismos acidogênicos, como *Clostridium spp.* e *Bacteroides spp.* (OTTONI *et al.*, 2022; PRAMANIK *et al.*, 2019). Na acetogênese, microrganismos acetogênicos, como *Desulfococcus spp.* e *Desulfotomaculum spp.* transformam os produtos da acidogênese em ácido acético (CH_3COOH), hidrogênio (H_2) e CO_2 (OTTONI *et al.*, 2022). Na metanogênese, etapa final do bioprocesso, os microrganismos metanogênicos, como *Archaeas metanogênicas*, *Methanosarcina spp.* e *Methanobacterium spp.* utilizam CH_3COOH , H_2 e CO_2 para produzir CH_4 (OTTONI *et al.*, 2022; PRAMANIK *et al.*, 2019).

Para acelerar a decomposição da matéria orgânica biorreatores têm sido empregados por oferecerem condições ideais para o crescimento microbiano e produção de biogás (JEREMIAH; KABEYI, 2022). Os principais tipos de biorreatores empregados atualmente incluem modelos de fluxo contínuo, descontínuo e ascendente (LEON *et al.*, 2021).

Os biorreatores de fluxo contínuo são altamente versáteis, adaptando-se a uma ampla variedade de substratos. Eles operam com o abastecimento regular de cargas diárias ou periódicas, enquanto o efluente é descarregado de forma contínua, mantendo a eficiência do processo (LEON *et al.*, 2021). No Brasil, o modelo de fluxo contínuo mais utilizado é o biorreator tipo Lagoa Coberta. Esse modelo se destaca por sua grande área de exposição solar, que otimiza a produção de biogás, além de proporcionar um espaço amplo e eficiente para o bioprocesso (Figura 2) (FREITAS *et al.*, 2019).

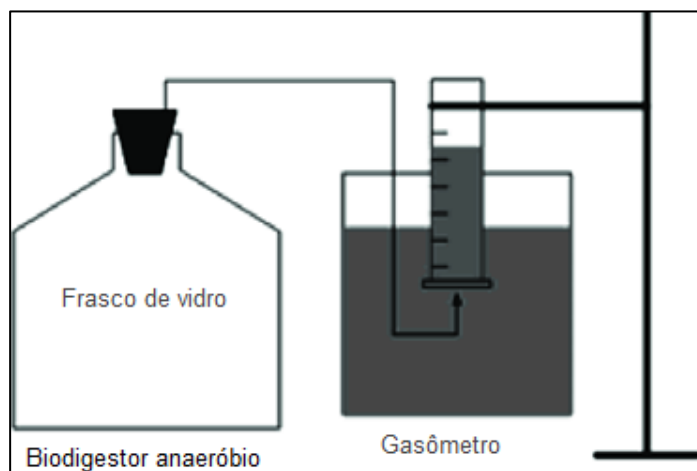
Figura 2 – Esquema do biorreator modelo Lagoa coberta da fazenda experimental da Embrapa Gado de Leite



Fonte: MENDONÇA *et al.* (2016).

Os biorreatores de fluxo descontínuo, também conhecidos como de batelada, são particularmente adequados para substratos de decomposição lenta, como biomassa lignocelulósica. Esses biorreatores são carregados com todo o material de uma só vez e mantêm a carga no interior até que o processo de biodigestão seja concluído, momento em que a produção de biogás cessa completamente (Figura 3) (LEON *et al.*, 2021). Nesse modelo, tanto o tempo quanto a taxa de degradação da matéria orgânica são diretamente proporcionais à temperatura (ARROYO *et al.*, 2020).

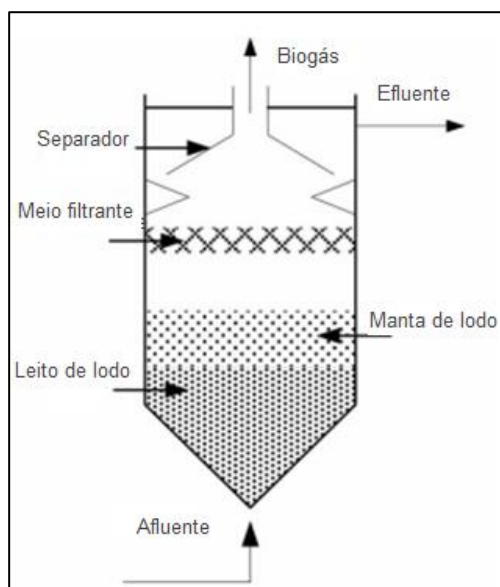
Figura 3 - Configuração experimental para biodigestão anaeróbia em batelada



Fonte: Adaptado de NUGROHO; SUMANTRI (2020).

Os biorreatores de fluxo ascendente (*Upflow Anaerobic Sludge Blanket - UASB*) possuem alta capacidade de retenção de biomassa, o que possibilita operar com um tempo de retenção hidráulica (TRH) reduzido. Além disso, são estáveis mesmo diante de variações nas características do afluente e suportam altas cargas orgânicas volumétricas (Figura 4). Esses biorreatores são amplamente utilizados no tratamento de substratos de diversas fontes, como resíduos das indústrias de açúcar, bebidas, laticínios, matadouros, papel e celulose, produtos químicos, além de serem eficazes em sistemas de esgotos sanitários (GAIO *et al.*, 2023).

Figura 4 - Esquema de um reator híbrido UASB



Fonte: Adaptado de DUTTA; DAVIES; IKUMI (2018).

A biodigestão anaeróbia é um bioprocesso realizado com uma variedade substratos, como biomassas vegetais como caldo de capim, resíduos agroindustriais como soro de queijo ricota, além de dejetos da pecuária leiteira e de suínos (ATELGE *et al.*, 2020; WU *et al.*, 2019).

O capim-elefante é uma biomassa vegetal amplamente utilizada para a geração de energia em termoelétricas, por meio de sua queima. A extração do caldo dessa planta oferece vantagens significativas, pois reduz o teor de umidade e aumenta o poder calorífico do bagaço, melhorando sua eficiência como combustível (MARAFON *et al.*, 2021). Além disso, o caldo extraído apresenta uma alta concentração de biomassa, destacando-se como um substrato promissor para a produção de biogás por meio da biodigestão anaeróbia (Tabela 1) (HUANG *et al.*, 2019).

Tabela 1 – Características físico-químicas do capim-elefante

Componentes	Quantidade
Celulose (%)	36,00
Hemicelulose (%)	29,30
Lignina (%)	8,20
Sólidos Totais (%)	4,69

Fonte: Adaptado de MARAFON *et al.* (2021).

Os resíduos agroindustriais representam fontes promissoras para a produção de energia renovável, devido ao seu elevado teor de matéria orgânica e compostos nitrogenados. No entanto, quando descartados inadequadamente, esses resíduos podem se tornar altamente poluentes, levantando preocupações ambientais relacionadas à sustentabilidade. Diante desse cenário, os resíduos agroindustriais emergem como os substratos mais utilizados na BA, transformando desafios ambientais em oportunidades para a geração de energia sustentável (MARCHETTI; VASMARA, 2020; MENDONÇA; OMETTO; OTENIO, 2017; ZAMRI *et al.*, 2021).

Entre os efluentes gerados pela agroindústria de laticínios, o soro de queijo ricota se destaca como um subproduto da fabricação da ricota, que resulta da precipitação ácida das proteínas presentes no soro de leite (MIHALY COZMUTA *et al.*, 2020). A produção de ricota surge como uma estratégia para as agroindústrias de laticínios reaproveitarem o soro de leite convencional, proveniente da fabricação de queijos e outros derivados. Embora a concentração de proteínas no soro de queijo ricota não seja adequada para processos que visam a valorização dessas macromoléculas, seu elevado teor de lactose e matéria orgânica o torna um substrato viável para processos de fermentação anaeróbia (Tabela 2) (RIZZOLO; CORTELLINO, 2017).

Tabela 2 – Características físico-químicas do soro de queijo ricota

Componentes	Quantidade
Proteína (%)	0,15 a 0,22
Sais (%)	1 a 1,13
Lactose (%)	5
Demanda bioquímica de oxigênio (g L ⁻¹)	50
Demanda química de oxigênio (g L ⁻¹)	88

Fonte: Adaptado de CAROTA *et al.* (2017); RIZZOLO; CORTELLINO (2017). b

O sistema intensivo de confinamento de bovinos na pecuária leiteira é adotado para reduzir o estresse dos animais e aumentar sua capacidade

produtiva, além de promover seu bem-estar. No entanto, um dos principais desafios desse sistema é a quantidade significativa de dejetos gerados diariamente em uma área limitada. Assim, práticas sustentáveis para o manejo desses dejetos, como a BA, têm sido implementadas nas fazendas leiteiras. Os dejetos da pecuária leiteira são reconhecidos como uma fonte valiosa de nutrientes que, quando utilizados em processos de BA, podem gerar recursos energéticos alternativos e resultar em produtos finais com potencial para uso como biofertilizantes (Tabela 3) (DE MENDONÇA *et al.*, 2017; MENDONÇA; OMETTO; OTENIO, 2017).

Tabela 3 – Características físico-químicas de dejetos da pecuária leiteira

Componentes	Quantidade
Sólidos totais (%)	15,09
Proteína bruta (%)	15,29
Gordura (%)	1,20
Fibras (%)	33,45
Sólidos fixos (%)	24,25
Sódio (%)	0,39
Cálcio (%)	2,70
Fósforo (%)	0,68
Potássio (%)	0,75
Magnésio (%)	0,64
Ferro (%)	1054,83
Manganês (ppm)	137,70
Cobre (ppm)	46,17
Zinco (ppm)	170,83

Fonte: Adaptado de HUSSEIN *et al.* (2017).

A gestão de dejetos suínos representa um desafio significativo para as fazendas de criação de suínos, devido ao elevado volume gerado e ao alto teor de compostos orgânicos e nitrogenados (Tabela 4). Em resposta a essa problemática, práticas sustentáveis para o manejo desses dejetos, como a biodigestão anaeróbia (BA), têm sido implementadas nas propriedades suinícolas (FOLINO; ZEMA; CALABRÒ, 2020; MONTES *et al.*, 2019).

Tabela 4 – Características físico-químicas de dejetos suínos

Componentes	Quantidade
pH	7,00 a 7,50
Sólidos totais (g L ⁻¹)	2 a 8
Fósforo (PO ₄ ³⁻ -P g L ⁻¹)	0,05 a 0,13

Fonte: Adaptado de FOLINO; ZEMA; CALABRÒ (2020);
MONTES et al. (2019).

2.2 ENZIMAS HIDROLÍTICAS

As enzimas são biomoléculas orgânicas de origem proteica que atuam como catalisadores biológicos em reações metabólicas e químicas (THAPA *et al.*, 2019). No contexto dos processos biotecnológicos, as enzimas hidrolíticas de origem microbiana desempenham um papel crucial, pois facilitam a conversão de biomoléculas complexas em produtos mais simples e utilizáveis. Devido a essa capacidade de transformação, essas enzimas são reconhecidas como bioinsumos e catalisadores biológicos, com ampla aplicação em processos industriais (CONSTANCIO *et al.*, 2020).

A obtenção de enzimas hidrolíticas a partir de microrganismos isolados de bioprocessos de fermentação oferece várias vantagens em comparação com a obtenção de enzimas de origem vegetal e animal. Entre essas vantagens estão o baixo custo, possibilitado pelo uso de matérias-primas mais baratas, e a facilidade de produção em larga escala, permitindo a obtenção de grandes quantidades de enzimas de forma rápida. Além disso, as enzimas microbianas não geram efeitos tóxicos nem resíduos perigosos, tornando-se uma alternativa mais segura para processos industriais (FASIM; MORE; MORE, 2021). Assim, a produção de enzimas por microrganismos se destaca como uma das opções mais relevantes no campo da biotecnologia (FASIM; MORE; MORE, 2021; RAINA; KUMAR; SARAN, 2022).

Nesse contexto, a identificação de novas fontes microbianas não tóxicas é de interesse estratégico, pois assegura o suprimento de enzimas para diversos processos industriais (THAPA *et al.*, 2019). É importante ressaltar que a produção de enzimas é influenciada por diversos fatores, incluindo o tipo de bioprocessos, pH e temperatura. Essas variáveis são essenciais para otimizar a

obtenção de bioinsumos/biomoléculas, como as enzimas, garantindo que possuam propriedades qualitativas e quantitativas superiores para aplicações industriais. Portanto, compreender e controlar esses fatores é fundamental para maximizar a eficiência da produção de enzimas e atender à crescente demanda da indústria por soluções biotecnológicas eficazes (RAINA; KUMAR; SARAN, 2022).

Diversos microrganismos com potencial biotecnológico têm sido isolados de biorreatores anaeróbios, destacando uma significativa diversidade que pode ser explorada em processos biotecnológicos (Tabela 5).

Tabela 5 - Diversidade microbiana com potencial biotecnológico presentes em biorreatores anaeróbios operados com diferentes substratos

Biorreator do sistema de biodigestão anaeróbia	Substrato	pH	Temperatura (° C)	Tempo de retenção hidráulico (dias)	Diversidade microbiana	Referências
Biorreator anaeróbio semi-contínuo	Resíduos alimentares	7,39 -7,82	35	30	<i>Bacteroides spp.</i> <i>Lachnospiraceae spp.</i> <i>Novosphingobium spp.</i> <i>Ruminococcaceae spp.</i>	(YI <i>et al.</i> , 2014)
Biorreator anaeróbio contínuo	Dejeto da pecuária leiteira + Casca de Arroz	6,10-7,80	27,20-33,50	30	<i>Mucor spp.</i>	(AKINTOKUN; ABIBU; OYATOOGUN, 2017)
Biorreator anaeróbio em batelada	Águas residuais do processo de produção de tequila (vinhaça de tequila) + Águas residuais do cozimento de milho com cal pela indústria do milho (Nejayote)	5,50	35	60	<i>Acetobacter spp.</i> <i>Clostridium spp.</i>	(GARCÍA-DEPRAECT <i>et al.</i> , 2017)
Biorreator anaeróbio em batelada sequencial (ASBR)	Dejeto da pecuária leiteira	7,00-7,40	40	40	<i>Longilinea spp.</i> <i>Rhodopirellula islandica</i>	YILDIRIM <i>et al.</i> (2017)

(continuação)

Biorreator do sistema de biodigestão anaeróbia	Substrato	pH	Temperatura (°C)	Tempo de retenção hidráulico (dias)	Diversidade microbiana	Referências
Reator de fluxo e agitação Contínuo (CSTR)	Resíduos alimentares + águas residuais	7,80-7,90	35	35	<i>Tepidimicrobium spp.</i>	KIM <i>et al.</i> (2018)
Biorreator anaeróbio semi-contínuo	Dejeto da pecuária leiteira	7,68-7,93	37-55	18,80-37,50	<i>Bacillus spp.</i> <i>Pseudomonas spp.</i>	PAN <i>et al.</i> (2018)
Biorreator anaeróbio em batelada	Biorreator 1: Esterco de frango + vegetais + gordura animal + caldo de cana	6,70-9,10	37	32	<i>Aspergillus niger</i> <i>Penicillium spp.</i>	(OLUFEMI; VERONICA; GODWIN, 2019)
	Biorreator 2: Esterco de frango + vegetais + gordura animal + resíduos de iogurte					
	Biorreator 3: Esterco de frango + vegetais + gordura animal + resíduos de frutas					

(continuação)

Biorreator do sistema de biodigestão anaeróbia	Substrato	pH	Temperatura (°C)	Tempo de retenção hidráulico (dias)	Diversidade microbiana	Referências
Biorreator anaeróbio em batelada	Melaço + Água residual da produção de etanol a partir de arroz	6,00 – 7,20	35 - 37	29	<i>Beijerinckia spp.</i>	(KHAN, SOHAIL <i>et al.</i> , 2020)
<i>Plug- flow</i>	Biorreator 1: Efluente da estação de tratamento de cervejaria + dejetos da pecuária leiteira Biorreator 2: Soro de queijo ricota + dejetos da pecuária leiteira	6,50 - 7,00	18 - 35	165	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	DA SILVA <i>et al.</i> (2021)
Biorreator anaeróbio em batelada	Vinhaça de cana-de-açúcar	4,00 – 7,00	35	10	<i>Clostridium spp.</i> <i>Acinetobacter spp.</i>	ILTCHENCO <i>et al.</i> (2021)
Biorreator modelo Lagoa Coberta	Dejetos bovinos	7,10	35	35	<i>Staphylococcus spp.</i>	MAMINDLAPELLI <i>et al.</i> (2021)
Biorreator anaeróbio em batelada	Dejetos suínos + dejetos bovinos	7,80	50	9	<i>Corynebacterium spp.</i>	STRUCKMANN POULSEN <i>et al.</i> (2022)
Biorreator anaeróbio em batelada	Biomassa lignocelulósica	4,10 - 5,00	35 e 55	30 - 60	<i>Clostridium thermocellum</i>	(MANYI-LOH; LUES, 2023)

Fonte: Elaborada pela autora (2024).

A seleção de microrganismos produtores de enzimas hidrolíticas de interesse biotecnológico é uma estratégia biotecnológica promissora, pois pode resultar na redução de custos, especialmente em comparação com as enzimas sintéticas, que têm um alto valor comercial. A obtenção sustentável e eficaz dessas enzimas não apenas promove a eficiência na produção, mas também otimiza os processos de fabricação de diversos produtos (LAMILLA *et al.*, 2017). Entre as enzimas hidrolíticas de origem microbiana, destacam-se a amilase, celulase, xilanase, lipase e protease, consideradas ferramentas valiosas para o desenvolvimento de produtos de interesse industrial (THAPA *et al.*, 2019).

2.2.1 Amilase

As amilases catalisam a hidrólise de ligações glicosídicas nos polissacarídeos. Pertencendo à classe das hidrolases (EC 3) e à subclasse das glicosilases (EC 3.2), essas enzimas são classificadas conforme seu modo de ação em endoamilases e exoamilases (FAROOQ *et al.*, 2021). Conforme descrito na literatura, as amilases são produzidas por bactérias e fungos. Bactérias como *Acetobacter orientalis*, *Acinetobacter spp.*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus brovis*, *Bacillus alvei*, *Beijerinckia indica*, *Clostridium spp.*, *Corynebacterium spp.* e *Proteus spp.* e fungos como *Saccharomycopsis fibuligera* (AYAL *et al.*, 2024; CHEN *et al.*, 2021; FAROOQ *et al.*, 2021; MANNI; FILALI-MALTOUF, 2022; MOHAN *et al.*, 2019; SHARMA, MINAKSHI; SOOD; CHAUHAN, 2021).

As endoamilases catalisam a hidrólise das ligações glicosídicas no interior da molécula do polímero. Destaca-se entre essas enzimas a α -amilase (EC 3.2.1.1), que atua nas cadeias de amilopectina e amilose, liberando glicose, maltose, maltotriose, maltotetraose, maltopentaose e maltohexaose são produtos originários da ação de α -amilase (FAROOQ *et al.*, 2021).

A α -amilase destaca-se pelo seu significativo potencial biotecnológico e pela crescente aplicação industrial. Na indústria de detergentes, atua na hidrólise de alimentos ricos em amido, convertendo-os em oligossacarídeos solúveis em água e dextrinas, o que facilita a remoção de manchas. Na indústria de papel, é utilizada para hidrolisar o amido de alto peso molecular, contribuindo para a resistência e rigidez do papel produzido. No setor têxtil, desempenha um papel

fundamental no processo de desengomagem, promovendo a hidrólise parcial de compostos em substâncias solúveis em água, o que melhora a qualidade do tecido. Na indústria de biocombustíveis, é crucial na produção de etanol, hidrolisa o amido, liberando açúcares fermentáveis que podem ser utilizados na fermentação alcoólica (FAROOQ *et al.*, 2021).

As exoamilases hidrolisam as ligações α -1,4 na extremidade não redutora da molécula de amido, liberando dextrina (FAROOQ *et al.*, 2021; HUA *et al.*, 2022). Destaca-se entre essas enzimas a β -amilase (EC 3.2.1.2), glucana 1,4- α -glicosidase (EC 3.2.1.3) e α -glicosidase (EC 3.2.1.20). A β -amilase catalisa a hidrólise de ligações α -1,4 na extremidade não redutora das moléculas de amilose, amilopectina e glicogênio, liberando maltose. A glucana 1,4- α -glicosidase catalisa a hidrólise de ligações 1,6- α -D-glicosídicas quando a próxima ligação na sequência é 1,4, na extremidade não redutora de resíduos de aminoácidos, liberando β -D-glicose. A α -glicosidase catalisa a hidrólise de ligações 1,4- α -D-glicosídicas na extremidade terminal de resíduos de aminoácidos, liberando α -D-glicose (FAROOQ *et al.*, 2021; HUA *et al.*, 2022).

Entre essas enzimas, a β -amilase destaca-se pelo seu significativo potencial biotecnológico e pela crescente aplicação industrial (FAROOQ *et al.*, 2021; HUA *et al.*, 2022). Essa enzima é amplamente aplicada nas indústrias de amido, cervejeira e de panificação. Na indústria de amido, catalisa a hidrólise do amido liquefeito em maltose, o que aumenta a concentração de maltose. Na indústria cervejeira, catalisa a hidrólise do amido liquefeito em maltose, melhorando a quantidade de açúcares fermentáveis. Na indústria de panificação, inibe a retrogradação do amido ao encurtar as ligações α -1,4 da amilopectina, retardando o envelhecimento precoce do pão (SILANO *et al.*, 2021).

2.2.2 Celulase

As enzimas celulasas catalisam a hidrólise de polímero de celulose. Pertencendo à classe das hidrolases (EC 3) e à subclasse das glicosilases (EC 3.2), essas enzimas são classificadas conforme seu local de atuação no substrato celulósico em exoglucanase, endoglucanase e β -glicosidase (RAINA; KUMAR; SARAN, 2022; SARWAN; BOSE, 2021). Conforme descrito na literatura, as celulasas são produzidas por bactérias como *Acetobacter orientalis*,

Acinetobacter spp., *Micromonospora spp.*, *Acidothermus spp.*, *Beijerinckia fluminensis*, *Corynebacterium lipophiloflavu*, *Paenibacillus spp.*, *Streptomyces spp.* e *Pseudomonas spp.* e fungos como *Penicillium spp.*, *Trichoderma spp.*, *Aspergillus spp.* e *Talaromyces spp.* (CHEN *et al.*, 2021; KORSA *et al.*, 2023; LI, JIA XIANG *et al.*, 2020; MANNI; FILALI-MALTOUF, 2022; RAMANUJ; SHELAT, 2018; SAKTHIVEL *et al.*, 2010; SHARMA, AMITA *et al.*, 2016).

As exoglucanases clivam as extremidades das fibras de celulose resultando em celulose cristalina, liberando celo-oligossacarídeos ou dissacarídeos como celobiose ou glicose. Destaca-se entre essas enzimas a glucana 1,4- β -glicosidase (EC 3.2.1.74) e celulose 1,4- β -celobiosidase (EC 3.2.1.91). A glucana 1,4- β -glicosidase catalisa a hidrólise do polímero de celulose, liberando glicose diretamente do polímero e a celulose 1,4- β -celobiosidase catalisa a hidrólise do polímero de celulose na extremidade da celulose, liberando celobiose (LI, HEBIN *et al.*, 2021). Essas enzimas possuem um amplo potencial biotecnológico e crescente aplicação industrial, possuindo uma vasta gama de aplicações em diversos segmentos industriais (LI, HEBIN *et al.*, 2021; ZAFAR *et al.*, 2021). Na indústria de biocombustível, desempenham um papel crucial na conversão de substratos em açúcares fermentescíveis, essenciais para a obtenção de etanol de segunda geração. Na indústria de detergente, são utilizadas como aditivo, auxiliando na remoção eficaz de resíduos orgânicos e contribuindo para a eficácia dos produtos de limpeza (NUNES *et al.*, 2020; ZAFAR *et al.*, 2021).

As endoglucanase clivam ligações glicosídicas e se ligam ao componente não cristalino da celulose, hidrolisando seções amorfas por meio da quebra de cadeia de celulose de locais irregular liberando polissacarídeos únicos ou oligossacarídeos de diferentes comprimentos. Destaca-se entre essas enzimas a 4-(1,3;1,4)- β -D-glucana 4-glucano hidrolase (EC 3.2.1.4), que catalisa a hidrólise de ligações O-glicosídicas nas regiões internas da estrutura amorfa do polímero de celulose, de maneira randômica, liberando oligossacarídeos (GAVANDE *et al.*, 2023; LI *et al.*, 2021).

Entre essas enzimas a 4-(1,3;1,4)- β -D-glucana 4-glucano hidrolase destaca-se pelo seu significativo potencial biotecnológico e pela crescente aplicação industrial. Na indústria têxtil, é utilizada para a remoção de fibras e flocos da superfície de tecidos, conferindo um aspecto mais brilhante e macio ao

material. Na indústria vinícola, desempenha um papel crucial no aprimoramento das propriedades aromáticas dos vinhos, liberando compostos aromáticos, como os fenólicos, que possuem capacidades antioxidantes, nutracêuticas e flavorizantes (LI, ZHENGQUN *et al.*, 2018).

As β -glicosidasases catalisam a hidrólise da celulose convertendo a celobiose em glicose. Destaca-se entre essas enzimas a β -D-glicosídeo glucohidrolase (EC 3.2.1.21), que catalisa a hidrólise de ligações β -D-glicosídicas, nas moléculas de celobiose, liberando monômeros de glicose (KARAM; ELATTAL; KANSOH, 2023; KIM; KWON; CHANG, 2021; KORSÄ *et al.*, 2023).

2.2.3 Xilanase

As enzimas xilanases catalisam a hidrólise de ligações glicosídicas entre dois ou mais açúcares ou porções de oligossacarídeos (ALOKIKA; SINGH, 2019; TYAGI; SHARMA, 2021). Pertencendo à classe das hidrolases (EC 3), e subclasse das glicosilases (EC 3.2), essas enzimas são classificadas com base na comparação das sequências de aminoácidos, o que reflete a similaridade dos mecanismos de ação. Entre essas enzimas as endoxilanases e β -xilosidasases destacam-se como principais enzimas do sistema xilanolítico, responsáveis pela degradação do xilano (ALOKIKA; SINGH, 2019). Conforme descrito na literatura, as xilanases são produzidas por bactérias, como *Acetobacter orientalis*, *Acinetobacter spp.*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus cereus*, *Bacillus circulans*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus stearothermophilus*, *Corynebacterium alkanolyticum*, *Streptomyces spp.*, *Streptomyces roseiscleroticus*, *Streptomyces cuspidosporus*, *Streptomyces actuosus*, *Pseudonomas spp.*, *Clostridium absonum* e *Thermoactinomyces thalophilus*. E fungos como *Aspergillus spp.* e *Trichoderma spp.* (BURLACU; ISRAEL-ROMING; CORNEA, 2016; CHEN *et al.*, 2021; DHAVER *et al.*, 2022; KUGE *et al.*, 2017; PUROHIT *et al.*, 2017; SHAHI *et al.*, 2016).

As endoxilanases catalisam a hidrólise de ligações glicosídicas β -1,4 interna de xilana liberando xilooligossacarídeos como xilobiase, xilose e xilotriose com maior grau de polimerização (ALOKIKA; SINGH, 2019). Destaca-

se entre essas enzimas a endo-1,4- β -xilanase (EC 3.2.1.8), que catalisa a hidrólise de ligações glicosídicas dentro do xilano, com menor grau de polimerização do substrato, liberando xilose e xilooligossacarídeos (MENDONÇA; BARROCA; COLLINS, 2023).

A endo-1,4- β -xilanase destaca-se pelo seu significativo potencial biotecnológico e crescente aplicação industrial. Na indústria de papel e celulose, desempenha um papel crucial no branqueamento da celulose, promovendo a obtenção de produtos finais de alta qualidade. Nas indústrias de panificação e alimentação animal, atuam na redução da viscosidade da xilana presente nos cereais, melhorando a textura e a qualidade dos produtos finais, bem como facilitando a digestão dos alimentos pelos animais (PUCHART; ŠUCHOVÁ; BIELY, 2021).

As β -xilosidases catalisam a hidrólise na extremidade não redutora dos xilooligossacarídeos, liberando xilose (ALOKIKA; SINGH, 2019). Destaca-se entre essas enzimas a xilana 1,4- β -xilosidase (EC 3.2.1.37), que catalisa a hidrólise dos xilo-oligômeros, liberando de D-xilose (AL-ASKAR *et al.*, 2022; MARTÍNEZ-PACHECO *et al.*, 2020; ZHANG *et al.*, 2019).

A xilana 1,4- β -xilosidase destaca-se pelo seu significativo potencial biotecnológico e crescente aplicação industrial. Na indústria de biocombustíveis, atua na bioconversão de lignocelulose em açúcares fermentáveis, cruciais para a obtenção de etanol. Na indústria de papel e celulose, atua no branqueamento de celulose, melhorando a eficiência e reduzindo o uso de produtos químicos agressivos (AL-ASKAR *et al.*, 2022; MARTÍNEZ-PACHECO *et al.*, 2020; ZHANG *et al.*, 2019).

2.2.4 Lipase

As enzimas lipases catalisam a hidrólise de reações como esterificação (interesterificação e alcoólise), aminólise e hidrólise, liberando ácidos graxos, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e glicerol. Pertencendo à classe das hidrolases (EC 3), que atuam nas ligações éster (EC 3.1) de ácidos carboxílicos, essas enzimas são classificadas conforme suas capacidades de catalisar reações de hidrólise em triacilglicerol lipase (EC 3.1.1.3) e carboxilesterase (EC 3.1.1.1) (CHANDRA *et al.*, 2020; SZYMCZAK *et al.*, 2021). Conforme descrito na

literatura, as lipases são produzidas por bactérias, como *Acetobacter pasteurianus*, *Acinetobacter* spp., *Bacillus subtilis*, *Bacillus nealsonii*, *Beijerinckia fluminensis*, *Corynebacterium glutamicum*, *Pseudomonas alcaligenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fragi* e *Pseudomonas fluorescens* (CHANDRA *et al.*, 2020; MANNI; FILALI-MALTOUF, 2022; RAMANUJ; SHELAT, 2018). Além de fungos como *Humicola anuginosa*, *Fusarium* spp., *Mucor* spp., *Aspergillus* spp., *Rhizopus oryzae*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Alternaria dianthicola*, *Curvularia* spp., *Penicillium* spp., *Trichoderma viridae*, *Macrophomina phaseolina* e *Hypocrea pseudokoningii* (CHANDRA *et al.*, 2020; PATEL, GAYATRIBEN B, 2020).

A triacilglicerol lipase catalisa a hidrólise de ligações de ésteres de glicerol, liberando diacilglicerol, monoacilglicerol e ácidos graxos livres. A carboxilesterase catalisam a hidrólise de ligações éster únicas, liberando ácidos graxos de baixa massa molar (CHANDRA *et al.*, 2020; SZYMCZAK *et al.*, 2021).

Entre essas enzimas a triacilglicerol lipase destaca-se pelo seu significativo potencial biotecnológico e pela crescente aplicação industrial (CHANDRA *et al.*, 2020; SZYMCZAK *et al.*, 2021). Nas indústrias de alimentos e farmacêutica, desempenha um papel crucial na manipulação das propriedades sensoriais dos produtos finais, influenciando diretamente o aroma e o sabor. Por meio de sua atividade catalítica seletiva, é empregada para ajustar nuances sensoriais desejadas, atendendo às demandas específicas dos consumidores e contribuindo para a excelência na formulação de alimentos e medicamentos (LÓPEZ-FERNÁNDEZ; BENAIGES; VALERO, 2020).

2.2.5 Protease

As enzimas proteases catalisam a hidrólise de proteínas em peptídeos e aminoácidos. Pertencendo à classe das hidrolases (EC 3) e subclasse das peptidases (EC 3.4), essas enzimas são classificadas conforme a posição da ligação peptídica a ser clivada na cadeia peptídica em endopeptidases e exopeptidases (SHARMA, MAYURI *et al.*, 2019). Conforme descrito na literatura, as proteases são produzidas por bactérias, como *Acetobacter orientalis*, *Acinetobacter* spp., *Bacillus* spp., *Beijerinckia fluminensis*, *Corynebacterium alkanolyticum*, *Streptomyces* spp., *Enterococcus hirae* e *Pseudomonas*

aeruginosa. E fungos como *Aspergillus niger*, *Aspergillus clavatus* ES1, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus Fumigates*, *Aspergillus melleus*, *Aspergillus nidulans* HA-10, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus oryzae*, *Cephalosporium spp.*, *Fusarium spp.*, *Rhizopus spp.* e *Penicillium italicum* (BANERJEE *et al.*, 2016; CHEN *et al.*, 2021; MANNI; FILALI-MALTOUF, 2022; NAVEED *et al.*, 2021; RAMANUJ; SHELAT, 2018; SOLANKI *et al.*, 2021).

As endopeptidases catalisam a hidrólise de ligações peptídicas dos aminoácidos dentro da proteína, liberando peptídeos mais curtos. Entre essas enzimas destacam-se as subtilisina (EC 3.4.21.62) e collagenase microbiana (EC 3.4.24.3), que compartilham um mecanismo de ação semelhante (BAYKARA; SÜRMELI; ŞANLI-MOHAMED, 2021; DONG; YANG; LEE, 2021; KIELISZEK *et al.*, 2021; SHARMA, YASHASWINI; FAGAN; SCHAEFER, 2019).

A subtilisina catalisa a hidrólise de ligações peptídicas com ampla especificidade e com uma preferência por um resíduo de aminoácido grande na extremidade terminal amino (N-terminal), além de catalisar a hidrólise de amidas peptídicas (KHAN, ZAHOR *et al.*, 2022; KUMARI *et al.*, 2021). A collagenase microbiana catalisa a hidrólise do colágeno nativo em fragmentos pequenos, nas regiões tripla helicoidais nas ligações peptídicas de preferência da glicina (HARAZONO; ATSUMI; SHIRASAKA, 2020).

Essas enzimas possuem significativo potencial biotecnológico e crescente aplicação industrial. A subtilisina é considerada com potencial aplicação em uma variedade de processos industriais. Na indústria de alimentos catalisa a hidrólise de ligações peptídicas na rede do glúten melhorando a reologia da massa e a hidrólise de proteínas do soro de leite, realçando o sabor dos produtos (LAMBRÉ *et al.*, 2024). Na indústria de detergentes é atua como aditivo, catalisa a hidrólise de compostos que possuem queratina em sua composição, contribuindo para a remoção de manchas (SUJITHA; SHANTHI, 2023).

A collagenase microbiana é considera com potencial aplicação em uma variedade de processos industriais. Na indústria de alimentos catalisa a hidrólise de colágeno e elastina, além de degradar as proteínas do músculo, como actina e miosina, contribuindo para o amaciamento da carne (HARAZONO; ATSUMI; SHIRASAKA, 2020). Nas indústrias de cosméticos e farmacêutica atua como agente desbridante enzimático para o tratamento de lesões da pele, auxiliando no processo de cicatrização (AVILA-RODRÍGUEZ *et al.*, 2020).

As exopeptidases catalisam a hidrólise de ligações peptídicas nas extremidades C-terminal ou N-terminal, liberando aminoácidos ou dipeptídeos ou tripeptídeos (SHARMA, YASHASWINI; FAGAN; SCHAEFER, 2019). Destaca-se entre essas enzimas a xaa-pro aminopeptidase (EC 3.4.11.9) e metionil aminopeptidase (EC 3.4.11.18), classificadas conforme o número de aminoácidos liberados de um peptídeo ou proteína e se isso ocorre no C-terminal ou N-terminal (DONG; YANG; LEE, 2021; RAWLINGS, 2020; SHARMA, YASHASWINI; FAGAN; SCHAEFER, 2019).

A xaa-pro aminopeptidase catalisa a hidrólise de ligações peptídicas N-terminal, liberando prolina e a metionil aminopeptidase catalisa a hidrólise de ligações peptídicas N-terminal, liberando metionina (DONG; YANG; LEE, 2021).

Entre essas enzimas a metionil aminopeptidase destaca-se pelo seu significativo potencial biotecnológico e pela crescente aplicação industrial (DONG; YANG; LEE, 2021; RAWLINGS, 2020; SHARMA, YASHASWINI; FAGAN; SCHAEFER, 2019). Essa enzima é considerada promissora para a indústria farmacêutica, onde é utilizada no desenvolvimento de medicamentos antibacterianos e antifúngicos de amplo espectro. A metionil aminopeptidase auxilia na modificação pós-tradução, estabilidade e localização das proteínas e polipeptídeos recém-sintetizados, desempenhando um papel crucial nesses processos. Além de seu uso em tratamentos antibacterianos e antifúngicos, a metionil aminopeptidase tem sido amplamente investigada por seu potencial no desenvolvimento de medicamentos anticancerígenos e anti-reumatóides (EKPENYONG *et al.*, 2020).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Isolar e identificar bactérias hidrolíticas com potencial biotecnológico em três modelos diferentes de biorreatores anaeróbios, Batelada, *UASB* e Lagoa Coberta, operados com substratos como dejetos bovinos e caldo de capim-elefante, com o intuito de explorar diferentes fontes de isolamento, contribuindo para o desenvolvimento de biotecnologias sustentáveis.

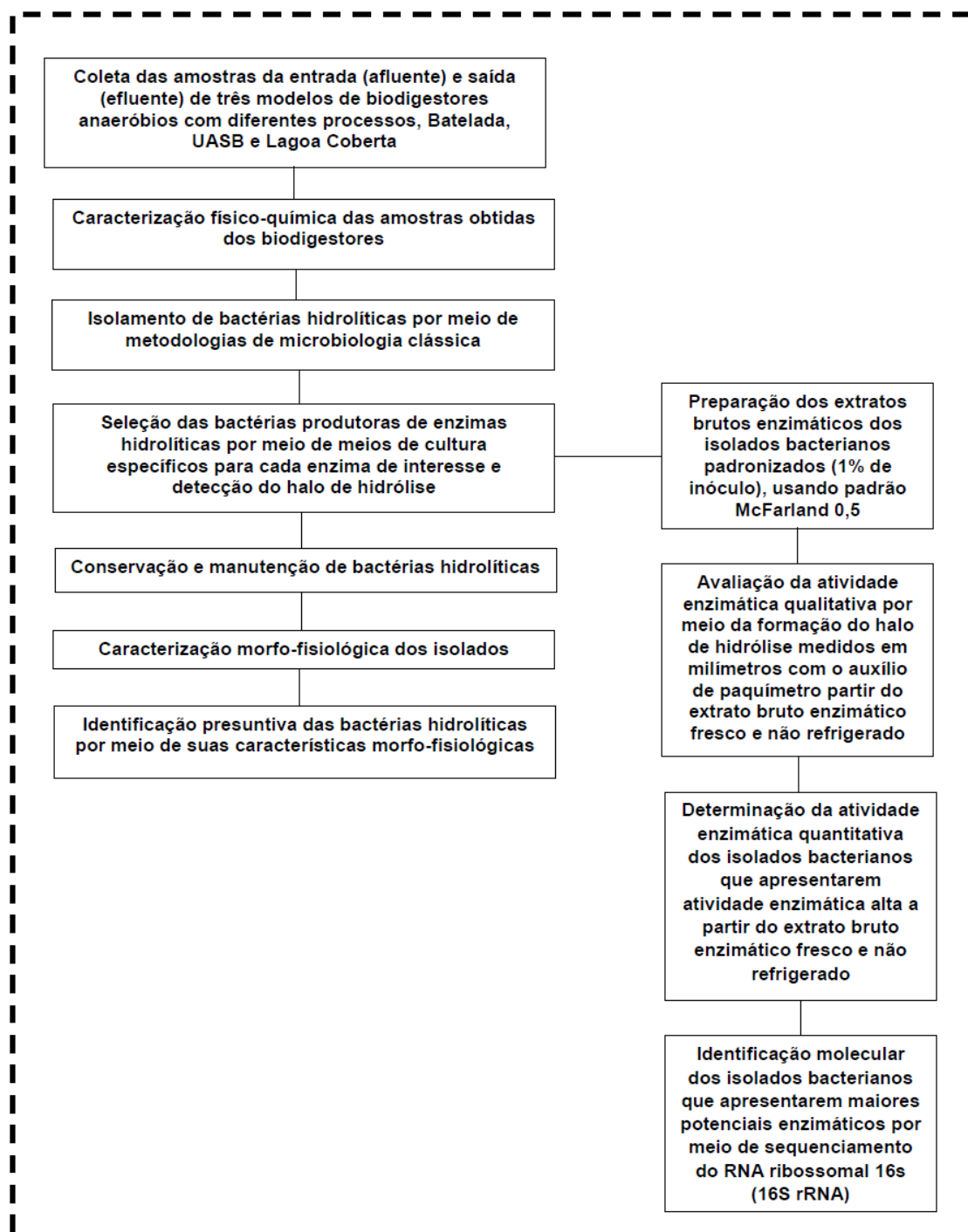
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Coletar amostras de entrada (afluente) e de saída (efluente) dos três modelos diferentes de biorreatores anaeróbios (Batelada, *UASB* e Lagoa Coberta) para processamento microbiológico;
- Isolar e identificar bactérias hidrolíticas com potencial biotecnológico, avaliando suas características morfofisiológicas e bioquímicas;
- Avaliar o potencial qualitativo e quantitativo de produção das enzimas amilase, celulase, xilanase, lipase e protease por bactérias hidrolíticas isoladas;
- Identificar, por meio de técnicas moleculares as bactérias hidrolíticas produtoras dessas enzimas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi conduzido seguindo uma sequência estruturada de atividades (Fluxograma 1).

Fluxograma 1 - *Screening* e potencial de produção enzimática de bactérias hidrolíticas em biorreatores anaeróbios



Fonte: Elaborada pela autora (2024).

4.1 COLETA DE AMOSTRAS E OPERAÇÃO DOS BIORREATORES

As amostras para o isolamento das bactérias produtoras de enzimas hidrolíticas foram coletadas nos pontos de entrada (afluente) e saída (efluente) de três diferentes modelos de biorreatores anaeróbios: Batelada, *UASB*, e Lagoa Coberta (Tabela 6). No total, foram processadas 34 amostras, sendo 17 do afluente e 17 do efluente. O pH das amostras foi determinado utilizando um pHmetro Tecnal, modelo Tec-3MP, com três repetições para cada amostra. Os substratos utilizados para a operação dos biorreatores foram coletados na fazenda experimental da Embrapa Gado de Leite, em Coronel Pacheco, MG, Brasil. O manejo alimentar das oitenta vacas seguiu uma dieta balanceada, composta por concentrado (mistura de 60% de grãos de milho, 36% de grãos de soja, 3% de núcleo mineral e 1% de ureia), além de silagem de milho, pastagem e sal mineral. A administração dessa dieta foi feita com dosagens diárias de 3,5 kg de concentrado, 20 kg de silagem de milho, 40 kg de pastagem e 150 g de sal mineral por animal.

Tabela 6 – Operação dos três modelos de biorreatores anaeróbios

Experimentos	Modelo de biorreator	Bioprocesso	Substratos
1	Batelada	Co-digestão anaeróbia	Dejeto bovino leiteiro + Caldo de capim-elefante
2	<i>UASB</i>	Co-digestão anaeróbia	Dejeto bovino leiteiro + Caldo de capim-elefante
3	Lagoa Coberta	Biodigestão anaeróbia	Dejeto bovino leiteiro

Fonte: Elaborado pela autora (2024).

Dejeto bovino leiteiro: esterco de vacas Girolando + água de lavagem do piso free-stall do sistema de produção de leite; *Caldo de capim-elefante*: extraído do genótipo BRS Capiçu.

O Experimento 1 foi conduzido em um biorreator Batelada de 100 mL, com um volume ativo de 60 mL, operando em escala laboratorial no Laboratório de Microbiologia do Rúmen, na sede da EMBRAPA Gado de Leite, em Juiz de Fora, MG, Brasil (Figura 5). O biorreator foi mantido em operação durante 30 dias, sendo alimentado em uma única carga, em uma mesa agitadora Tecnal TE-420,

a uma velocidade de 100 rpm ao longo de todo o processo de CA. Durante o experimento, o biorreator funcionou a duas temperaturas: 25 °C, com uma carga orgânica de 36,762 kg m⁻³ e 39 °C, com uma carga orgânica de 38,902 kg m⁻³. O controle de temperatura foi realizado pela mesa agitadora, que assegurou condições adequadas durante todo o experimento. Ao longo do período experimental, foram coletadas quatro amostras, duas do afluente e duas do efluente, sendo uma amostra de cada coletada no início e outra no final do experimento.

Figura 5 - Biorreator Batelada



Fonte: Elaborado pela autora (2024).

O Experimento 2 foi conduzido em um biorreator *UASB* de fluxo ascendente, com capacidade total de 9800 mL e volume útil de 7800 mL, operando em escala laboratorial no Laboratório de Microbiologia do Rúmen da EMBRAPA Gado de Leite, em Juiz de Fora, MG, Brasil (Figura 6). O biorreator possuía uma camisa de recirculação de água para manter a temperatura de operação no cilindro central a 37°C. A alimentação foi realizada de forma semi-contínua, com fluxo ascendente, duas vezes ao dia (manhã e tarde), utilizando uma bomba peristáltica para controlar os diferentes tempos de retenção hidráulica (TRHs). Os TRHs testados incluíram: 10 dias com carga orgânica volumétrica de 2,55 kg SV m³ dia⁻¹, 6 dias com carga de 3,41 kg SV m³ dia⁻¹, 2 dias com carga de 10,50 kg SV m³ dia⁻¹, e 24 horas com carga de 22,27 kg SV m³ dia⁻¹. A temperatura foi monitorada com um termômetro digital da marca

Incoterm. O experimento foi realizado em duplicata, e em cada condição foram coletadas duas amostras, totalizando 16 amostras: oito do afluente e oito do efluente.

Figura 6 - Biorreator *UASB*



Fonte: Elaborado pela autora (2024).

O Experimento 3 foi realizado em um biorreator do tipo Lagoa Coberta, com capacidade de 250 m³, operando continuamente em temperatura ambiente na fazenda experimental da EMBRAPA Gado de Leite, localizada em Coronel Pacheco, MG, Brasil (Figura 7). O biorreator funcionou durante o inverno, com carga orgânica variando entre 114 e 294 kg de DQO dia⁻¹ (MENDONÇA; OMETTO; OTENIO, 2017). A temperatura ambiente foi monitorada na estação meteorológica convencional do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET), situada em Coronel Pacheco, MG, Brasil. Durante o período de estudo, a temperatura variou entre 17 e 20°C. As amostras de afluente foram coletadas da água de lavagem do piso free-stall, seguindo a rotina de manejo de dejetos, antes do separador de sólidos. As amostras de efluente foram coletadas na saída do biorreator (CHERNICHARO, 1997). As coletas foram realizadas semanalmente, no período de junho a agosto de 2022, totalizando sete coletas, com 14 amostras ao todo: sete do afluente e sete do efluente. As amostras foram transportadas de forma asséptica em caixas térmicas até o Laboratório de

Microbiologia do Rúmen, onde foram isoladas as bactérias produtoras de enzimas hidrolíticas.

Figura 7 - Biorreator Lagoa Coberta



Fonte: Elaborado pela autora (2024).

4.2 ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS PRODUTORAS DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS

As bactérias hidrolíticas foram isoladas utilizando métodos de microbiologia clássica, no mesmo dia em que as amostras de afluente e efluente foram coletadas. O processo de isolamento foi realizado por meio do método de diluição seriada em solução salina a 0,90% de cloreto de sódio (NaCl) (Vetec), conforme descrito por Manni; Filali-maltouf (2022). As diluições foram preparadas nas seguintes concentrações: 10^{-2} para bactérias anaeróbias e 10^{-4} e 10^{-5} para bactérias aeróbias.

Para garantir uma distribuição uniforme da amostra, as diluições foram homogeneizadas em agitador Vortex VX-35 (Satra). Em seguida, alíquotas de 0,1 mL de cada diluição foram semeadas com auxílio de alça de Drigalsky, em duplicata em placas de Petri contendo meios de cultivo estéreis, com substratos específicos para bactérias produtoras de amilase, celulase, xilanase, lipase e protease. As placas foram incubadas em condições de aerobiose e anaerobiose

em uma estufa bacteriológica Tecnal TE-392/2 (Tabela 7). Para as bactérias anaeróbias, a incubação foi realizada em jarras para anaerobiose Probac (D'ROSE; JOHNY; BHAT, 2019; MANNI; FILALI-MALTOUF, 2022).

Tabela 7 - Meios de cultivo específicos para bactérias hidrolíticas

Produção de enzimas	Meios de cultivo específicos	Substratos específicos	Condições de incubação	Referências
Amilase	Ágar Amido	Amido 5 g L ⁻¹	37 °C por 48 horas	(D'ROSE; JOHNY; BHAT, 2019; MOHAN <i>et al.</i> , 2019; NAVABHARATH <i>et al.</i> , 2017)
Celulase	Ágar Carboximetilcelulose	Carboximetilcelulose 2 g L ⁻¹	30 °C por 72 horas	(AHMED; BABALOLA; MCKAY, 2018; NAVABHARATH <i>et al.</i> , 2017; SINHA <i>et al.</i> , 2021)
Xilanase	Ágar Xilano	Xilano 10 g L ⁻¹	30 °C por 72 horas	(AHMED; BABALOLA; MCKAY, 2018; NAVABHARATH <i>et al.</i> , 2017; SINHA <i>et al.</i> , 2021)
Lipase	Ágar Tributirina	Tributirina 10 mL L ⁻¹	37 °C por 24 horas	(SINGH, M. G.; CHANDRAVEER; TRIPATHI, 2017)
Protease	<i>Skim Milk Ágar</i>	Caseína 5 g L ⁻¹	36 °C por 48 horas	(ABRAR HAMZA, 2018)

Fonte: Elaborado pela autora (2024).

4.3 SELEÇÃO DAS BACTÉRIAS PRODUTORAS DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS

4.3.1. Seleção de bactérias produtoras de amilase

As bactérias produtoras de amilase foram selecionadas com base na sua capacidade de hidrolisar amido em meio de cultivo Ágar Amido pH 7,00 (Tabela 8) (D'ROSE; JOHNY; BHAT, 2019; MOHAN *et al.*, 2019; NAVABHARATH *et al.*, 2017). Após a incubação as placas foram observadas quanto à formação do halo de hidrólise ao redor das colônias, o que indicou a produção de amilase (ABDENACEUR *et al.*, 2022; D'ROSE; JOHNY; BHAT, 2019).

Tabela 8 – Composição do meio de cultivo Ágar Amido

Componentes	Quantidade (g L ⁻¹)	Fabricante
Amido Solúvel, P.A	5,00	Vetec
Peptona de carne, bacteriológico	5,00	Sigma-Aldrich
NaCl	5,00	Vetec
Extrato de levedura	3,00	Biobrás
Ágar bacteriológico	20,00	ACS

Fonte: Adaptado de D'ROSE; JOHNY; BHAT (2019); NAVABHARATH *et al.* (2017).

O halo de hidrólise foi detectado pela adição de uma solução de iodo, que serve como indicador da integridade do amido. Essa solução foi preparada com 1 g de iodeto de potássio (Reagen) e 0,50 g de iodo (Reagen) diluídos em 100 mL de água destilada (ABDENACEUR *et al.*, 2022). A solução, na quantidade de 15 mL, foi aplicada sobre as placas e mantida por 15 minutos. Após esse período, o excesso da solução foi cuidadosamente removido. Para eliminar qualquer resíduo de corante, uma solução salina de NaCl a 1 M, também na quantidade de 15 mL, foi aplicada e mantida em contato com as placas por mais 15 minutos (D'ROSE; JOHNY; BHAT, 2019; HERNÁNDEZ-MELCHOR *et al.*, 2022).

4.3.2 Seleção de bactérias produtoras de celulase

As bactérias produtoras de celulase foram selecionadas com base na sua capacidade de hidrolisar celulose e hemicelulose em meio de cultivo Ágar

Carboximetilcelulose (CMC) pH 6,50 – 8,00 (Tabela 9) (AHMED; BABALOLA; MCKAY, 2018; NAVABHARATH *et al.*, 2017; SINHA *et al.*, 2021). Após a incubação as placas foram observadas quanto à formação do halo de hidrólise ao redor das colônias, o que indicou a produção de celulase (AHMED; BABALOLA; MCKAY, 2018).

Tabela 9 – Composição do meio de cultivo Ágar Carboximetilcelulose

Componentes	Quantidade (g L ⁻¹)	Fabricante
CMC	2,00	Synth
Nitrato de sódio	1,00	Synth
Fosfato de potássio (K ₂ HPO ₄)	1,00	Vetec
Cloreto de potássio	1,00	Vetec
Sulfato de magnésio (MgSO ₄)	0,50	Vetec
Sulfato de ferro (II)	0,01	Vetec
Extrato de levedura	5,00	Biobrás
Ágar bacteriológico	20,00	ACS Científica

Fonte: Adaptado de AHMED; BABALOLA; MCKAY (2018); NAVABHARATH *et al.* (2017); SINHA *et al.* (2021).

O halo de hidrólise foi detectado pela adição de uma solução de vermelho do congo (1 mg mL⁻¹) (HERNÁNDEZ-MELCHOR *et al.*, 2022). A solução de vermelho do congo (15 mL) foi aplicada às placas durante 15 minutos. A solução, na quantidade de 15 mL, foi aplicada sobre as placas e mantida por 15 minutos. Após esse período, o excesso da solução foi cuidadosamente removido. Para eliminar qualquer resíduo de corante, uma solução salina de NaCl a 1 M, também na quantidade de 15 mL, foi aplicada e mantida em contato com as placas por mais 15 minutos (D'ROSE; JOHNY; BHAT, 2019; HERNÁNDEZ-MELCHOR *et al.*, 2022).

4.3.3 Seleção de bactérias produtoras de xilanase

As bactérias produtoras de xilanase foram selecionadas com base na sua capacidade de hidrolisar xilana em meio de cultivo Ágar Xilano pH 6,50 – 8,00 (Tabela 10) (AHMED; BABALOLA; MCKAY, 2018; NAVABHARATH *et al.*, 2017; SINHA *et al.*, 2021). Após a incubação as placas foram observadas quanto à

formação do halo de hidrólise ao redor das colônias, o que indicou a produção de xilanase (AHMED; BABALOLA; MCKAY, 2018).

Tabela 10 – Composição do meio de cultivo Ágar Xilano

Componentes	Quantidade (g L ⁻¹)	Fabricante
Xilano	10,00	Sigma-Aldrich
Extrato de levedura	0,10	Biobrás
Peptona de carne, bacteriológico	0,50	Sigma-Aldrich
K ₂ HPO ₄	0,10	Vetec
MgSO ₄	0,02	Vetec
Ágar bacteriológico	20,00	ACS

Fonte: Adaptado de AHMED; BABALOLA; MCKAY (2018); NAVABHARATH *et al.* (2017); SINHA *et al.* (2021).

O halo de hidrólise foi detectado pela adição de uma solução de vermelho do congo (1 mg mL⁻¹) (HERNÁNDEZ-MELCHOR *et al.*, 2022). A solução de vermelho do congo (15 mL) foi aplicada às placas durante 15 minutos. A solução, na quantidade de 15 mL, foi aplicada sobre as placas e mantida por 15 minutos. Após esse período, o excesso da solução foi cuidadosamente removido. Para eliminar qualquer resíduo de corante, uma solução salina de NaCl a 1 M, também na quantidade de 15 mL, foi aplicada e mantida em contato com as placas por mais 15 minutos (D'ROSE; JOHNY; BHAT, 2019; HERNÁNDEZ-MELCHOR *et al.*, 2022).

4.3.4 Seleção de bactérias hidrolíticas produtoras de lipase

As bactérias produtoras de lipase foram selecionadas com base na sua capacidade de hidrolisar triacilgliceróis em meio de cultivo Ágar Base Tributirina (Himedia) pH 7,00, suplementado com Tributirina (10 mL L⁻¹). Após a incubação as placas foram observadas quanto à formação do halo de hidrólise ao redor das colônias, o que indicou a produção de lipase (SINGH, M. G.; CHANDRAVEER; TRIPATHI, 2017).

4.3.5 Seleção de bactérias hidrolíticas produtoras de protease

As bactérias produtoras de protease foram identificadas selecionadas com base na sua capacidade de hidrolisar caseína em meio de cultivo *Skim Milk Ágar* (Neogen) pH 7,00 ($\pm 0,20$). Após a incubação as placas foram observadas quanto à formação do halo de hidrólise ao redor das colônias, o que indicou a produção de protease (ABRAR HAMZA, 2018).

4.4 CONSERVAÇÃO E MANUTENÇÃO DE BACTÉRIAS HIDROLÍTICAS

A conservação e manutenção de bactérias produtoras de amilase, celulase, xilanase, lipase e protease foi realizada em Brain Heart Infusion Broth (BHI) contendo glicerol 40% (ANDREE *et al.*, 2021). As amostras foram armazenadas em duplicata a -20°C .

4.5 CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA

As bactérias produtoras de amilase, celulase, xilanase, lipase e protease foram identificadas com base em suas características morfofisiológicas (AHMED; BABALOLA; MCKAY, 2018). Esses isolados foram subcultivados em placas de Petri contendo meio de cultivo estéril BHI Ágar e incubados a 36°C por 48 horas, sob condições de aerobiose ou anaerobiose, conforme as características do isolamento original. Após o período de incubação e crescimento, as culturas microbianas foram submetidas ao processamento necessário para a caracterização morfofisiológica.

A cor e o formato das colônias foram analisados em meios de cultivo específicos para bactérias hidrolíticas (Tabela 7). A caracterização das colônias bacterianas, baseada na composição química da parede celular, foi realizada utilizando o método de coloração de Gram (RATHAKRISHNAN; GOPALAN, 2022). Após essa caracterização inicial, as colônias foram submetidas à avaliação de seu perfil metabólico (YOUNAS *et al.*, 2023). Testes bioquímicos específicos foram aplicados tanto para bactérias Gram-negativas quanto para Gram-positivas (Tabela 11) (ADEYEMI *et al.*, 2023).

Tabela 11 – Testes bioquímicos com base na diferença da composição química da parede celular das bactérias isoladas

Bactérias Gram-negativas	Bactérias Gram-positivas
Catalase	Bile Esculina
Citrato	Catalase
Fermentação de glicose	Crescimento em NaCl 5%
Fermentação de lactose	Crescimento em NaCl 6,50%
Indol	Fermentação de glicose
	Manitol
Oxidase	Motilidade
	Oxidase
Produção de sulfeto de hidrogênio	Redução do nitrato
	Urease

Fonte: Adaptado de ADEYEMI *et al.* (2023); BERGEY; HOLT (2000); BRASIL (2013).

4.5.1 Coloração de Gram

A coloração de Gram foi realizada para diferenciar as bactérias em Gram-positivas e Gram-negativas. Após a fixação das amostras em lâminas, essas foram submetidas ao processo de coloração, que incluiu a aplicação de cristal violeta, lugol, álcool-acetona para descoloração e, finalmente, a aplicação de safranina como contracorante (BEVERIDGE, 2001; DA SILVA *et al.*, 2018). As lâminas foram então observadas ao microscópio óptico utilizando objetiva de imersão de 100x para a visualização das bactérias. As bactérias Gram-negativas apresentaram coloração rosa devido à retenção da safranina após a descoloração, enquanto as células Gram-positivas mantiveram a coloração roxa do cristal violeta, indicando a integridade de sua parede celular espessa (RATHAKRISHNAN; GOPALAN, 2022).

4.5.2 Teste da bile esculina

A capacidade das bactérias de hidrolisar esculina, formando glicose e esculetina, foi avaliada utilizando o meio Ágar Bile Esculina (Oxoid). Para isso, colônias bacterianas foram inoculadas em placas de Petri contendo o meio estéril, seguido de incubação a 37 °C por 24 horas. O crescimento bacteriano na

presença de sais biliares indica que as bactérias são capazes de tolerar essas condições, sugerindo um resultado positivo para o teste. A hidrólise da esculina libera esculetina, que reage com os íons férricos presentes no meio, resultando na formação de um complexo de coloração preta, caracterizando a positividade para bile esculina. As bactérias com essa característica foram classificadas como bile esculina positivas (ABDULRAZZAQ; FAISAL, 2022).

4.5.3 Teste da catalase

A atividade da enzima catalase foi avaliada pela degradação do peróxido de hidrogênio. Para isso, colônias bacterianas foram transferidas para lâminas estéreis, seguidas da adição de uma gota de peróxido de hidrogênio a 3% (p/v) (Ever). A reação foi observada dentro de 60 segundos. A catalase converte o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, resultando na liberação de bolhas, o que indica um resultado positivo para a presença da enzima. A interpretação dos resultados foi baseada na formação de bolhas, que evidenciaram a liberação de oxigênio durante a reação (SINGH, BALWINDER *et al.*, 2016).

4.5.4 Teste do citrato

A capacidade das bactérias de utilizar o citrato como única fonte de carbono foi avaliada utilizando o meio de cultivo Ágar Citrato de Simmons (Kasvi). Colônias bacterianas foram inoculadas em tubos estéreis contendo o meio de cultivo e incubadas a 36 °C por um período de 24 a 48 horas. Bactérias capazes de metabolizar o citrato apresentam crescimento no meio de cultivo, acompanhado pela alcalinização do mesmo, evidenciada pela mudança de cor do indicador de pH presente no ágar. O meio de cultivo, que inicialmente apresentava coloração verde, mudou para azul intenso, confirmando a utilização do citrato como única fonte de carbono (HADI *et al.*, 2019).

4.5.5 Teste de crescimento em cloreto de sódio 5%

O teste de crescimento em NaCl 5% tem como objetivo avaliar a capacidade das bactérias de se desenvolverem em um meio com essa

concentração de sal. Para isso, a capacidade de crescimento bacteriano foi avaliada utilizando uma solução salina de NaCl 5%, adaptada do protocolo descrito por Omotoyinbo; Omotoyinbo (2016). Colônias bacterianas foram inoculadas em tubos estéreis contendo a solução e incubadas a 37 °C por um período de 24 a 48 horas. O crescimento bacteriano foi avaliado pela turvação da solução salina. A presença de turvação indica que a bactéria consegue se desenvolver em um meio com essa concentração de sal. A ausência de turvação, por outro lado, sugere que a bactéria não consegue se desenvolver nessa condição.

4.5.6 Teste de crescimento em cloreto de sódio 6,5%

O teste de crescimento em NaCl 6,50% tem como objetivo avaliar a capacidade das bactérias de se desenvolverem em um meio com essa concentração de sal. Para isso, a capacidade de crescimento bacteriano foi avaliada utilizando uma solução salina de NaCl 6,50%, adaptada do protocolo descrito por OMOTOYINBO; OMOTOYINBO (2016). Colônias bacterianas foram inoculadas em tubos estéreis contendo a solução e incubadas a 37 °C por um período de 24 a 48 horas. O crescimento bacteriano foi avaliado pela turvação da solução salina. A presença de turvação indica que a bactéria consegue se desenvolver em um meio com essa concentração de sal. A ausência de turvação, por outro lado, sugere que a bactéria não consegue se desenvolver nessa condição.

4.5.7 Teste de fermentação de glicose

A capacidade das bactérias de fermentar glicose foi avaliada pela inoculação das colônias em placas de Petri contendo meio de cultivo Triple Sugar Iron Ágar (TSI) estéril (Tabela 12). As placas foram incubadas a 37 °C por um período de 18 a 24 horas. Quando as bactérias fermentam glicose, ocorre acidificação do meio, resultando na mudança de cor do vermelho-alaranjado para amarelo, indicando a produção de ácidos (AKTER *et al.*, 2023; KIKUCHI *et al.*, 2022).

Tabela 12 – Composição do meio de cultivo Triple Sugar Iron Ágar

Componentes	Quantidade (g L ⁻¹)	Fabricante
Extrato de carne	3	Sigma
Extrato de levedura	3	Biobrás
Digestato pancreático de caseína	15	Himedia
Peptona de carne, bacteriológico	5	Sigma-Aldrich
Dextrose	1	Vetec
Lactose	10	CRQ
Sacarose	10	Proquímios
Sulfato ferroso	0,20	Vetec
NaCl	5	Vetec
Tiosulfato de sódio	0,30	Dinâmica
Agar bacteriológico	20	ACS
Vermelho Fenol	0,006	Synth

Fonte: Adaptado de AKTER *et al.* (2023); KIKUCHI *et al.* (2022).

4.5.8 Teste de fermentação de lactose

A capacidade das bactérias de fermentar lactose foi avaliada pela inoculação das colônias em placas de Petri contendo meio de cultivo MacConkey Ágar (Himedia) estéril. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas. Colônias de cor rósea indicam a fermentação da lactose, enquanto colônias incolores indicam a ausência de fermentação (DIMRI *et al.*, 2019).

4.5.9 Teste de produção de indol

A capacidade de produção de indol foi avaliada pela inoculação das colônias com uma agulha de platina em tubos estéreis contendo meio de cultivo Ágar Indol Sulfeto Motilidade (SIM) (Himedia). Os tubos foram incubados a 30 °C por 24 a 48 horas. Após a incubação, foram adicionadas cinco gotas de dicloridrato de N,N,N',N'-tetrametil-p-fenilenodiamina (TMPD), conhecido como Reagente de Kovacs (ACS), para detectar a produção de indol (SULISTIOWATI; SUDIN; HARMAIN, 2021). A formação de um anel vermelho na superfície do meio confirmou a produção de indol (PIETRANGELO *et al.*, 2021).

4.5.10 Teste de fermentação de manitol

A capacidade das bactérias de fermentar manitol foi avaliada pela inoculação das colônias em placas de Petri contendo meio de cultivo Ágar Sal Manitol (Himedia). As placas foram incubadas a 37 °C por 24 a 48 horas. A produção de ácidos orgânicos por bactérias que fermentam manitol resulta na acidificação do meio. Essa acidificação provoca uma alteração na cor do indicador de pH, o vermelho de fenol, que muda de vermelho para amarelo. A presença de colônias com coloração amarela indica um resultado positivo para a fermentação de manitol (ALMWAIFY *et al.*, 2020).

4.5.11 Teste da motilidade

A capacidade de motilidade das bactérias foi avaliada pela inoculação das colônias com uma agulha de platina em tubos estéreis contendo meio de cultivo Ágar SIM (Himedia). Os tubos foram incubados a 30 °C por 24 a 48 horas. (SULISTIOWATI; SUDIN; HARMAIN, 2021). A difusão do crescimento bacteriano além da linha de inoculação indica que as bactérias se moveram a partir do ponto de inoculação, resultando em um meio turvo ao redor dessa linha. Essa turvação sugere a presença de bactérias móveis, capazes de se deslocar pelo meio semi-sólido. Por outro lado, a ausência de difusão do crescimento além da linha de inoculação resulta em um meio que permanece claro ou apenas levemente turvo na área da inoculação. Essa falta de motilidade indica que as bactérias não possuem a capacidade de se mover (PIETRANGELO *et al.*, 2021).

4.5.12 Teste da oxidase

A capacidade de produção intracelular da enzima oxidase, no citocromo C pelas bactérias foi avaliada por método colorimétrico a partir da mistura de 5 gotas do Reagente de Kovacs com as colônias em lâminas estéreis (CHATEAU *et al.*, 2022; FALKE *et al.*, 2019; SHRIVASTAVA; SHARMA; SINGH, 2021). Na presença da oxidase esse reagente é oxidado produzindo coloração roxa indicando a positividade do teste (SHRIVASTAVA; SHARMA; SINGH, 2021).

4.5.13 Teste da Produção de sulfeto de hidrogênio

A capacidade de produção de sulfeto de hidrogênio (H_2S) pelas bactérias foi avaliada pela inoculação das colônias com uma agulha de platina em tubos estéreis contendo meio de cultivo Ágar SIM (Himedia). Os tubos foram incubados a 30 °C por 24 a 48 horas. (SULISTIOWATI; SUDIN; HARMAIN, 2021). A formação de um precipitado preto indica a produção de H_2S , resultado da reação do H_2S com íons metálicos presentes no meio de cultivo (PIETRANGELO *et al.*, 2021).

4.5.14 Teste de redução do nitrato

A capacidade das bactérias de reduzirem nitrato a nitrito foi avaliada pela inoculação das colônias com uma alça de platina em tubos estéreis contendo meio de cultivo Caldo Nitrato (Himedia). Os tubos foram incubados a 36 °C por 48 horas. Após a incubação foram adicionados em cada tubo, duas gotas de Reativo de Griess-Ilosvay (Solução A) e duas gotas de Reativo de Griess (Solução B). O desenvolvimento da cor marrom-avermelhada indica uma reação positiva (LIU, BO *et al.*, 2020).

O Reativo de Griess-Ilosvay foi composto por 0,50 g de ácido sulfanílico adicionado a 150 mL de CH_3COOH a 25%, enquanto o Reativo de Griess foi composto por 0,40 g de cloridrato de α -naftilamina adicionado a 150 mL de CH_3COOH a 25% (LIU, BO *et al.*, 2020).

4.5.15 Teste da urease

A capacidade das bactérias de hidrolisar ureia, resultando na formação de carbonato de amônia, foi avaliada por meio da inoculação das colônias em tubos estéreis contendo meio de cultivo de Ágar Ureia (Tabela 13). As colônias foram incubadas a 36 °C por um período de 18 a 24 horas em tubos estéreis. A hidrólise da ureia leva à alcalinização do meio de cultivo, o que é evidenciado pela mudança na coloração, que varia de amarelo claro para rosa avermelhada. Essa alteração de coloração indica que as bactérias testadas produziram amônia,

resultado da atividade da enzima urease que hidrolisa a ureia (BAGRIACIK *et al.*, 2021).

Tabela 13 – Composição do meio de cultivo Ágar Ureia

Componentes	Quantidade (g 100 mL ⁻¹)	Fabricante
Peptona de carne, bacteriológico	0,10	Sigma-Aldrich
NaCl	0,50	Vetec
K ₂ HPO ₄	0,20	Vetec
Sacarose	0,50	Proquímios
Ágar bacteriológico	1,80	ACS
Ureia	2,00	Química Moderna
Vermelho Fenol 0,1%	0,50	Synth

Fonte: Adaptado de BAGRIACIK *et al.* (2021).

4.6 IDENTIFICAÇÃO PRESUNTIVA DAS BACTÉRIAS HIDROLÍTICAS

As bactérias hidrolíticas isoladas foram identificadas com base em suas características morfofisiológicas de acordo com *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* e Módulo V, Detecção e Identificação de Bactérias de Importância Médica (LE, 2023).

4.7 ATIVIDADE ENZIMÁTICA QUALITATIVA

A avaliação da atividade enzimática qualitativa foi realizada dos isolados bacterianos que apresentaram halos de hidrólise durante a etapa de seleção das bactérias produtoras de enzimas hidrolíticas de interesse biotecnológico.

Esses isolados foram subcultivados em placas de Petri contendo meio de cultivo estéril BHI Ágar e incubados a 36 °C por 48 horas, sob condições de aerobiose ou anaerobiose, conforme as características do isolamento original. Após o período de incubação e crescimento, as culturas microbianas foram processadas para a obtenção do extrato bruto enzimático (sobrenadante livre de células). Esse extrato foi utilizado na análise da atividade enzimática qualitativa. (ATOLE *et al.*, 2020; HEYDARI *et al.*, 2020; SCARANO *et al.*, 2018).

4.7.1 Extrato bruto enzimático

O extrato bruto enzimático foi melhor obtido a partir das bactérias isoladas padronizadas em solução salina a 0,9% de NaCl (Vetec), utilizando o padrão de McFarland 0,5 (ATOLE *et al.*, 2020; BALLA *et al.*, 2022).

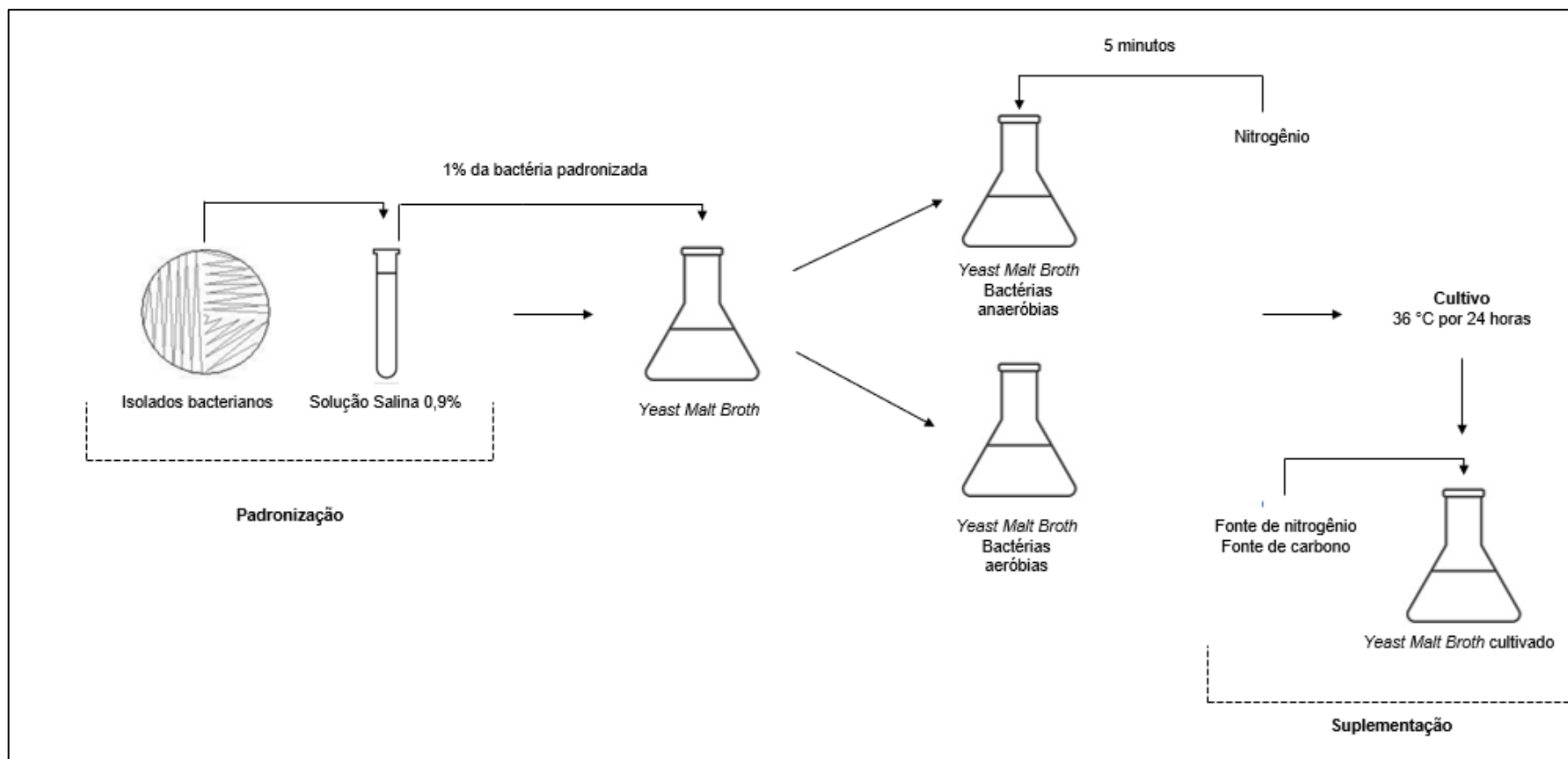
Em seguida, as células (1%) foram inoculadas em frascos Erlenmeyer contendo 50 mL de *Yeast Malt Broth* (YMB) suplementado com 10% de extrato de carne como fonte de nitrogênio e uma fonte de carbono específica para a produção da enzima de interesse (Tabela 14; Figura 8). Como branco, foi preparado um frasco contendo apenas 50 mL de YMB suplementado com as mesmas fontes de nitrogênio e carbono, sem a adição das células (DAS; ALI; RAHMAN, 2022).

Tabela 14 – Meios de Cultivo para as bactérias produtoras de enzimas hidrolíticas de interesse biotecnológico para obtenção do extrato bruto enzimático

Enzimas	Volume de <i>Yeast Malt Broth</i> (mL)	Fonte de carbono	Fonte de nitrogênio
Amilase	49	0,50 mL de amido (10%)	
Celulase	44,5	5 mL de CMC (1%)	
Xilanase	47	2,50 mL de xilano (2%)	
Lipase	49	0,50 mL de óleo de soja	
Protease	49	0,50 mL de caseína (10%)	0,5 mL Extrato de carne (10%)

Fonte: Adapto de DAS; ALI; RAHMAN (2022); HE *et al.* (2023); SHARMA; MALLICK; SHARMA (2018); SUN *et al.* (2020); ZHAO, JUNXIN *et al.* (2021).

Figura 8 – Procedimento para a obtenção do extrato bruto enzimático

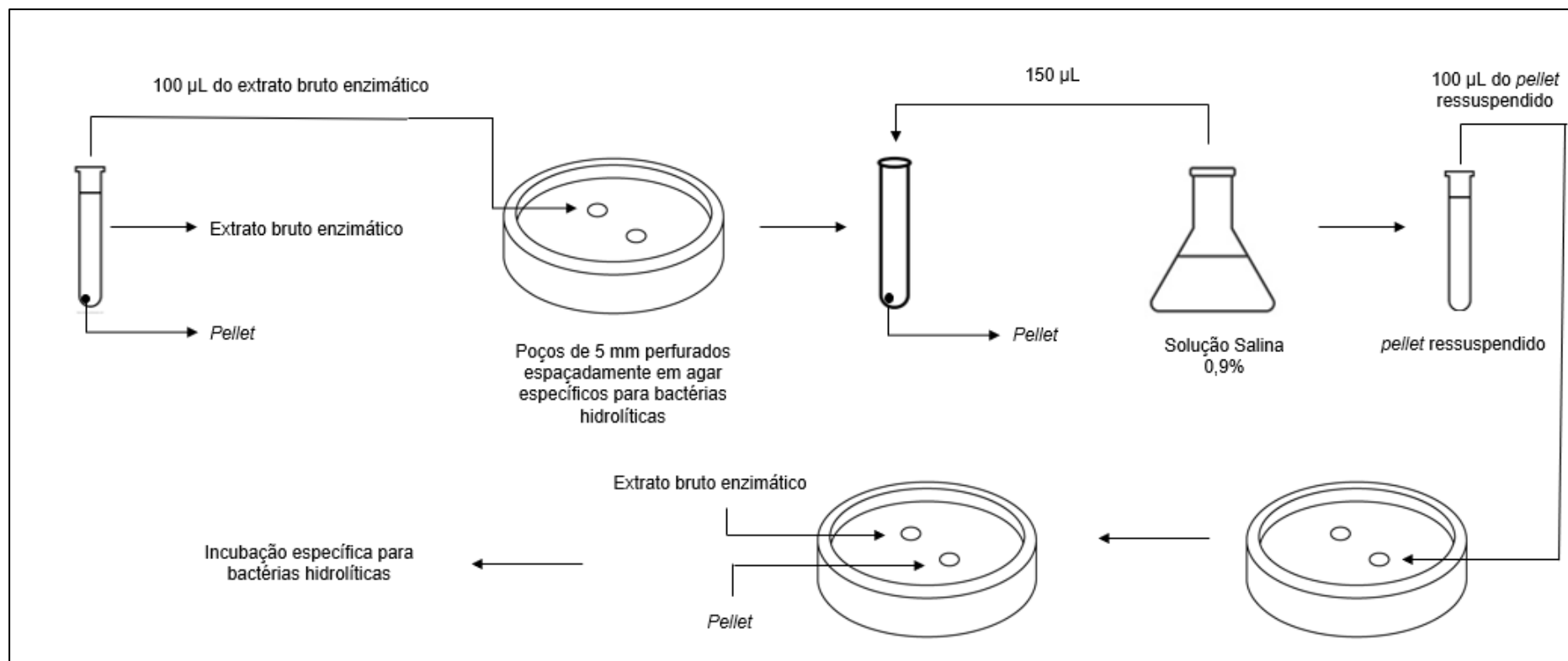


Fonte: Adaptado de ATOLE *et al.* (2020); BALLA *et al.* (2022); LIU, YU YING *et al.* (2022).

Os frascos contendo os cultivos bacterianos foram incubados sob agitação contínua a 150 rpm, utilizando uma mesa agitadora Tecnal TE-420 a 37 °C por um período de 72 horas (BALLA *et al.*, 2022; DAS; ALI; RAHMAN, 2022; DELI *et al.*, 2022).

Após o período de incubação, 30 mL do caldo de cultivo foi transferido para tubos de centrífuga estéreis e centrifugado a 11.951 RCF por 10 minutos, utilizando uma centrífuga Sorvall RC-5B Plus. O extrato enzimático bruto foi coletado para a realização das análises (Figura 9). A atividade enzimática qualitativa foi determinada utilizando o extrato fresco, sem refrigeração (BALLA *et al.*, 2022; DAS; ALI; RAHMAN, 2022; DELI *et al.*, 2022).

Figura 9 – Procedimento de análise para determinação da atividade enzimática qualitativa



Fonte: Adaptado de SINHA *et al.* (2021).

4.7.2 Determinação da atividade enzimática qualitativa

A atividade enzimática qualitativa foi determinada com base no cálculo do índice enzimático (Equação 1; Tabela 15) (DEWIYANTI *et al.*, 2022; USMAN; MOHAMMED; MAMO, 2021). O diâmetro dos halos de hidrólise e das colônias foram medidos em milímetros com o auxílio de paquímetro (COTTA *et al.*, 2021). Para enzimas cuja atividade não foi visualmente evidente, foram empregadas colorações específicas, para garantir a identificação precisa da atividade enzimática, conforme descrito no protocolo de seleção de bactérias produtoras de enzimas hidrolíticas de interesse biotecnológico.

$$\text{Índice enzimático} = \frac{\text{diâmetro do halo de hidrólise}}{\text{diâmetro da colônia}} \quad (1)$$

Tabela 15 – Atividade enzimática qualitativa com base no cálculo do índice enzimático

Índice enzimático	Atividade enzimática
≤ 1	Baixa
1 a 2	Média
≥ 2	Alta

Fonte: Adaptado de DEWIYANTI *et al.*, (2022).

4.8 ATIVIDADE ENZIMÁTICA QUANTITATIVA

A avaliação da atividade enzimática quantitativa foi realizada em bactérias produtoras de enzimas hidrolíticas de interesse biotecnológico, selecionadas com base em um índice enzimático iguais ou superiores 1, o que indica uma atividade enzimática de média a alta (ABRAR HAMZA, 2018).

Esses isolados foram subcultivados em placas de Petri contendo meio de cultivo estéril BHI Ágar e incubados a 36 °C por 48 horas, sob condições de aerobiose ou anaerobiose, conforme as características do isolamento original. Após o período de incubação e crescimento, as culturas microbianas foram processadas para a obtenção do extrato bruto enzimático, conforme descrito no

protocolo de extrato bruto enzimático (4.7.1) (ATOLE *et al.*, 2020; HEYDARI *et al.*, 2020; SCARANO *et al.*, 2018). A atividade enzimática quantitativa foi determinada a partir do extrato bruto enzimático fresco e não refrigerado. Para determinação dessa atividade o extrato bruto enzimático foi coletado e as impurezas filtradas por filtro seringa 0,45 µm (ATOLE *et al.*, 2020; ZANGO; IBRAHIM; SULEIMAN, 2021).

4.8.1 Determinação da atividade enzimática quantitativa da amilase

A atividade enzimática da amilase foi quantificada com base na liberação de açúcares redutores, utilizando o método colorimétrico do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (ATOLE *et al.*, 2020; NISA *et al.*, 2021). Esse método se baseia na capacidade do DNS de ser reduzido por açúcares redutores, como a maltose, resultando na formação do composto nitroamino análogo, ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, decorrente da oxidação dos monossacarídeos redutores. O produto dessa reação apresenta uma coloração avermelhada cuja intensidade é diretamente proporcional à concentração de maltose liberada durante a reação de hidrólise do amido, o que permite uma quantificação precisa da atividade enzimática da amilase (ATOLE *et al.*, 2020; NISA *et al.*, 2021).

Para a realização da reação, foi preparada uma mistura contendo 500 µL de extrato enzimático bruto filtrado e 500 µL de amido solúvel (substrato):tampão fosfato 0,20 M (pH 7,00), na proporção 1:100 (p/v) incubada a 37 °C por 30 minutos (NISA *et al.*, 2021). O controle negativo consistiu em uma mistura de 500 µL de extrato enzimático filtrado e 500 µL de tampão fosfato 0,20 M (pH 7,00), incubada sob as mesmas condições. O branco da reação foi composto por 500 µL de amido solúvel 1% (substrato):tampão fosfato 0,20 M (pH 7,00), na proporção 1:100 (p/v) e 500 µL de tampão fosfato 0,20 M (pH 7,00), incubado a 37 °C por 30 minutos ((DELI *et al.*, 2022; ZANGO; IBRAHIM; SULEIMAN, 2021).

Após a incubação, a reação foi interrompida pela adição de 2000 µL de DNS e aquecida em banho-maria a 100 °C por 5 minutos para promover a coloração. Em seguida, a mistura foi resfriada em banho de gelo por 5 minutos para estabilizar a reação (NISA *et al.*, 2021). O volume final das amostras foi ajustado para 5000 µL com água destilada e homogeneizado em agitador Vortex VX-35 (Satra) (ZANGO; IBRAHIM; SULEIMAN, 2021).

A quantificação dos açúcares redutores foi realizada utilizando um espectrofotômetro Cecil CE1010, ajustado para uma leitura em comprimento de onda a 540 nm. A atividade enzimática foi calculada com base na curva padrão da maltose, por meio da obtenção da equação da reta e do coeficiente de determinação (R^2). Os valores de absorbância das amostras foram convertidos em concentrações de maltose utilizando as equações derivadas da curva padrão (ZANGO; IBRAHIM; SULEIMAN, 2021).

A maltose liberada durante o ensaio foi convertida em atividade de amilase adaptada do protocolo descrito por USMAN; Mohammed; Mamo (2021) (Equação 2).

$$\text{Atividade da amilase (} U \text{ mL}^{-1} \text{)} = \frac{[\text{maltose}] * V_t}{V_a * \text{Treação} * V_e} \quad (2)$$

Onde:

[maltose] = concentração de açúcar produzido ($\mu\text{mol mL}^{-1}$)

V_t = volume total da reação (mistura reacional) (mL)

V_a = volume da amostra (extrato bruto enzimático filtrado) (mL)

Treação = tempo de reação enzimática (minutos)

V_e : volume do ensaio usado para medição de absorbância.

4.8.1.1 Curva padrão da maltose

A curva padrão da maltose foi elaborada a partir de uma solução padrão de maltose com concentração de $1,00 \text{ mg mL}^{-1}$, utilizando cinco concentrações diferentes variando de $0,07$ a $0,33 \text{ mg mL}^{-1}$, adaptado do protocolo descrito por ZANGO; IBRAHIM; SULEIMAN (2021).

A mistura de reação foi homogeneizada utilizando um agitador Vortex VX-35 e, em seguida, aquecida em banho-maria a 100°C por 5 minutos. Após esse período, a mistura foi resfriada em banho de gelo por 5 minutos. Em seguida, foram adicionados $5000 \mu\text{L}$ de água destilada, e a solução foi homogeneizada novamente (ZANGO; IBRAHIM; SULEIMAN, 2021).

A absorbância da amostra foi medida em um espectrofotômetro a um comprimento de onda de 540 nm (Anexo A - Tabela 20). A curva padrão foi

elaborada com base nos valores de absorvância de diferentes concentrações de maltose (Anexo A - Figura 8) (ZANGO; IBRAHIM; SULEIMAN, 2021).

4.8.2 Determinação da atividade enzimática quantitativa da celulase

A atividade enzimática da celulase foi quantificada com base na liberação de açúcares redutores, utilizando o método colorimétrico do DNS (ATOLE *et al.*, 2020; NISA *et al.*, 2021). Esse método se baseia na capacidade do DNS de ser reduzido açúcares redutores, como a glicose, resultando na formação do composto nitroamino análogo, ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, decorrente da oxidação dos monossacarídeos redutores. O produto dessa reação apresenta uma coloração avermelhada cuja intensidade é diretamente proporcional à concentração de glicose liberada durante a reação de hidrólise da celulose, o que permite uma quantificação precisa da atividade enzimática da celulase (ATOLE *et al.*, 2020; NISA *et al.*, 2021).

Para a realização da reação, foi preparada uma mistura contendo 500 µL de extrato enzimático bruto filtrado, 500 µL de CMC (substrato):tampão citrato 50 mM (pH 4,80), na proporção de 1:100 (p/v), incubada a 50 °C por 30 minutos adaptada do protocolo descrito por Atole *et al.* (2020); Deli *et al.* (2022); Nisa *et al.* (2021). O controle negativo consistiu em uma mistura de 500 µL de extrato enzimático filtrado e 500 µL de tampão citrato 50 mM (pH 4,80), incubada sob as mesmas condições. O branco da reação foi composto por 500 µL de CMC (substrato):tampão citrato 50 mM (pH 4,80), na proporção de 1:100 (p/v) e 500 µL de tampão citrato 50 mM (pH 4,80), incubado a 50 °C por 30 minutos. Tanto o controle negativo quanto o branco foram adaptados dos protocolos descritos por Deli *et al.* (2022) e Zango; Ibrahim; Suleiman (2021).

Após a incubação, a reação foi interrompida pela adição de 2000 µL de DNS e aquecida em banho-maria a 100 °C por 5 minutos para promover a coloração. Em seguida, a mistura foi resfriada em banho de gelo por 5 minutos para estabilizar a reação (NISA *et al.*, 2021). O volume final das amostras foi ajustado para 5000 µL com água destilada e homogeneizado em agitador Vortex VX-35 (Satra) (ZANGO; IBRAHIM; SULEIMAN, 2021).

A quantificação dos açúcares redutores foi realizada utilizando um espectrofotômetro Cecil CE1010, ajustado para uma leitura em comprimento de

onda a 540 nm (DELI *et al.*, 2022). A atividade enzimática foi calculada com base na curva padrão da glicose, por meio da obtenção da equação da reta e do R^2 (ATOLE *et al.*, 2020; DELI *et al.*, 2022). Os valores de absorbância das amostras foram convertidos em concentrações de glicose utilizando as equações derivadas da curva padrão (AHMED; BABALOLA; MCKAY, 2018; ATOLE *et al.*, 2020; CAMARGO *et al.*, 2020).

A glicose liberada durante o ensaio foi convertida em atividade de amilase adaptada do protocolo descrito por Usman; Mohammed; Mamo (2021) (Equação 3).

$$\text{Atividade da celulase (} U \text{ mL}^{-1} \text{)} = \frac{[\text{glicose}] * V_t}{V_a * \text{Treação} * V_e} \quad (3)$$

Onde:

[glicose] = concentração de açúcar produzido ($\mu\text{mol mL}^{-1}$)

V_t = volume total da reação (mistura reacional) (mL)

V_a = volume da amostra (extrato bruto enzimático filtrado) (mL)

Treação = tempo de reação enzimática (minutos)

V_e : volume do ensaio usado para medição de absorbância.

4.8.2.1 Curva padrão da glicose

A curva padrão da glicose foi elaborada a partir de uma solução padrão de glicose com concentração de $5,00 \text{ mg mL}^{-1}$, utilizando cinco concentrações diferentes variando $0,33$ a $1,67 \text{ mg mL}^{-1}$, adaptado do protocolo descrito por Deli *et al.* (2022).

A mistura de reação foi homogeneizada utilizando um agitador Vortex VX-35 e, em seguida, aquecida em banho-maria a 100°C por 5 minutos. Após esse período, a mistura foi resfriada em banho de gelo por 5 minutos. Em seguida, foram adicionados $5000 \mu\text{L}$ de água destilada, e a solução foi homogeneizada novamente no agitador Vortex VX-35 (Satra) (DELI *et al.*, 2022).

A absorbância da amostra foi medida em um espectrofotômetro a um comprimento de onda de 540 nm (Anexo A - Tabela 21). A curva padrão foi

elaborada com base nos valores de absorbância de diferentes concentrações de glicose (Anexo A - Figura 09) (DELI *et al.*, 2022).

4.8.3 Determinação da atividade da xilanase

A atividade enzimática da xilanase foi quantificada com base na liberação de açúcares redutores, utilizando o método colorimétrico do DNS (ATOLE *et al.*, 2020; NISA *et al.*, 2021). Esse método se baseia na capacidade do DNS de ser reduzido por açúcares redutores, como a xilose, resultando na formação do composto nitroamino análogo, ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, decorrente da oxidação dos monossacarídeos redutores. O produto dessa reação apresenta uma coloração avermelhada cuja intensidade é diretamente proporcional à concentração de xilano liberada durante a reação de hidrólise da celulose, o que permite uma quantificação precisa da atividade enzimática da xilanase (ARIAEENEJAD *et al.*, 2019; ATOLE *et al.*, 2020).

Para a realização da reação, foi preparada uma mistura contendo 100 µL de extrato bruto enzimático filtrado e 900 µL de xilano (substrato):tampão citrato 50 mM (pH 4,80), na proporção de 1:100 (p/v), incubada a 50 °C por 30 minutos, adaptado do protocolo descrito por Ariaeenejad *et al.* (2019). O controle negativo consistiu em uma mistura de 100 µL de extrato enzimático filtrado e 900 µL de tampão citrato 50 mM (pH 4,80), incubada sob as mesmas condições. O branco da reação foi composto por 900 µL de xilano (substrato):tampão citrato 50 mM (pH 4,80), na proporção de 1:100 (p/v) e 900 µL de tampão citrato 50 mM (pH 4,80), incubado a 50 °C por 30 minutos. Tanto o controle negativo quanto o branco foram adaptados do protocolo descrito por Ariaeenejad *et al.* (2019).

Após a incubação, a reação foi interrompida pela adição de 2000 µL de DNS e aquecida em banho-maria a 80 °C por 5 minutos para promover a coloração, adaptado do protocolo descrito por Ariaeenejad *et al.* (2019). Em seguida, a mistura foi resfriada em banho de gelo por 5 minutos para estabilizar a reação (NISA *et al.*, 2021). O volume final das amostras foi ajustado para 5000 µL com água destilada e homogeneizado em agitador Vortex VX-35 (ZANGO; IBRAHIM; SULEIMAN, 2021).

A quantificação dos açúcares redutores foi realizada utilizando um espectrofotômetro Cecil CE1010, ajustado para uma leitura em comprimento de

onda a 540 nm (ARIAEENEJAD *et al.*, 2019). A atividade enzimática foi calculada com base na curva padrão da xilose, por meio da obtenção da equação da reta e do R^2 (ARIAEENEJAD *et al.*, 2019; ATOLE *et al.*, 2020). Os valores de absorbância das amostras foram convertidos em concentrações de xilose utilizando as equações derivadas da curva padrão (ARIAEENEJAD *et al.*, 2019; ATOLE *et al.*, 2020).

A xilose liberada durante o ensaio foi convertida em atividade de xilanase adaptado do protocolo descrito por USMAN; MOHAMMED; MAMO (2021) (Equação 4).

$$\text{Atividade da celulase (} U \text{ mL}^{-1} \text{)} = \frac{[\text{xilose}] * V_t}{V_a * \text{Treação} * V_e} \quad (4)$$

Onde:

[xilose] = concentração de açúcar produzido ($\mu\text{mol mL}^{-1}$)

V_t = volume total da reação (mistura reacional) (mL)

V_a = volume da amostra (extrato bruto enzimático filtrado) (mL)

Treação = tempo de reação enzimática (minutos)

V_e : volume do ensaio usado para medição de absorbância.

4.8.3.1 Curva padrão da xilose

A curva padrão da xilose foi elaborada a partir de uma solução padrão de xilose com concentração de $1,00 \text{ mg mL}^{-1}$, utilizando cinco concentrações diferentes variando $0,03$ a $0,20 \text{ mg mL}^{-1}$, adaptado do protocolo descrito por Ariaeenejad *et al.* (2019).

A mistura de reação foi homogeneizada utilizando um agitador Vortex VX-35 (Satra) e, em seguida, aquecida em banho-maria a 80°C por 5 minutos. Após esse período, a mistura foi resfriada em banho de gelo por 5 minutos. Em seguida, foram adicionados $5000 \mu\text{L}$ de água destilada, e a solução foi homogeneizada novamente. O procedimento adaptado de DELI *et al.* (2022).

A absorbância da amostra foi medida em um espectrofotômetro a um comprimento de onda de 540 nm (Anexo A - Tabela 22). A curva padrão foi

elaborada com base nos valores de absorvância de diferentes concentrações de xilose (Anexo A - Figura 10) (ARIAEENEJAD *et al.*, 2019).

4.8.4 Determinação da atividade de lipase

A atividade enzimática da lipase foi quantificada utilizando o método colorimétrico. Esse método se baseia na capacidade da lipase de catalisar a hidrólise do p-nitrofenil butirato (pNPB), resultando na liberação do p-nitrofenol. O produto dessa reação apresenta uma coloração amarela cuja intensidade é diretamente proporcional à concentração de p-nitrofenol liberada durante a reação da hidrólise, o que permite uma quantificação precisa da atividade enzimática da lipase (RIOS *et al.*, 2019).

Para a realização da reação, foi preparada uma mistura contendo de 50 µL de extrato bruto enzimático filtrado, 50 µL de uma solução de pNPB 50 mM (substrato) e 2,50 mL de tampão fosfato de sódio 25 mM (pH 7,00) (RIOS *et al.*, 2019). A solução de pNPB 50 mM foi preparada a partir da dissolução de 10,46 mg pNPB 50 mM dissolvido 1 mL de acetonitrila: tampão fosfato de sódio 25 mM (pH 7,00), na proporção de 2:100 (v/v). Após a mistura da reação, foi iniciada uma agitação branda, evitando a formação de espuma, por 60 segundos. Após 90 segundos de reação, o valor de absorvância foi registrado para cálculo da atividade enzimática, adaptado do protocolo descrito por RIOS; NETO; SANTOS; *et al.* (2019). O controle negativo consistiu em uma mistura de 50 µL de extrato bruto enzimático filtrado e 2,50 mL de tampão fosfato de sódio 25 mM (pH 7,00), mantendo as mesmas condições da reação. O branco da reação foi composto por 50 µL de uma solução de pNPB 50 mM (substrato) e 2,50 mL de tampão fosfato de sódio 25 mM (pH 7,00), também sob as mesmas condições. Tanto o controle negativo quanto o branco foram adaptados do protocolo descrito por Rios; Neto; Santos; *et al.* (2019).

A quantificação do p-nitrofenol foi realizada utilizando um espectrofotômetro Cecil CE1010, ajustado para uma leitura em comprimento de onda a 348 nm. A atividade enzimática foi calculada com base na curva padrão do p-nitrofenol, por meio da obtenção da equação da reta e do R^2 . Os valores de absorvância das amostras foram convertidos em concentrações de p-nitrofenol

utilizando as equações derivadas da curva padrão (KORNECKI *et al.*, 2020; RIOS *et al.*, 2019).

O p-nitrofenol liberado durante o ensaio foi convertida em atividade de lipase, adaptado do protocolo descrito por Usman; Mohammed; Mamo (2021) (Equação 5).

$$\text{Atividade da celulase (} U \text{ mL}^{-1} \text{)} = \frac{[p\text{-nitrofenol}] * V_t}{V_a * \text{Treação} * V_e} \quad (5)$$

Onde:

[p-nitrofenol] = concentração de p-nitrofenol ($\mu\text{mol mL}^{-1}$)

V_t = volume total da reação (mistura reacional) (mL)

V_a = volume da amostra (extrato bruto enzimático filtrado) (mL)

Treação = tempo de reação enzimática (minutos)

V_e : volume do ensaio usado para medição de absorbância.

4.8.4.1 Curva padrão do p-nitrofenol

A curva padrão do p-nitrofenol foi elaborada a partir de uma solução padrão de p-nitrofenol com concentração de (50 mM), utilizando cinco concentrações diferentes variando 20 a 50 ($\mu\text{mol L}^{-1}$), adaptado do protocolo descrito por KOMALA; KHUN (2013).

A mistura de reação foi homogeneizada utilizando um agitador Vortex VX-35 e em seguida, foram adicionados 5000 μL de água destilada, e a solução foi homogeneizada novamente. O procedimento adaptado de KOMALA; KHUN (2013); RIOS; NETO; SANTOS; *et al.* (2019).

A absorbância da amostra foi medida em um espectrofotômetro a um comprimento de onda de 348 nm (Anexo A - Tabela 23). A curva padrão foi elaborada com base nos valores de absorbância de diferentes concentrações do p-nitrofenol (Anexo A - Figura 11) (RIOS *et al.*, 2019).

4.8.5 Determinação da atividade de protease

A atividade enzimática da protease foi quantificada utilizando o método colorimétrico. Esse método se baseia na capacidade da protease de catalisar a hidrólise da caseína, resultando na liberação de aminoácidos livres, como a tirosina. O produto dessa reação apresenta uma coloração azul cuja intensidade é diretamente proporcional à concentração de tirosina liberada durante a reação da hidrólise, o que permite uma quantificação precisa da atividade enzimática da protease (SHARMA, ARUN KUMAR *et al.*, 2015).

Para a realização da reação, foi preparada uma mistura contendo 1000 µL de extrato bruto enzimático filtrado e 5000 µL de caseína (substrato): tampão fosfato a 10 mM (pH 7,00), na proporção de 0,65:100 (p/v), incubada a 50 °C por 10 minutos (ABDOLLAHI; GHANE; BABAEKHO, 2021). O controle negativo consistiu em uma mistura de 1000 µL de extrato enzimático filtrado e 5000 µL de tampão fosfato a 10 mM (pH 7,00), incubada sob as mesmas condições. O branco da reação foi composto por de 1000 µL caseína (substrato): tampão fosfato a 10 mM (pH 7,00), na proporção de 0,65:100 (p/v); e 5000 µL de tampão fosfato a 10 mM (pH 7,00), incubado sob as mesmas condições. Tanto o controle negativo quanto o branco foram adaptados do protocolo descrito por Abdollahi; Ghane; Babaeekhou (2021).

Após a incubação, a reação foi interrompida pela adição de 5000 µL de ácido tricloroacético 110 mM. Em seguida, foi adicionado a 2000 µL da mistura 5000 µL de carbonato de sódio 500 mM e 1000 µL de reagente Folin-Ciocalteu 0,50 M (ABDOLLAHI; GHANE; BABAEKHO, 2021). O volume final das amostras foi ajustado para 5000 µL com água destilada e homogeneizado em agitador Vortex VX-35 (Satra) (ZANGO; IBRAHIM; SULEIMAN, 2021).

A quantificação da tirosina foi realizada utilizando um espectrofotômetro Cecil CE1010, ajustado para uma leitura em comprimento de onda a 660 nm. A atividade enzimática foi calculada com base na curva padrão do p-nitrofenol, por meio da obtenção da equação da reta e do R^2 . Os valores de absorbância das amostras foram convertidos em concentrações da tirosina utilizando as equações derivadas da curva (ABDOLLAHI; GHANE; BABAEKHO, 2021; SHARMA, ARUN KUMAR *et al.*, 2015).

A tirosina liberada durante o ensaio foi convertida em atividade de protease, adaptado do protocolo descrito por USMAN; MOHAMMED; MAMO (2021) (Equação 6).

$$\text{Atividade da celulase (} U \text{ mL}^{-1} \text{)} = \frac{[\text{tirosina}] * V_t}{V_a * \text{Treação} * V_e} \quad (6)$$

Onde:

[tirosina] = concentração de tirosina ($\mu\text{mol mL}^{-1}$)

V_t = volume total da reação (mistura reacional) (mL)

V_a = volume da amostra (extrato bruto enzimático filtrado) (mL)

Treação = tempo de reação enzimática (minutos)

V_e : volume do ensaio usado para medição de absorbância.

Como a atividade enzimática quantitativa das bactérias produtoras de protease isoladas não demonstrou índice enzimático ≥ 1 , não foi identificada atividade significativa para atender ao critério de avaliação enzimática quantitativa de bactérias produtoras de enzimas hidrolíticas. Dessa forma, a curva padrão de tirosina não foi realizada.

4.9 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

A identificação molecular foi realizada nas bactérias hidrolíticas cujas atividades enzimáticas quantitativas foram previamente determinadas. Essas cepas, tiveram seu DNA extraído, seguido pela amplificação por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) e sequenciamento genético, permitindo a identificação das espécies.

4.9.1 Extração de DNA

O DNA genômico foi extraído das culturas pelo método fenol-clorofórmio, adaptado do protocolo descrito por Jeršek *et al.* (1996). O volume de 2 mL de cultura foi centrifugado a 13.466,88 RCF por 3 minutos, utilizando uma centrífuga Iec/Micromax, e lavado em 1 mL de solução salina de citrato de sódio 1X ($0,15 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaCl}$; $0,015 \text{ mol L}^{-1}$ citrato de sódio). A cultura foi suspensa em 100 μL

água ultrapura, 8 µl de lisozima (50 mg mL⁻¹) e incubada durante 45 minutos a 37 °C. Em seguida, foram adicionados 200 µl de tampão Tris-HCl/EDTA (0,01 mol L⁻¹ Tris-HCl, pH 8,0; 0,001 mol L⁻¹ EDTA), 100 µl de solução de Sarkosyl (5% sarkosyl em tampão TE) e 100 µl de solução de Proteinase K (25 mg mL⁻¹), incubados a 37 °C durante 1 hora. O lisado de células foi extraído três vezes com fenol e quatro vezes com clorofórmio: álcool isoamil (24:1). A precipitação de ácido nucleico foi realizada com isopropanol PA. O DNA foi suspenso em água ultrapura, mantido na geladeira por 24 horas, e posteriormente armazenado a -18 °C.

4.9.2 Amplificação do gene 16S rRNA

Os primers forward (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e reverse (5'-GTATTACCGCGGCTGCTG-3') foram usados para amplificar um produto de aproximadamente 536 pares de base (pb) da região V1-V3 do gene 16S rRNA. A reação PCR consistiu na mistura de 25 µL de Taq Pol - Master Mix (2x) (Cellco Biotec, SP, Brasil), 22 µL de água milli-Q, 1 µL de cada primer (10 µmol L⁻¹, Synbio Technologies) e 1 µL de DNA (100 ng). Como controle negativo foi utilizado uma reação sem a presença de DNA (LANGE *et al.*, 2015).

A amplificação foi realizada em termociclador GeneAmp System 9700 (Applied Biosystems). A desnaturação inicial (95 °C por 5 minutos) foi seguida por 35 ciclos de desnaturação (95 °C por 30 segundos), anelamento do primer (55 °C por 30 segundos) e extensão (74 °C por 2 minutos). O último ciclo foi seguido de uma etapa de extensão final (74°C durante 5 minutos) (LANGE *et al.*, 2015).

4.9.3 Eletroforese em gel de agarose

A eletroforese em gel de agarose foi adaptada do protocolo descrito por Ardhi *et al.* (2020). O volume de 10 µL de produto PCR foi misturado com 3 µL de tampão de carregamento da amostra Blue/Orange 6x (Promega) e aplicado em gel de agarose a 1% (p/v). A separação dos fragmentos de DNA foi realizada em cuba horizontal (Sub-cell GT, BioRad), por 2 horas a 90V, em tampão Tris/Borato/EDTA 1X pH 8,30 (0,09 mol L⁻¹ Tris base, 0,09 mol L⁻¹ de ácido

bórico, 0,4% de EDTA 0,5 mol L⁻¹ pH 8,00) utilizando marcador de 1 kb (Promega).

O gel foi corado em solução de brometo de etídio (2 µg mL⁻¹) por 5 minutos. A descoloração foi realizada em água destilada, por 10 minutos. Os perfis foram visualizados sob luz UV a 302 nm em fotodocumentador L-Pix (Loccus Biotecnologia) e processado por software L-Pix Image v.2.7.

4.9.4 Sequenciamento do gene 16S rRNA

Os produtos de PCR foram purificados utilizando o PureLink™ PCR Purification Kit (Invitrogen da Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Lituânia). As reações de sequenciamento foram realizadas em analisador genético SeqStudio (Applied Biosystems, Waltham, MA, EUA), empregando a tecnologia de sequenciamento Sanger. As amostras foram preparadas com kit de sequenciamento BigDye™ Terminator v3.1 (Applied Biosystems, Waltham, MA, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. As sequências foram analisadas em DNA Baser Sequence Assembler v 5.21 (Heracle BioSoft SRL, www.DnaBaser.com) e comparadas às sequências disponíveis no banco de dados de nucleotídeos do Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia (NCBI).

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os experimentos foram realizados em triplicata, com resultados expressos como média e desvio padrão, seguindo uma análise descritiva dos dados (FAZAL *et al.*, 2022; YASSIN; JIRU; INDRACANTI, 2021). A análise estatística dos resultados foi conduzida utilizando o *software Microsoft Excel* (DHAVER *et al.*, 2022).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA

Neste estudo, as análises de caracterização morfofisiológicas permitiram identificar seis gêneros distintos isolados das amostras obtidas nos bioprocessos de biodigestão e co-digestão anaeróbia. Os isolados apresentaram características similares às bactérias pertencentes aos gêneros *Acetobacter*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Corynebacterium* e *Pseudomonas* (Tabela 16).

Tabela 16 – Características morfofisiológicas que definiram o gênero dos isolados bacterianos

	Gêneros					
	<i>Acetobacter</i>	<i>Acinetobacter</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Beijerinckia</i>	<i>Corynebacterium</i>	<i>Pseudomonas</i>
Características das colônias						
Cor	Branca leitosa	Branca acinzentada	Creme	Branca amarelada	Branca	Esverdeada
Forma	Circular	Circular	Circular	Circular	Circular	Plana
Elevação	Plana	Plana	Achatada	Plana	Plana	Plana
Estrutura	Lisa	Lisa	Lisa	Lisa	Lisa	Lisa
Borda	Lisa	Lisa	Lisa	Lisa	Irregular	Irregular
Testes bioquímicos						
Gram	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
Catalase	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
Citrato	Não aplicável	Não aplicável	Não aplicável	Não aplicável	Não aplicável	Positivo
Fermentação de Glicose	Não aplicável	Não aplicável	Não aplicável	Positivo	Positivo	Não aplicável
Fermentação de Lactose	Não aplicável	Não aplicável	Não aplicável	Positivo	Negativo	Negativo
Produção de Indol	Não aplicável	Negativo	Não aplicável	Não aplicável	Negativo	Negativo
Fermentação de manitol	Não aplicável	Não aplicável	Não aplicável	Não aplicável	Negativo	Não aplicável
Motilidade	Positivo	Negativo	Não aplicável	Negativo	Negativo	Positivo
Oxidase	Negativo	Negativo	Não aplicável	Positivo	Negativo	Positivo
Produção de Sulfeto de hidrogênio	Não aplicável	Positivo	Não aplicável	Não aplicável	Não aplicável	Negativo
Redução de Nitrato	Positivo	Negativo	Não aplicável	Positivo	Não aplicável	Não aplicável

Fonte: Elaborada pela autora (2024).

5.2 ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Foram isoladas quinhentas e sessenta e cinco bactérias produtoras de enzimas hidrolíticas de interesse biotecnológico, como amilase, celulase, xilanase, lipase e protease (Tabela 17). Dentre elas, sessenta e seis apresentaram perda do potencial de produção de enzimas hidrolíticas após o processo de conservação e manutenção em BHI com glicerol. Esse método de conservação em meio nutriente com glicerol como crioprotetor influenciou significativamente tanto a viabilidade quanto a estabilidade genética dessas bactérias ao longo do tempo, levando a alterações em suas características funcionais. Embora Ikken *et al.* (2021) descreva a conservação em glicerol como uma técnica que reúne a maioria das características desejáveis para a preservação bacteriana, nossos resultados sugerem limitações quanto à taxa de sobrevivência de algumas bactérias ao longo do armazenamento, comprometendo, sua capacidade de produção enzimática.

Tabela 17 – Isolados bacterianos com potencial para produção de enzimas hidrolíticas

Bactérias isoladas	Número de isolados	Atividade enzimática				
		Batelada				
		Amilase	Celulase	Xilanase	Lipase	Protease
<i>Acetobacter</i> spp.	15	0	2	1	9	3
<i>Acinetobacter</i> spp.	1	1	0	0	0	0
<i>Bacillus</i> spp.	26	6	2	1	10	7
<i>Beijerinckia</i> spp.	14	1	2	3	7	1
<i>Corynebacterium</i> spp.	16	4	0	0	8	4
<i>Pseudomonas</i> spp.	2	0	0	1	1	0
Total	74	12	6	6	35	15
Porcentagem (%)	100%	16,22%	8,11%	8,11%	47,30%	20,27%
UASB						
		Amilase	Celulase	Xilanase	Lipase	Protease
<i>Acetobacter</i> spp.	64	0	3	4	51	6
<i>Acinetobacter</i> spp.	29	0	2	1	18	8
<i>Bacillus</i> spp.	122	1	2	3	100	16
<i>Beijerinckia</i> spp.	28	0	0	4	15	9
<i>Corynebacterium</i> spp.	44	0	1	1	32	10
<i>Pseudomonas</i> spp.	6	0	0	0	4	2
Total	293	1	8	13	220	51
Porcentagem (%)	100%	0,34%	2,73%	4,44%	75,09%	17,41%
Lagoa Coberta						
		Amilase	Celulase	Xilanase	Lipase	Protease
<i>Acetobacter</i> spp.	16	6	5	2	2	1
<i>Acinetobacter</i> spp.	12	3	4	0	5	0
<i>Bacillus</i> spp.	63	10	8	1	32	12
<i>Beijerinckia</i> spp.	8	1	2	1	3	1
<i>Corynebacterium</i> spp.	32	7	2	3	10	10
<i>Pseudomonas</i> spp.	1	0	0	0	0	1
Total	132	28	21	7	52	2
Porcentagem (%)	100%	21,05%	15,79%	5,26%	39,10%	18,80%

Fonte: Elaborada pela autora (2024).

As bactérias isoladas foram obtidas a partir de bioprocessos de biodigestão e co-digestão anaeróbia, que se destacaram como fontes favoráveis para o desenvolvimento do metabolismo microbiano e para a produção de enzimas hidrolíticas. Essas fontes, destacaram-se por oferecer substratos com

concentrações ideais de carbono, nitrogênio, nutrientes e minerais, além de condições físico-químicas ideais, como pH entre 6,50 e 7,50, temperaturas entre 17 e 39°C e TRH de 1, 2, 6, 10 e 30 dias adequados para a degradação eficiente da matéria orgânica. Os resultados evidenciam a importância de isolar microrganismos com potencial biotecnológico a partir de fontes que ofereçam condições propícias à sua adaptação, potencializando a capacidade metabólica e a eficiência na produção de enzimas de interesse biotecnológico (BÜCKER *et al.*, 2020; MUHONGO; PREGO; VALENTIM, 2022; OLICÓN-HERNÁNDEZ *et al.*, 2022).

A diversidade microbiana isolada neste estudo são consistentes com aquela descrita na literatura como produtora de enzimas hidrolíticas de interesse biotecnológico. A presença de gêneros bacterianos amplamente reconhecidos pela capacidade de produzir essas enzimas, reforça a relevância dessas bactérias na produção enzimática, uma vez que as enzimas por elas produzidas apresentam características funcionais significativas. Esse resultado reforça a valorização das estratégias de bioprospecção e biotecnologia, uma vez que, a biotecnologia microbiana visa a correta caracterização e seleção de microrganismos isolados de fontes com elevada concentração de matéria orgânica, promovendo a produção de metabólitos ativos e enzimas específicas de interesse biotecnológico (AKINTOLA *et al.*, 2019; ALOKIK; SINGH, 2019; CHANDRA *et al.*, 2020; FAROOQ *et al.*, 2021; RAINA; KUMAR; SARAN, 2022; SOLANKI *et al.*, 2021).

Entre os isolados bacterianos nesse estudo, o gênero *Bacillus* se destaca pelo significativo potencial para a produção de enzimas hidrolíticas de interesse biotecnológico, principalmente para a lipase (LÓPEZ-FERNÁNDEZ; BENAIGES; VALERO, 2020). Esses resultados corroboram com dados da literatura, que apontam bactérias hidrolíticas presentes na fase de hidrólise dos bioprocessos de biodigestão e co-digestão anaeróbia, pertencentes ao filo *Firmicutes*, como *Bacillus*, como importantes produtoras de enzimas extracelulares, incluindo a lipase (PASALARI *et al.*, 2021). Esse resultado reforça a relevância de *Bacillus* como um gênero promissor na biotecnologia, alinhando-se com o estudo de KOVACIC *et al.* (2016), que destacou a predominância de sequências de enzimas lipolíticas bacterianas depositadas de diferentes espécies desse gênero, ao reclassificar essas enzimas em diversas famílias, complementando

um trabalho de duas décadas do mesmo grupo de pesquisa. Esse cenário sugere que, apesar da ampla exploração de fungos produtores de lipase, o gênero *Bacillus*, representa uma alternativa viável e potencialmente vantajosa para a produção dessa enzima, dada sua facilidade de cultivo (ZHAO et al., 2021). Esses dados fortalecem o campo da pesquisa de lipases bacterianas considerando a adaptabilidade e eficiência das bactérias em diferentes condições de cultivo, o que pode favorecer processos de fermentação em larga escala e contribuir para uma produção de lipases mais sustentável e economicamente viável (BÜCKER et al., 2020; MUHONGO; PREGO; VALENTIM, 2022; OLICÓN-HERNÁNDEZ et al., 2022).

A caracterização da diversidade microbiana em biorreatores anaeróbios operados com diferentes substratos tem sido amplamente avaliada em estudos que investigam a cinética de produção de biogás como produto final. No entanto, é relevante destacar que, embora a literatura relate que a diversidade microbiana caracterizada nesses estudos possa apresentar características fisiológicas importantes para a produção de biomoléculas, como enzimas hidrolíticas de interesse biotecnológico, essa perspectiva ainda não havia recebido a devida atenção e investigação até esse presente estudo, reforçando a importância de estratégias de bioprospecção para o avanço biotecnológico (FLORES-MENDOZAA et al., 2020; NKUNA et al., 2022).

Das quinhentas e sessenta e cinco bactérias isoladas, treze demonstraram índices enzimáticos iguais ou superiores a 1,00, indicando atividade enzimática de média a alta (Tabela 18). Esse resultado foi obtido sem otimização do processo, assegurando que a atividade enzimática observada fosse exclusivamente atribuída a expressão original da enzima pelas bactérias. Dentre essas, seis isolados se destacaram pela produção de lipase, com valores de atividade enzimática variando entre 189,645 e 5220,730 U mL⁻¹, o que indica um potencial biotecnológico significativo, mesmo sem otimização do processo.

Tabela 18 – Atividade enzimática dos isolados bacterianos

Amilase							
			Atividade enzimática qualitativa			Atividade enzimática quantitativa	
Identificação	Bactérias	Fonte de isolamento (modelo de biorreator)	Halo da colônia (mm)	Halo de degradação (mm)	Índice Enzimático	Concentração de Maltose (μmol mL ⁻¹)	Unidade de atividade enzimática (U mL ⁻¹)
7ABBC	<i>Bacillus</i> sp.	Lagoa coberta	44 ± 1,155	54 ± 1,000	1,218 ± 0,039	9,195 ± 0,004	0,50
8ABBC	<i>Bacillus</i> sp.		48 ± 0,577	54 ± 0,577	1,127 ± 0,003	9,637 ± 0,002	0,53
10ALBC	<i>Bacillus</i> sp.		38 ± 1,528	44 ± 1,528	1,141 ± 0,079	12,340 ± 0,052	0,67
Celulase							
			Atividade enzimática qualitativa			Atividade enzimática quantitativa	
Identificação	Bactérias	Fonte de isolamento (modelo de biorreator)	Halo da colônia (mm)	Halo de degradação (mm)	Índice Enzimático	Concentração de Glicose (μmol mL ⁻¹)	Unidade de atividade enzimática (U mL ⁻¹)
6CEFBB	<i>Bacillus</i> sp.	Batelada	40 ± 1,528	42 ± 1,528	1,050 ± 0,002	13,816 ± 0,045	0,82
7CEFBB	<i>Bacillus</i> sp.	UASB	39 ± 1,155	41 ± 1,000	1,059 ± 0,043	8,771 ± 0,003	0,51
8CEFBU	<i>Bacillus</i> sp.		43 ± 1,528	50 ± 1,000	1,154 ± 0,040	8,748 ± 0,002	0,50

(continuação)

Xilanase							
Atividade enzimática qualitativa					Atividade enzimática quantitativa		
Identificação	Bactérias	Fonte de isolamento (modelo de biorreator)	Halo da colônia (mm)	Halo de degradação (mm)	Índice Enzimático	Concentração de xilose (μmol mL ⁻¹)	Unidade de atividade enzimática (U mL ⁻¹)
1XBBC	<i>Bacillus</i> sp.	Lagoa coberta	59 ± 1,732	61 ± 0,577	1,041 ± 0,040	3,893 ± 0,001	0,23
Lipase							
Atividade enzimática qualitativa					Atividade enzimática quantitativa		
Identificação	Bactérias	Fonte de isolamento (modelo de biorreator)	Halo da colônia (mm)	Halo de degradação (mm)	Índice Enzimático	Concentração de p- nitrofenol (μmol mL ⁻¹)	Unidade de atividade enzimática (U mL ⁻¹)
47LEFBB	<i>Bacillus</i> sp.	Batelada	42 ± 1,528	45 ± 0,577	1,055 ± 0,028	13,958 ± 0,127	354,46
90LAFBU	<i>Bacillus</i> sp.		5 ± 1,000	54 ± 1,155	11,417 ± 1,665	172,521 ± 0,173	2728,70
91LAFBU	<i>Pseudomonas</i> sp.	UASB	6 ± 0,577	41 ± 0,577	7,233 ± 0,841	4,309 ± 0,210	189,65
92LAFBU	<i>Bacillus</i> sp.		5 ± 0,577	50 ± 0,577	10,617 ± 1,902	337,619 ± 0,173	5220,73
15LBBC	<i>Bacillus</i> sp.	Lagoa coberta	5 ± 1,000	41 ± 1,155	8,356 ± 1,667	11,578 ± 0,315	299,36
31LLBC	<i>Bacillus</i> sp.		7 ± 1,000	51 ± 2,000	7,375 ± 0,992	12,097 ± 0,127	322,87

Fonte: Elaborada pela autora (2024).
Os valores médios são apresentados com ± desvio padrão que foram obtidos em triplicada.
Curvas padrões de maltose, glicose, xilose e p-nitrofenol (Anexo A)

As bactérias dos gêneros *Pseudomonas* e *Bacillus* isoladas neste estudo se destacam como fontes promissoras para a produção de lipase, corroborando com os estudos de Chandra et al. (2020) e Misbah; Koraichi; Jouti (2021) que também apontam esses gêneros como potenciais candidatos para a produção de lipases, devido ao seu elevado potencial biotecnológico. O potencial enzimático dessas bactérias não apenas evidencia sua relevância na biotecnologia industrial, mas também ressalta a importância da bioprospecção em fontes ainda pouco explorado como os bioprocessos de biodigestão e co-digestão anaeróbia. Essa abordagem pode contribuir significativamente para o avanço de tecnologias sustentáveis e inovadoras na biotecnologia aplicada.

Apesar de o gênero *Pseudomonas* ser reconhecido pelo seu potencial biotecnológico, destacando-se como um dos principais produtores de lipase entre as bactérias lipolíticas, e as bactérias Gram-positivas, como as do gênero *Bacillus*, serem frequentemente descritas na literatura com uma atividade lipolítica menos expressiva, em comparação às Gram-negativas, os resultados deste estudo demonstraram que entre os isolados analisados o gênero *Bacillus* foi responsável pela maior produção de lipase, evidenciando seu potencial biotecnológico (MISBAH; KORAICHI; JOUTI, 2021).

A variação na produção de atividade enzimática observada no gênero *Bacillus* pode ser atribuída a fatores como diferenças genéticas entre os isolados e/ou a condições experimentais que podem não ter sido ideais para a produção de amilase, celulase e xilanase. Essas condições, por sua vez, influenciaram diretamente a produção das enzimas nos isolados específicos do gênero *Bacillus*, conforme relatado por Niyongabo Niyonzima (2019), que ressalta que cada espécie bacteriana possui condições de crescimento específicas para a produção significativa de enzimas industriais. Esse cenário ressalta a necessidade de estudos voltado para à otimização dessas condições para a produção enzimática em linhagens de interesse. NIYONGABO NIYONZIMA (2019) reforça essa perspectiva ao apontar que a seleção correta de microrganismos para aplicações industriais, aliada à otimização das condições de cultivo, é essencial para viabilizar a produção econômica de enzimas para a indústria biotecnológica.

5.3 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

As treze bactérias isoladas que apresentaram índices enzimáticos iguais ou superiores a 1,00, foram quantificadas em termos de unidade de atividade enzimática e submetidas ao sequenciamento parcial do gene 16S rRNA (Tabela 19). Todos os produtos de PCR gerados para análise de sequência apresentaram o tamanho esperado, de 536 pb (Figura 10). As sequências de 16S rRNA foram comparadas com as sequências disponíveis no GenBank, e foram consideradas confiáveis aquelas com valores de similaridade superiores a 99% (LANGE *et al.*, 2015).

Tabela 19 – Identificação molecular dos isolados bacterianos produtores de enzimas hidrolíticas

Amilase			
Identificação dos isolados	Espécie	Identidade (%)	GenBank*
7ABBC	<i>Bacillus velezensis</i>	99,80	PP858053.1
	<i>Bacillus siamensis</i>	99,80	PP508200.1
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	99,80	PP507167.1
	<i>Bacillus subtilis</i>	99,80	PP112203.1
8ABBC	<i>Bacillus velezensis</i>	99,80	PP858053.1
	<i>Bacillus siamensis</i>	99,80	PP508200.1
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	99,80	PP507167.1
	<i>Bacillus subtilis</i>	99,80	PP112203.1
10ALBC	<i>Bacillus tequilensis</i>	99,80	PP814857.1
	<i>Bacillus rugosus</i>	99,80	PP751624.1
	<i>Bacillus subtilis</i>	99,80	PP718026.1
	<i>Bacillus thuringiensis</i>	99,80	PP265276.1
	<i>Bacillus stercoris</i>	99,80	CP121861.1
Celulase			
Identificação dos isolados	Espécie	Identidade (%)	GenBank*
6CEFBB	<i>Bacillus velezensis</i>	99.79	PP858053.1
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	99.79	PP594082.1
	<i>Bacillus siamensis</i>	99.79	PP508200.1
	<i>Bacillus subtilis</i>	99.79	PP112203.1
7CEFBB	<i>Bacillus cereus</i>	100,00	PP830106.1
	<i>Bacillus thuringiensis</i>	100,00	PP825410.1
	<i>Bacillus paramycoides</i>	100,00	PP814843.1
	<i>Bacillus anthracis</i>	100,00	CP147787.1
	<i>Bacillus tropicus</i>	100,00	PP563704.1
	<i>Bacillus pacificus</i>	100,00	PP463042.1
	<i>Bacillus paranthracis</i>	100,00	CP129604.1

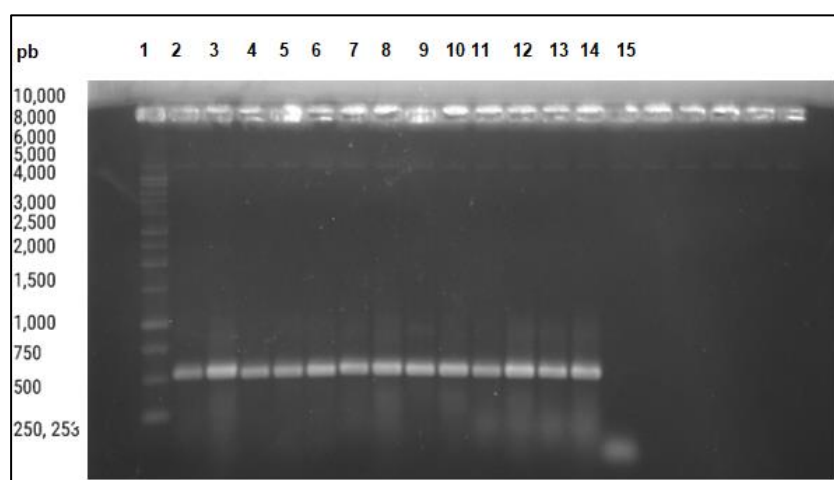
(continuação)

8CEFBU	<i>Bacillus velezensis</i>	99,79	PP858053.1
	<i>Bacillus siamensis</i>	99,79	PP508200.1
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	99,79	PP507167.1
	<i>Bacillus subtilis</i>	99,79	PP112203.1
Xilanase			
Identificação dos isolados	Espécie	Identidade (%)	GenBank*
1XBBC	<i>Bacillus velezensis</i>	99,80	PP858053.1
	<i>Bacillus siamensis</i>	99,80	PP508200.1
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	99,80	PP507167.1
	<i>Bacillus subtilis</i>	99,80	PP112203.1
Lipase			
Identificação dos isolados	Espécie	Identidade (%)	GenBank*
47LEFBB	<i>Bacillus safensis</i>	100,00	MT313116.1
	<i>Bacillus pumilus</i>	100,00	MN103780.1
	<i>Bacillus zhangzhouensis</i>	100,00	MK138626.1
	<i>Bacillus spp. yk2</i>	100,00	LT161885.1
90LAFBU	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	99,80	KU983625.1
	<i>Bacillus siamensis</i>	99,80	OR367262.1
	<i>Bacillus velezensis</i>	99,80	OR361790.1
	<i>Bacillus subtilis</i>	99,80	KX369580.1
	<i>Bacillus cereus</i>	99,80	KU218526.1
91LAFBU	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	99,80	MK875783.1
92LAFBU	<i>Bacillus velezensis</i>	99,61	PP858053.1
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	99,61	PP507167.1
	<i>Bacillus siamensis</i>	99,61	PP508200.1
	<i>Bacillus subtilis</i>	99,61	PP112203.1
15LBBC	<i>Bacillus velezensis</i>	99,80	PP858053.1
	<i>Bacillus siamensis</i>	99,80	PP508200.1
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	99,80	PP507167.1
	<i>Bacillus subtilis</i>	99,80	PP112203.1
31LLBC	<i>Bacillus licheniformis</i>	99,80	MH577800.1
	<i>Bacillus sonorensis</i>	99,80	KF879302.1
	<i>Bacillus haynesii</i>	100,00	LC588601.1

Fonte: Elaborada pela autora (2024).

*Número de acesso a sequência no GenBank

Figura 10 – Eletroforese em gel de amplificação de PCR do gene 16S rRNA



Fonte: Elaborada pela autora (2024).

1:tamanho molecular (1kb); 2:90LAFBU; 3:91LAFBU; 4:92LAFBU;
5:15LBBC; 6:47LEFBB; 7:6LEFBB; 8:7CEFBB; 9:8CEFBU;
10:7ABBC; 11:8ABBC; 12:1XBBC; 13: 10ALBC; 14:31LLBC;
15:controle negativo.

Neste estudo, o sequenciamento parcial do gene 16S rRNA permitiu identificar, em nível de espécie, bactérias que são conhecidas por sua capacidade de produzir enzimas hidrolíticas de interesse biotecnológico, como amilase, celulase, xilanase e lipase (ABUBAKAR *et al.*, 2024; HARWOOD *et al.*, 2018; KANWAL *et al.*, 2022; LAYLY *et al.*, 2021; RASHID; SOHAIL, 2021).

Por meio do sequenciamento parcial do gene 16S rRNA, foi possível identificar de forma definitiva, em nível de espécie, um dos treze isolados bacterianos (99,8% de similaridade), que foi classificada como *Pseudomonas aeruginosa*. Esse resultado está alinhado com estudos relatados por Abubakar *et al.* (2024); Ali; Hameed, Nadder (2022) e Kamel Ahmed (2021), que também identificaram essa espécie como potencial produtora de lipase. Entre as bactérias Gram-negativas, o gênero *Pseudomonas* destaca-se como um dos mais relevantes devido à sua capacidade de produzir lipases, com diversas espécies apresentando esse potencial enzimático. Dentre elas, *Pseudomonas aeruginosa* é amplamente reconhecida como a espécie de maior importância, não apenas pela eficiência na produção de lipases, mas também por sua versatilidade metabólica e ampla aplicação biotecnológica.

No entanto, os outros doze isolados não puderam ser identificados de forma definitiva a nível de espécie, uma vez que o fragmento sequenciado apresentou uma similaridade entre 99,61% e 100% com sequências de

diferentes espécies do gênero *Bacillus*. Esse resultado evidencia a limitação do gene 16S rRNA para a identificação molecular de bactérias desse gênero, pois o gene oferece baixo poder discriminatório para diferenciação filogenética em nível de espécie, o que impossibilitou a diferenciação entre as espécies do gênero *Bacillus* somente a partir da análise desse gene (SEUYLEMEZIAN *et al.*, 2018; VOS *et al.*, 2012). Embora o gene 16S rRNA é adequado para a identificar a maioria das espécies bacterianas, a diferenciação entre as espécies pode ser limitada em alguns gêneros, como *Bacillus* (PATEL, SUDIP; GUPTA, 2020).

Diversos estudos reforçam essa dificuldade de diferenciação entre as espécies de *Bacillus*. HA *et al.* (2019) relataram que alguns táxons de *Bacillus cereus* contém sequências do gene 16S rRNA semelhantes em regiões variáveis de *Bacillus anthracis*, *Bacillus thuringiensis*. De forma similar Tirumalai *et al.* (2018) relataram que alguns táxons de *Bacillus pumilus* contém sequências do gene 16S rRNA semelhantes em regiões variáveis de *Bacillus safensis*. Já HARWOOD *et al.* (2018) relataram que alguns táxons de *Bacillus subtilis* contém sequências do gene 16S rRNA semelhantes em regiões variáveis de *Bacillus siamensis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus sonorensis*, *Bacillus tequilensis*, *Bacillus velezensis*.

6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos evidenciaram a diversidade microbiana presente nos bioprocessos de biodigestão e co-digestão anaeróbia, com características similares às bactérias pertencentes aos gêneros *Acetobacter*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Corynebacterium* e *Pseudomonas*. Essas bactérias demonstram capacidade para produzir enzimas hidrolíticas de interesse biotecnológico, incluindo amilase, celulase, xilanase, lipase e protease. Ademais, os isolados bacterianos evidenciaram um potencial significativo para a produção simultânea de mais de uma dessas enzimas.

Entre as quinhentas e sessenta e cinco bactérias isoladas, treze apresentaram atividade enzimática de média a alta. Dentre essas, seis isolados se destacaram pela produção de lipase, com valores de atividade enzimática variando entre 189,65 e 5220,73 U mL⁻¹, o que indica um potencial biotecnológico significativo, mesmo sem otimização do processo.

O sequenciamento parcial do gene 16S rRNA permitiu a identificação definitiva de uma das treze bactérias isoladas, com 99,8% de similaridade, sendo classificada como *Pseudomonas aeruginosa*. No entanto, os outros doze isolados não puderam ser identificados em nível de espécie, devido à alta similaridade da região V1-V3 do gene 16S rRNA para diferentes espécies do gênero *Bacillus*. Esses resultados ressaltam a necessidade do sequenciamento completo do genoma como uma ferramenta essencial para a obtenção de uma identificação taxonômica mais precisa dentro do gênero *Bacillus*.

Este estudo demonstrou, que os bioprocessos de biodigestão e co-digestão anaeróbia representam uma fonte promissora de microrganismos produtores de enzimas, com potencial para aplicação no desenvolvimento de produtos para a indústria farmacêutica, além de outras áreas biotecnológicas.

6.1 PERSPECTIVAS FUTURAS

Como continuidade, recomenda-se a realização de estudos futuros que explorem a cinética enzimática dos isolados, com o objetivo de otimizar e aumentar a eficiência da produção de enzimas. Adicionalmente, a aplicação de

técnicas avançadas de biologia molecular, como sequenciamento de genomas completos ou métodos de metagenômica, é altamente recomendável para garantir a identificação precisa de todas as linhagens bacterianas em nível de espécie, especialmente no caso do gênero *Bacillus*. Essas abordagens poderão expandir o conhecimento sobre o potencial biotecnológico dessas bactérias e favorecer seu uso em processos industriais.

REFERÊNCIAS

- ABDENACEUR, R. *et al.* Effective biofertilizer *Trichoderma* spp. isolates with enzymatic activity and metabolites enhancing plant growth. **International Microbiology**, v. 25, p. 817–829, 2022. DOI: 10.1007/s10123-022-00263-8.
- ABDOLLAHI, P.; GHANE, M.; BABAEKHOU, L. Isolation and Characterization of Thermophilic Bacteria from Gavmesh Goli Hot Spring in Sabalan Geothermal Field, Iran: *Thermomonas hydrothermalis* and *Bacillus altitudinis* Isolates as a Potential Source of Thermostable Protease. **Geomicrobiology Journal**, v. 38, n. 1, p. 87–95, 2021. DOI: 10.1080/01490451.2020.1812774.
- ABDULRAZZAQ, R. H.; FAISAL, R. M. Efficiency of Hichrome *Enterococcus faecium* Agar in the Isolation of *Enterococcus* spp. and other Associated Bacterial Genera from Water. **Journal of Life and Bio-sciences Research**, v. 03, n. 01, p. 1–6, 2022. DOI: 10.38094/jibsr30151.
- ABRAR HAMZA, T. Isolation and Characterization of Protease Producing Bacteria from Soil, in Arba Minch University, Abaya Campus. **American Journal of Biological and Environmental Statistics**, v. 4, n. 1, p. 10–14, 2018. DOI: 10.11648/j.ajbes.20180401.12.
- ABUBAKAR, A. *et al.* Crude oil biodegradation potential of lipase produced by *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* isolated from hydrocarbon contaminated soil. **Environmental Chemistry and Ecotoxicology**, v. 6, p. 26–32, 2024. DOI: 10.1016/j.enceco.2023.12.001.
- ACHARYA, S.; CHAUDHARY, A. Bioprospecting thermophiles for cellulase production: A review. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 3, p. 844–856, 2012. DOI: 10.1590/S1517-83822012000300001.
- ADEKUNLE, K. F.; OKOLIE, Jude Awele. A Review of Biochemical Process of Anaerobic Digestion. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, v. 06, n. 03, p. 205–212, 2015. DOI: 10.4236/abb.2015.63020.
- ADEYEMI, O. A. *et al.* The collaborative antibacterial potentials of *Allium sativum* and *Allium cepa* against specific environmental isolates. **Access Microbiology**, v. 1, p. 000553, 2023. DOI: 10.1099/acmi.0.000553.v1.
- AHMED, A. A. Q.; BABALOLA, O. O.; MCKAY, T. Cellulase- and Xylanase-Producing Bacterial Isolates with the Ability to Saccharify Wheat Straw and Their Potential Use in the Production of Pharmaceuticals and Chemicals from Lignocellulosic Materials. **Waste and Biomass Valorization**, v. 9, n. 5, p. 765–775, 2018. DOI: 10.1007/s12649-017-9849-5.
- AKINDOLIRE, M. A.; RAMA, H.; ROOPNARAIN, A. Psychrophilic anaerobic digestion: A critical evaluation of microorganisms and enzymes to drive the process. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 161, p. 112394, 2022. DOI: 10.1016/j.rser.2022.112394.

AKINTOKUN, A. K.; ABIBU, W.; OYATOOGUN, M. Isolation and Characterization of Microorganisms with Hydrolytic Profile during Anaerobic Digestion and Biogas Production of Cow Dung and Rice Husk. **Journal of Natural Sciences Research**, v. 7, n. 5, p. 19–30 , 2017. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/356541391>. Acesso em: 28 ago. 2024.

AKINTOLA, A. I. *et al.* Production and physicochemical properties of thermostable, crude cellulase from enterobacter cloacae IP8 isolated from plant leaf litters of *Lagerstroemia indica* Linn. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, v. 8, n. 4, p. 989–994 , 2019. DOI: 10.15414/jmbfs.2019.8.4.989-994.

AKTER, F. *et al.* Isolation , characterization , and evaluation of probiotic properties of Lactic Acid bacteria from different fermented yoghurt drinks available in Bangladesh. **Research Square**, 2023. DOI: 10.21203/rs.3.rs-2537050/v1.

AL-ASKAR, A. A. *et al.* A Novel Endophytic Trichoderma longibrachiatum WKA55 With Biologically Active Metabolites for Promoting Germination and Reducing Mycotoxinogenic Fungi of Peanut. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, p. 772417, 2022. DOI: 10.3389/fmicb.2022.772417.

ALI, A. A.; HAMEED, K. W.; NADDER, M. I. Isolation of Pseudomonas Aeruginosa from Soil and Production of Lipase Enzyme. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science** v. 961, n. 1, p. 012087 , 2022. DOI: 10.1088/1755-1315/961/1/012087.

ALMWAFY, A. T. *et al.* Preliminary Characterization and Identification of Gram Positive Hemolysis Bacteria. **Al-Azhar Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 62, n. 2, p. 96–109, 2020. DOI: 10.21608/ajps.2020.118378.

ALOKIKA, S. B. Production, characteristics, and biotechnological applications of microbial xylanases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 21–22, p. 8763–8784 , 2019. DOI: 10.1007/s00253-019-10108-6.

ANDREE, K. B. *et al.* Vibrio mediterranei, a potential emerging pathogen of marine fauna: investigation of pathogenicity using a bacterial challenge in *Pinna nobilis* and development of a species-specific PCR. **Journal of Applied Microbiology**, v. 130, n. 2, p. 617–631 , 2021. DOI: 10.1111/jam.14756.

ARDHI, A. *et al.* Molecular identification of amylase-producing thermophilic bacteria isolated from Bukit Gadang Hot Spring, West Sumatra, Indonesia. **Biodiversitas**, v. 21, n. 3, p. 994–1000, 2020. DOI: 10.13057/biodiv/d210319.

ARIAEENEJAD, S. *et al.* Mining of camel rumen metagenome to identify novel alkali-thermostable xylanase capable of enhancing the recalcitrant lignocellulosic biomass conversion. **Bioresource Technology**, v. 281, p. 343–350, 2019. DOI: 10.1016/j.biortech.2019.02.059.

ARORA, N. K.; FATIMA, T. Environmental sustainability and biotechnology: opportunities and challenges. **Environmental Sustainability**, v. 7, p. 115–119, 2024. DOI: 10.1007/s42398-024-00317-9.

ARROYO, F. R. *et al.* Study of biogas generation from guinea pig excretions in discontinuous and Taiwanese biodigesters at elevations above 2,500 masl. **Espacios**, v. 41, n. 47, p. 321–334, 2020. DOI: 10.48082/espacios-a20v41n47p23.

ATELGE, M. R. *et al.* A critical review of pretreatment technologies to enhance anaerobic digestion and energy recovery. **Fuel**, v. 270, p. 117494, 2020. DOI: 10.1016/j.fuel.2020.117494.

ATOLE, Liezel D. C. *et al.* Variations in enzymatic activity and response to abiotic factors of endophytic bacteria isolated from Narra (*Pterocarpus indicus*) growing in a forest environment and urban arboretum. **Philippine Science Letters**, v. 13, p. 120–126, 2020. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/348281618_Variations_in_enzymatic_activity_and_response_to_abiotic_factors_of_endophytic_bacteria_isolated_from_Narra_Pterocarpus_indicus_growing_in_a_forest_environment_and_urban_arboretum. Acesso em: 30 jul. 2024.

AVILA-RODRÍGUEZ, M. I. *et al.* Practical context of enzymatic treatment for wound healing: A secreted protease approach (review). **Biomedical Reports**, v. 13, n. 1, p. 3–14, 2020. DOI: 10.3892/br.2020.1300.

AYAL, E. L. B. *et al.* Screening of Amylolytic Bacteria from Mina Padi Aquaculture in Panembangan Village, Cilongok District, Banyumas, Central Java. **Journal of Aquaculture and Fish Health**, v. 13, n. 1, p. 90–101, 2024. Doi: 10.20473/jafh.v13i1.39210.

BABAGIL, A.; NADAROGLU, H. Purification of pectin lyase enzyme from *Bacillus pumilus* bacteria by three-phase partitioning method (TPP), nanoflower preparation and investigation of fruit juice clarification. **Biointerface Research in Applied Chemistry**, v. 12, n. 3, p. 3938–3955, 2022. DOI: 10.33263/BRIAC123.39383955.

BAGRIACIK, B. *et al.* An experimental approach to microbial carbonate precipitation in improving the engineering properties of sandy soils. **Annals of Microbiology**, v. 71, n. 37, 2021. DOI: 10.1186/s13213-021-01644-6.

BALLA, A. *et al.* Screening of Cellulolytic Bacteria from Various Ecosystems and Their Cellulases Production under Multi-Stress Conditions. **Catalysts**, v. 12, n. 7, p. 769, 2022. DOI: doi.org/10.3390/catal12070769.

BANERJEE, G. *et al.* Purification and Characterization of Extracellular Protease and Amylase Produced by the Bacterial Strain, *Corynebacterium alkanolyticum* ATH3 Isolated from Fish Gut. **Arabian Journal for Science and Engineering**, v. 41, p. 9–16, 2016. DOI: 10.1007/s13369-015-1809-4.

BAYKARA, S. G.; SÜRMELI, Y.; ŞANLI-MOHAMED, G. Purification and Biochemical Characterization of a Novel Thermostable Serine Protease from *Geobacillus* sp. GS53. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 193, n. 5, p. 1574–1584, 2021. DOI: doi.org/10.1007/s12010-021-03512-0.

BERGEY, D. H.; HOLT, J. G. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. 9. ed. Philadelphia : Lippincott Williams & Wilkins, 2000.

BEVERIDGE, T. J. Use of the Gram stain in microbiology Use of the Gram stain in microbiology. **Biotechnic & histochemistry**, v. 76, n. 3, p. 111–118 , 2001. DOI: 10.1080/bih.76.3.111.118.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Módulo, V. Detecção e Identificação de Bactérias de Importância Médica**. p. 1–95, 2013.

BÜCKER, F. *et al.* Fish waste: An efficient alternative to biogas and methane production in an anaerobic mono-digestion system. **Renewable Energy**, v. 147, p. 798–805, 2020. DOI: 10.1016/j.renene.2019.08.140.

BURLACU, A.; ISRAEL-ROMING, F.; CORNEA, C. P. Microbial xylanase: A review SEE PROFILE. **Scientific Bulletin. Series F. Biotechnologies**, v. 20, p. 335–342, 2016. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/322979017>. Acesso em: 12 set. 2024.

CAMARGO, A. F. *et al.* A Low-genotoxicity bioherbicide obtained from trichoderma koningiopsis fermentation in a stirred-Tank bioreactor. **Industrial Biotechnology**, v. 16, n. 3, p. 176–181, 2020. DOI: 10.1089/ind.2019.0024.

CAROTA, E. *et al.* A sustainable use of Ricotta Cheese Whey for microbial biodiesel production. **Science of the Total Environment**, v. 584–585, p. 554–560 , 2017. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2017.01.068.

CHANDRA, P. *et al.* Microbial lipases and their industrial applications: A comprehensive review. **Microbial cell factories**, v. 19, p. 1-42, 2020. DOI: 10.1186/s12934-020-01428-8.

CHATEAU, A. *et al.* Heme A Synthase Deficiency Affects the Ability of *Bacillus cereus* to Adapt to a Nutrient-Limited Environment. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 3, p. 1033, 2022. DOI: 10.3390/ijms23031033.

CHEN, Y. *et al.* *Acetobacter orientalis* XJC-C with a high lignocellulosic biomass-degrading ability improves significantly composting efficiency of banana residues by increasing metabolic activity and functional diversity of bacterial community. **Bioresource Technology** v. 324, p. 124661, 2021. DOI: 10.1016/j.biortech.2020.124661.

CONSTANCIO, M. T. L. *et al.* Exploring the Potential of Two Bacterial Consortia to Degrade Cellulosic Biomass for Biotechnological Applications. **Current Microbiology**, v. 77, n. 10, p. 3114–3124 , 2020. DOI: 10.1007/s00284-020-

02136-7.

COTTA, S. P. M. *et al.* Thermo-resistant enzyme-producing microorganisms isolated from composting. **Brazilian journal of biology** v. 83, n. 2023, p. e244205, 2021. DOI: 10.1590/1519-6984.244205.

D'ROSE, V.; JOHNY, T. K.; BHAT, S. Screening and identification of amylase producing strains of *Bacillus*. **Journal of Applied Biology and Biotechnology** v. 0, n. 00, p. 1–6, 2019. DOI: 10.7324/JABB.2019.70103.

DA SILVA, G. H. *et al.* Shifts of acidogenic bacterial group and biogas production by adding two industrial residues in anaerobic co-digestion with cattle manure. **Journal of Environmental Science and Health, Part A**, v. 56, n. 14, p. 1503–1511, 2021. DOI: 10.1080/10934529.2021.2015987.

DA SILVA, N. *et al.* **Microbiological examination methods of food and water: a laboratory manual**. CRC Press, 2018.

DAS, T.; ALI, F.; RAHMAN, M. S. Cellulase activity of a novel bacterial strain *Arthrobacter woluwensis* TDS9: its application on bioconversion of paper mill sludge. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 20, n. 1, p. 1–16, 2022. DOI: 10.1186/s43141-022-00373-w.

DE MENDONÇA, H. V. *et al.* Bioenergy recovery from cattle wastewater in an UASB-AF hybrid reactor. **Water Science and Technology**, v. 76, n. 9, p. 2268–2279, 2017. DOI: 10.2166/wst.2017.325.

DELI, W. *et al.* Isolation and identification of cellulose-degrading endophytic bacteria from Tomoceridae (springtails). **African Journal of Microbiology Research**, v. 16, n. 1, p. 1–7, 2022. DOI: 10.5897/AJMR2021.9582.

DEWIYANTI, I. *et al.* Cellulase enzyme activity of the bacteria isolated from mangrove ecosystem in Aceh Besar and Banda Aceh. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, v. 951, n. 1, p. 012113, 2022. DOI:10.1088/1755-1315/951/1/012113.

DHAVER, P. *et al.* Isolation, screening, preliminary optimisation and characterisation of thermostable xylanase production under submerged fermentation by fungi in Durban, South Africa. **Mycology**, v. 13, n. 4, p. 271–292, 2022. DOI: 10.1080/21501203.2022.2079745.

DIMRI, A. *et al.* Isolation and Characterization of Coliform Bacteria and Bacteriophages from Ganga River in Northern Himalayan Regions. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 8, n. 11, p. 1582–1592, 2019. DOI: 10.20546/ijcmas.2019.811.183.

DONG, Z.; YANG, S.; LEE, B. H. Bioinformatic mapping of a more precise *Aspergillus niger* degradome. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 693, 2021. DOI: 10.1038/s41598-020-80028-3.

DUTTA, A.; DAVIES, C.; IKUMI, D. S. Performance of upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor and other anaerobic reactor configurations for wastewater treatment: A comparative review and critical updates. **Journal of Water Supply: Research and Technology - AQUA**, v. 67, n. 8, p. 858–884, 2018. DOI: 10.2166/aqua.2018.090.

EKPENYONG, O. *et al.* Pre-clinical pharmacokinetics, tissue distribution and physicochemical studies of CLBQ14, a novel methionine aminopeptidase inhibitor for the treatment of infectious diseases. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 14, p. 1263–1277, 2020. DOI: 10.2147/DDDT.S238148.

ELECHI, D. P. *et al.* Isolation and identification of amylase-producing microorganisms. **GSC Biological and Pharmaceutical Sciences**, v. 20, n. 01, p. 76–82, 2022. DOI: 10.30574/gscbps.2022.20.1.0304.

FALKE, D. *et al.* Cytochrome bcc-aa3 Oxidase Supercomplexes in the Aerobic Respiratory Chain of *Streptomyces coelicolor* A3(2). **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 6, p. 255–268, 2019. DOI: 10.1159/000496390.

FAROOQ, M. A. *et al.* Biosynthesis and industrial applications of α -amylase: a review. **Archives of Microbiology**, v. 203, n. 4, p. 1281–1292, 2021. DOI: 10.1007/s00203-020-02128-y.

FASIM, A.; MORE, V. S.; MORE, S. S. Large-scale production of enzymes for biotechnology uses. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 69, p. 68–76, 2021. DOI: 10.1016/j.copbio.2020.12.002.

FAZAL, B. Z. *et al.* Screening, isolation, and characterization of amylase-producing bacteria from Poring Hot Spring Sabah, Malaysia. **Biodiversitas Journal of Biological Diversity**, v. 23, n. 6, p. 2807–2815, 2022. DOI: 10.13057/biodiv/d230604.

FLORES-MENDOZAA, A. P. *et al.* Methanogenesis of raw cheese whey: pH and substrate-inoculum ratio evaluation at mesophyll temperature range. **Chemical Technology and Biotechnology**, v. 95, n. 7, p. 1946–1952, 2020. DOI: 10.1002/jctb.6391.

FOLINO, A.; ZEMA, D. A.; CALABRÒ, P. S. Environmental and economic sustainability of swine wastewater treatments using ammonia stripping and anaerobic digestion: A short review. **Sustainability (Switzerland)** v. 12, p. 4971, 2020. DOI:10.3390/su12124971.

FRANCHI, O. *et al.* Active and total microbial community dynamics and the role of functional genes *bamA* and *mcrA* during anaerobic digestion of phenol and p-cresol. **Bioresource Technology**, v. 264, p. 290–297, 2018. DOI: 10.1016/j.biortech.2018.05.060.

FREITAS, F. F. *et al.* The Brazilian market of distributed biogas generation: Overview, technological development and case study. **Renewable and**

Sustainable Energy Reviews, v. 101, p. 146–157, 2019. DOI: 10.1016/j.rser.2018.11.007.

GAIO, J. *et al.* Seasonal characterization of the prokaryotic microbiota of full-scale anaerobic UASB reactors treating domestic sewage in southern Brazil. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 46, n. 1, p. 69–87, 2023. DOI: 10.1007/s00449-022-02814-9.

GARCÍA-DEPRAECT, O. *et al.* A novel biohydrogen production process: Co-digestion of vinasse and Nejayote as complex raw substrates using a robust inoculum. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 42, n. 9, p. 5820–5831, 2017. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2016.11.204.

HA, M. *et al.* Reliable identification of *Bacillus cereus* group species using low mass biomarkers by MALDI-TOF MS. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, n. 6, p. 887–896, 2019. DOI: 10.4014/jmb.1903.03033.

HADI, S. N. *et al.* Isolation and Characterization of Buprofezin Tolerant Bacteria from Rhizosphere of Paddy at Marginal Land of Banyumas Regency. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, v. 255, n. 1, p. 012009, 2019. DOI: 10.1088/1755-1315/255/1/012009.

HARAZONO, K.; ATSUMI, Y.; SHIRASAKA, N. Safety evaluation of collagenase from *Streptomyces violaceoruber*. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 113, p. 104645, 2020. DOI: 10.1016/j.yrtph.2020.104645.

HARWOOD, C. R. *et al.* Secondary metabolite production and the safety of industrially important members of the *Bacillus subtilis* group. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 42, n. 6, p. 721–738, 2018. DOI: 10.1093/femsre/fuy028.

HE, P. *et al.* Activity Assay of Amylase and Xylanase Is Available for Quantitative Assessment of Strain Aging in Cultivated Culinary–Medicinal *Morchella Mushrooms* (Ascomycotina). **International Journal of Medicinal Mushrooms** v. 25, n. 1, p. 57–64, 2023. DOI: 10.1615/IntJMedMushrooms.2022046420.

HERNÁNDEZ-MELCHOR, D. J. *et al.* Qualitative and Quantitative Enzymatic Profile of Native *Trichoderma* Strains and Biocontrol Potential Against *Fusarium Oxysporum* F.Sp. Cubense Race 1. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, v. 11, n. 4, p. 3–10, 2022. DOI: 10.55251/jmbfs.3264.

HEYDARI, S. *et al.* Excision of endosymbiotic bacteria from yeast under aging and starvation stresses. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 78, p. 104141, 2020. DOI: 10.1016/j.meegid.2019.104141.

HUA, D. *et al.* Starch and Cellulose Degradation in the Rumen and Applications of Metagenomics on Ruminal Microorganisms. **Animals**, v. 1212, n. 21, p. 3020, 2022. DOI: 10.3390/ani12213020.

HUANG, C. *et al.* Anaerobic digestion of elephant grass hydrolysate: Biogas production, substrate metabolism and outlet effluent treatment. **Bioresource Technology**, v. 283, n. 2, p. 191–197, 2019. DOI: 10.1016/j.biortech.2019.03.079.

HUSSEIN, Mahmoud *et al.* Sustainable production of housefly (*Musca domestica*) larvae as a protein-rich feed ingredient by utilizing cattle manure. **PLoS ONE**, v. 12, n. 2, p. e0171708, 2017. DOI:10.1371/journal.pone.0171708.

IKKEN, Y. *et al.* The novel biphasic medium for transport, culture and conservation at an ambient temperature of *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 37, n. 187, p. 1-10, 2021. DOI: 10.1007/s11274-021-03149-5.

ILTCHENCO, J. *et al.* Microbiota profile in mesophilic biodigestion of sugarcane vinasse in batch reactors. **Water Science and Technology**, v. 84, n. 8, p. 2028–2039, 2021. DOI: 10.2166/wst.2021.375.

JEREMIAH, M.; KABEYI, B. Biogas Production and Applications in the Sustainable Energy Transition. **Journal of Energy**, v. 2022, n. 1, p. 8750221, 2022. DOI: 10.1155/2022/8750221.

JERŠEK, B. *et al.* Repetitive element sequence-based PCR for species and strain discrimination in the genus *Listeria*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 23, n. 1, p. 55–60, 1996. DOI: 10.1111/j.1472-765X.1996.tb00028.x.

JIMÉNEZ-ORTEGA, E. *et al.* Insights into the Structure of the Highly Glycosylated Ffase from *Rhodotorula dairenensis* Enhance Its Biotechnological Potential. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 23, p. 14981, 2022. DOI: 10.3390/ijms232314981.

JIN, C. *et al.* Anaerobic digestion: An alternative resource treatment option for food waste in China. **Science of the Total Environment** v. 779, p. 146397, 2021. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2021.146397.

KAMEL AHMED, T. M. Detection lipase gene of *Pseudomonas aeruginosa* from crude oil contaminated soil. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, v. 790, n. 1, p. 012051, 2021. DOI: 10.1088/1755-1315/790/1/012051.

KANWAL, A. *et al.* Screening and characterization of novel lipase producing *Bacillus* species from agricultural soil with high hydrolytic activity against PBAT poly (butylene adipate co terephthalate) co-polyesters. **Polymer Bulletin**, v. 79, n. 11, p. 10053–10076, 2022. DOI: 10.1007/s00289-021-03992-4.

KEAY, L.; WILDI, B. S. Proteases of the genus *Bacillus*. I. Neutral proteases. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 12, n. 2, p. 179–212, 1970. DOI: 10.1002/bit.260120205.

KHAN, S. *et al.* Assessment of Multiple Anaerobic Co-Digestions and Related Microbial Community of Molasses with Rice-Alcohol Wastewater. **Energies**, v. 13, p. 4866, 2020. DOI:10.3390/en13184866.

KHAN, Z. *et al.* Characterization of the genome and serine protease of a novel *Bacillus subtilis* isolate. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 115, n. 2, p. 281–295, 2022. DOI: 10.1007/s10482-021-01696-3.

KIELISZEK, M. *et al.* Characteristics of the proteolytic enzymes produced by lactic acid bacteria. **Molecules** v. 26, n. 7, p. 1858, 2021. DOI: 10.3390/molecules 26071858.

KIKUCHI, M. *et al.* Septic shock caused by a carbon dioxide-dependent and extended spectrum β -lactamase-producing *Proteus mirabilis* small colony variant in a long-term bedridden patient. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 28, n. 3, p. 455–458, 2022. DOI: 10.1016/j.jiac.2021.12.013.

KIM, E. *et al.* Comprehensive analysis of microbial communities in full-scale mesophilic and thermophilic anaerobic digesters treating food waste-recycling wastewater. **Bioresource Technology**, v. 259, p. 442–450, 2018. DOI: 10.1016/j.biortech.2018.03.079.

KOMALA, T.; KHUN, T. C. Calcite-Forming Bacteria Located in Limestone Area of Malaysia. **Journal of Asian and Scientific research**, v. 3, n. 5, p. 471–484 , 2013. Disponível em: <https://econpapers.repec.org/RePEc:asi:joasrj:v:3:y:2013:i:5:p:471-484:id:3505>. Acesso em: 15 jul. 2024.

KORNECKI, J. F. *et al.* Influence of phosphate anions on the stability of immobilized enzymes. Effect of enzyme nature, immobilization protocol and inactivation conditions. **Process Biochemistry**, v. 95, p. 288–296, 2020. DOI: 10.1016/j.procbio.2020.02.025.

KORSA, G. *et al.* Microbial cellulase production and its potential application for textile industries. **Annals of Microbiology**, v. 73, n. 13, p. 1–21 , 2023. DOI: 10.1186/s13213-023-01715-w.

KOVACIC, F. *et al.* Classification of Lipolytic Enzymes from Bacteria. **Aerobic Utilization of Hydrocarbons, Oils and Lipids** v. 24, p. 255–289, 2016. DOI: 10.1007/978-3-319-39782-5.

KUGE, T. *et al.* Functional analysis of arabinofuranosidases and a xylanase of *Corynebacterium alkanolyticum* for arabinoxylan utilization in *Corynebacterium glutamicum*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, p. 5019–5032, 2017. DOI: 10.1007/s00253-017-8280-y.

KUMARI, P. *et al.* Sortase A: A chemoenzymatic approach for the labeling of cell surfaces. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 118, n. 12, p. 4577–4589, 2021. DOI: 10.1002/bit.27935.

LAMBRÉ, C. *et al.* Safety evaluation of the food enzyme subtilisin from the genetically modified *Bacillus licheniformis* strain NZYM-CB. **EFSA Journal**, v. 22, n. 7, p. e887, 2024. DOI: 10.2903/j.efsa.2024.8873.

LAMILLA, C. *et al.* Bioprospecting for extracellular enzymes from culturable *Actinobacteria* from the South Shetland Islands, Antarctica. **Polar Biology** v. 40, n. 3, p. 719–726, 2017. DOI 10.1007/s00300-016-1977-z.

LANGE, C. C. *et al.* Species-level identification of staphylococci isolated from bovine mastitis in Brazil using partial 16S rRNA sequencing. **Veterinary Microbiology**, v. 176, n. 3–4, p. 382–388, 2015. DOI: 10.1016/j.vetmic.2015.01.024.

LAYLY, I. R. *et al.* Identification of lipase producing bacteria from palm oil sewage sludge processing plant at malimping, banten, indonesia. **Biodiversitas**, v. 22, n. 10, p. 4512–4524, 2021. DOI: 10.13057/biodiv/d221045.

LE, T. A. T. Antibacterial activity of silver nanoparticles synthesized using *Eleusine indica* L. Gaertn leaf extract on the bacteria isolated from the vase solution. **Dalat University Journal of Science**, v. 13, n. 2, p. 36–51, 2023. DOI: 10.37569/DalatUniversity.13.2.1027(2023).

LEON, F. A. *et al.* Proposal for modelling and numerical simulation with scilab for learning the continuous and discontinuous dynamics of biological and anaerobic digesters. **Desalination and Water Treatment**, v. 234, p. 15–21, 2021. DOI: 10.5004/dwt.2021.27535.

LI, H. *et al.* Molecular cloning and characterization of a thermostable and halotolerant endo- β -1,4-glucanase from *Microbulbifer* sp. ALW1. **3 Biotech**, v. 11, n. 5, p. 250, 2021. DOI: 10.1007/s13205-021-02801-z.

LI, J. X. *et al.* Diversity of Cellulase-Producing Filamentous Fungi From Tibet and Transcriptomic Analysis of a Superior Cellulase Producer *Trichoderma harzianum* LZ117. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 1617, 2020. DOI: 10.3389/fmicb.2020.01617.

LI, Z. *et al.* The unique GH5 cellulase member in the extreme halotolerant fungus *Aspergillus glaucus* CCHA is an endoglucanase with multiple tolerance to salt, alkali and heat: prospects for straw degradation applications. **Extremophiles**, v. 22, n. 4, p. 675–685, 2018. DOI: 10.1007/s00792-018-1028-5.

LIU, B. *et al.* Microbiologically influenced corrosion of X80 pipeline steel by nitrate reducing bacteria in artificial Beijing soil. **Bioelectrochemistry**, v. 135, p. 107551, 2020. DOI: 10.1016/j.bioelechem.2020.107551.

LIU, Yu Ying *et al.* Gut microbiota-involved metabolism and intestinal absorption mechanisms in decreasing bioaccessibility of triadimefon in strawberry and grape. **Food Chemistry**, v. 373, p. 131575, 2022. DOI:

10.1016/j.foodchem.2021.131575.

LOHANI, S. P.; HAVUKAINEN, J. Anaerobic Digestion: Factors Affecting Anaerobic Digestion Process. **Energy, Environment, and Sustainability**, p. 343–359, 2018. DOI: 10.1007/978-981-10-7413-4_18.

LÓPEZ-FERNÁNDEZ, Josu; BENAIGES, Maria Dolors; VALERO, Francisco. *Rhizopus oryzae* lipase, a promising industrial enzyme: Biochemical characteristics, production and biocatalytic applications. **Catalysts**, v. 10, p. 1277, 2020. DOI: 10.3390/catal10111277.

MALDONADO, R. R. *et al.* A review on Geotrichum lipases: Production, purification, immobilization and applications. **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly**, v. 30, n. 4, p. 439–454, 2016. DOI: 10.15255/CABEQ.2016.907.

MAMINDLAPELLI, N. K. *et al.* Understanding the substrate mediated microbial community shift within the anaerobic ecosystems via 16S metagenomic studies. **Bioresource Technology Reports**, v. 15, p. 100793, 2021. DOI: 10.1016/j.biteb.2021.100793.

MANNI, A.; FILALI-MALTOUF, A. Diversity and bioprospecting for industrial hydrolytic enzymes of microbial communities isolated from deserted areas of south-east Morocco. **AIMS Microbiology**, v. 8, n. 1, p. 5–25, 2022. DOI: 10.3934/microbiol.2022002.

MANYI-LOH, C. E; LUES, R. Anaerobic Digestion of Lignocellulosic Biomass : Substrate Characteristics (Challenge) and Innovation. **Fermentation**, v. 9, n. 8, p. 775, 2023. DOI: 10.3390/fermentation9080755.

MARAFON, A. C. *et al.* Chemical composition and calorific value of elephant grass varieties and other feedstocks intended for direct combustion. **Grassland Science**, v. 67, n. 3, p. 241–249, 2021. DOI: 10.1111/grs.12311.

MARCHETTI, R.; VASMARA, C. Co-digestion of Deproteinized Dairy Waste With Pig Slurry: Effect of Recipe and Initial pH on Biogas and Volatile Fatty Acid Production. **Bioenergy Research**, v. 13, n. 2, p. 643–658, 2020. DOI: 10.1007%2Fs12155-019-10055-0.

MARTÍNEZ-PACHECO, M. M. *et al.* Optimization of production of xylanases with low cellulases in *Fusarium solani* by means of a solid state fermentation using statistical experimental design. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 52, n. 4, p. 328–338, 2020. DOI: 10.1016/j.ram.2019.12.003.

MENDEN, A. *et al.* Novel, natural allosteric inhibitors and enhancers of *Candida rugosa* lipase activity. **Bioorganic Chemistry**, v. 109, p. 104732, 2021. DOI: 10.1016/j.bioorg.2021.104732.

MENDONÇA, Henrique Vieira De *et al.* Crescimento de cana-de-açúcar sob aplicação de biofertilizante da bovinocultura e ureia. **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**, v. 9, n. 4, p. 973–987, 2016. DOI: 10.17765/2176-

9168.2016v9n4p973-987.

DE MENDONÇA, H. V.; OMETTO, J. P. H. B.; OTENIO, M. H. Production of Energy and Biofertilizer from Cattle Wastewater in Farms with Intensive Cattle Breeding. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 228, n. 72, p. 1–14, 2017. DOI: 10.1007/s11270-017-3264-1.

MIHALY COZMUTA, A. *et al.* Impact of packaging properties on the physical-chemical-microbiological-sensory characteristics of Ricotta cheese during storage. **Packaging Technology and Science**, v. 33, n. 1, p. 27–37, 2020. DOI: 10.1002/pts.2482.

MISBAH, A.; KORAICHI, S. I.; JOUTI, M. A. T. Purification, characterization and immobilization of lipase from *Proteus vulgaris* OR34 for synthesis of methyl oleate. **Microbiology and Biotechnology Letters**, v. 48, n. 4, p. 491–505, 2021. DOI: 10.48022/MBL.2003.03010.

MOHAN, S. *et al.* Screening of amylase producing bacteria from soil samples of evergreen and deciduous forest. **International Research Journal of Biological Sciences** v. 8, n. 6, p. 1–6, 2019. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/334093808_Screening_of_amylase_producing_bacteria_from_soil_samples_of_evergreen_and_deciduous_forest. Acesso em: 22 jul. 2024.

MOKRANI, S.; NABTI, E. Recent status in production, biotechnological applications, commercial aspects, and future prospects of microbial enzymes: A comprehensive review. **International Journal of Agricultural Science and Food Technology**, v. 10, n. 1, p. 006–020, 2024. DOI: 10.17352/2455-815x.000202.

MONTES, J. A. *et al.* Biogas production from the liquid waste of distilled gin production: Optimization of UASB reactor performance with increasing organic loading rate for co-digestion with swine wastewater. **Bioresource Technology**, v. 274, p. 43–47, 2019. DOI: 10.1016/j.biortech.2018.11.060.

MUHONGO, V. R.; PREGO, G. J.; VALENTIM, A. F. Production of Biogas and Electric Energy in the Rural Environment. **International Journal of Sustainable and Green Energy**, v. 11, n. 4, p. 66–74, 2022. DOI: 10.11648/j.ijrse.20221104.11.

NAVABHARATH, M. *et al.* Isolation, Screening and Characterization of Amylase and Cellulase Producing Bacterial Isolates From Different Soil Samples. **International Journal of Advanced Research**, v. 5, n. 10, p. 1385–1396, 2017. DOI: 10.21474/ijar01/5657;

NAVEED, M. *et al.* Protease—A Versatile and Ecofriendly Biocatalyst with Multi-Industrial Applications: An Updated Review. **Catalysis Letters**, v. 151, n. 2, p. 307–323, 2021. DOI: 10.1007/s10562-020-03316-7.

NISA, I. K. *et al.* The potential of amylase enzyme activity against bacteria

isolated from several lakes in east Java, Indonesia. **Biodiversitas**, v. 22, n. 1, p. 42–49, 2021. DOI: 10.13057/biodiv/d220106.

NIYONGABO, F. N. Production of Microbial Industrial Enzymes. **Acta Scientific Microbiology** v. 2, n. 12, p. 75–89, 2019. DOI: 10.31080/asmi.2019.02.0434.

NKUNA, R. *et al.* Insights into organic loading rates of anaerobic digestion for biogas production: a review. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 42, n. 4, p. 487–507, 2022. DOI: 10.1080/07388551.2021.1942778.

NUGROHO, A.; SUMANTRI, I. Biogas production of tomato sauce wastewater by batch anaerobic digestion. **AIP Conference Proceedings**, v. 2197, n. 1, p. 030010, 2020. DOI: 10.1063/1.5140902.

OLICÓN-HERNÁNDEZ, D. R. *et al.* Fundaments and Concepts on Screening of Microorganisms for Biotechnological Applications. Mini Review. **Current Microbiology**, v. 79, n. 12, p. 373, 2022. DOI: 10.1007/s00284-022-03082-2.

OLUFEMI, F. E.; VERONICA, D.; GODWIN, H. Effect of Anaerobic Co-Digestion on Microbial Community and Biogas Production. **Biosciences, Biotechnology Research Asia**, v. 16, n. 2, p. 391–401, 2019. DOI: 10.13005/bbra/2754.

OMOTOYINBO, O. V.; OMOTOYINBO, B. I. Effect of Varying NaCl Concentrations on the Growth Curve of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Cell Biology**, v. 4, n. 5, p. 31–34, 2016. DOI: 10.11648/j.cb.20160405.11.

OTTONI, J. R. *et al.* Cultured and uncultured microbial community associated with biogas production in anaerobic digestion processes. **Archives of Microbiology**, v. 204, n. 6, p. 340, 2022. DOI: 10.1007/s00203-022-02819-8.

PAN, Z. *et al.* Potential of anaerobic digestate of dairy manure in suppressing soil-borne plant disease. **Animal Science Journal**, v. 89, n. 10, p. 1512–1518, 2018. DOI: 10.1111/asj.13092.

PASALARI, H. *et al.* Perspectives on microbial community in anaerobic digestion with emphasis on environmental parameters: A systematic review. **Chemosphere**, v. 270, p. 128618, 2021. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2020.128618.

PATEL, G. B. Isolation, screening and identification of Lipase producing fungi from cotton seed soapstock. **Indian Journal of Science and Technology**, v. 13, n. 36, p. 3762–3771, 2020. DOI: 10.17485/ijst/v13i36.1099.

PATEL, S.; GUPTA, R. S. A phylogenomic and comparative genomic framework for resolving the polyphyly of the genus *Bacillus*: Proposal for six new genera of bacillus species, *Peribacillus gen. nov.*, *Cytobacillus gen. nov.*, *Mesobacillus gen. nov.*, *Neobacillus gen. nov.*, *Metabacillu*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 70, n. 1, p. 406–

438, 2020. DOI: 10.1099/ijsem.0.003775.

PIETRANGELO, L. *et al.* The “Vitaminic-strategy” Against the Oral Bacteria *S. Mutans* and *F. Nucleatum*, Agents of Caries and Halitosis. **Research Square**, 2021. DOI: 10.21203/rs.3.rs-892470/v1.

PRAMANIK, S. K. *et al.* The anaerobic digestion process of biogas production from food waste: Prospects and constraints. **Bioresource Technology Reports**, v. 8, p. 100310, 2019. DOI: 10.1016/j.biteb.2019.100310.

PUROHIT, A. *et al.* Bioresource Technology Xylanase from *Acinetobacter pittii* MASK 25 and developed magnetic cross- linked xylanase aggregate produce predominantly xylopentose and xylohexose from agro biomass. **Bioresource Technology**, v. 244, p. 793–799, 2017. DOI: 10.1016/j.biortech.2017.08.034.

RAINA, D.; KUMAR, V.; SARAN, S. A critical review on exploitation of agro-industrial biomass as substrates for the therapeutic microbial enzymes production and implemented protein purification techniques. **Chemosphere**, v. 294, p. 133712, 2022. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2022.133712.

RAMANUJ, K.; SHELAT, H. Plant Growth Promoting Potential of Bacterial Endophytes from Medicinal Plants. **Advances in Research**, v. 13, n. 6, p. 1–15, 2018. DOI: 10.9734/air/2018/40014.

RASHID, R.; SOHAIL, M. Xylanolytic *Bacillus* species for xylooligosaccharides production: a critical review. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 8, n. 16, p. 1–15, 2021. DOI: 10.1186/s40643-021-00369-3.

RATHAKRISHNAN, D.; GOPALAN, A. K. Isolation and characterization of halophilic isolates from Indian salterns and their screening for production of hydrolytic enzymes. **Environmental Challenges**, v. 6, p. 100426, 2022. DOI: 10.3934/microbiol.2022002.

RAWLINGS, N. D. Twenty-five years of nomenclature and classification of proteolytic enzymes. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, v. 1868, p. 140345, 2020. DOI: 10.1016/j.bbapap.2019.140345.

RIOS, N. S. *et al.* Comparison of the immobilization of lipase from *Pseudomonas fluorescens* on divinylsulfone or p-benzoquinone activated support. **International Journal of Food Microbiology**, v. 134, p. 936–945, 2019. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.05.106.

RIZZOLO, A.; CORTELLINO, G. Ricotta Cheese Whey-Fruit-Based Beverages: Pasteurization Effects on Antioxidant Composition and Color. **Beverages**, v. 3, n. 1, p. 15, 2017. DOI: 10.3390/beverages3010015.

SAKTHIVEL, M. *et al.* Optimization of Culture Conditions for the Production of Extracellular Cellulase from *Corynebacterium lipophiloflavum* Optimization of Culture Conditions for the Production of Extracellular Cellulase from *Corynebacterium lipophiloflavum*. **Journal of Ecobiotechnology**, v. 2, n. 9, p.

06–13, 2010. Disponível em:

https://www.researchgate.net/publication/268423128_Optimization_of_Culture_Conditions_for_the_Productio. Acesso em: 10 ago. 2024.

SANJIVKUMAR, M. *et al.* Biosynthesis, molecular modeling and statistical optimization of xylanase from a mangrove associated *Actinobacterium Streptomyces variabilis* (MAB3) using Box-Behnken design with its bioconversion efficacy. **International Journal of Biological Macromolecules** v. 118, n. 2017, p. 195–208, 2018. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.06.063.

SARWAN, J.; BOSE, J. C. Importance of microbial cellulases and their industrial applications. **Annals of the Romanian Society for Cell Biology**, v. 25, n. 1, p. 3568–3575, 2021. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/363454036_Importance_of_Microbial_Cellulases_and_Their_Industrial_Applications. Acesso em: 15 jun. 2024.

SCARANO, C. *et al.* Antibiotic resistance of *Aeromonas* ssp. strains isolated from Sparus aurata reared in Italian mariculture farms. **International Journal of Food Microbiology**, v. 284, p. 91–97, 2018. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2018.07.033.

SEUYLEMEZIAN, A. *et al.* Development of a custom MALDI-TOF MS database for species-level identification of bacterial isolates collected from spacecraft and associated surfaces. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 780, 2018. DOI: 10.3389/fmicb.2018.00780.

SHAFIQUE, T. *et al.* Screening, selection and development of Bacillus subtilis apr-IBL04 for hyper production of macromolecule alkaline protease. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 28, n. 2, p. 1494–1501, 2021. DOI: 10.1016/j.sjbs.2020.11.079.

SHAHI, N. *et al.* Xylanase : A Promising Enzyme. **Journal of Chemical Pharmaceutical Research**, v. 8, n. 3, p. 334–339 , 2016. Disponível em: <http://jocpr.com/vol8-iss3-2016/JCPR-2016-8-3-334-339.pdf>. Acesso em: 13 mai. 2024.

SHARMA, A. *et al.* Cellulases: Classification, Methods of Determination and Industrial Applications. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 179, n. 8, p. 1346–1380, 2016. DOI: 10.1007/s12010-016-2070-3.

SHARMA, A. K. *et al.* Isolation and Screening of Extracellular Protease Enzyme from Bacterial and Fungal Isolates of Soil. **International Journal of Scientific Research in Environmental Sciences**, v. 3, n. 9, p. 0334–0340, 2015. DOI: 10.12983/ijres-2015-p0334-0340.

SHARMA, M. *et al.* A review on microbial alkaline protease: An essential tool for various industrial approaches. **Industrial Biotechnology**, v. 15, n. 2, p. 69–78, 2019. DOI: 10.1089/ind.2018.0032.

SHARMA, M. SOOD, G.; CHAUHAN, A. Bioprospecting beneficial endophytic

bacterial communities associated with *Rosmarinus officinalis* for sustaining plant health and productivity. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 37, n. 135, p. 1-17, 2021. DOI: 10.1007/s11274-021-03101-7.

SHARMA, N.; MALLICK, S. A.; SHARMA, D. Amylase producing efficiency of *Bacillus* species isolated from Jammu soil. **Journal of Mycopathological Research**, v. 56, n. 2, p. 123–128, 2018. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/331072183_Amylase_producing_efficiency_of_Bacillus_species_isolated_from_Jammu_soil. Acesso em: 22 set. 2024.

SHARMA, Y.; FAGAN, J.; SCHAEFER, J. Ethnobotany, phytochemistry, cultivation and medicinal properties of Garden sage (*Salvia officinalis* L.). **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 8, n. 3, p. 3139–3148, 2019. Disponível em: <https://www.phytojournal.com/archives?year=2019&vol=8&issue=3&ArticleId=8498>. Acesso em: 18 set. 2024.

SHRIVASTAVA, M.; SHARMA, P.; SINGH, R. Microbial Quality Assurance of Dried Roots of *Chlorophytum borivillianum* Sant F (Safed Musli). **European Journal of Medicinal Plants**, v. 32, n. 9, p. 1–11, 2021. DOI: 10.9734/ejmp/2021/v32i930413.

SILANO, V. *et al.* Safety evaluation of the food enzyme β -amylase from *Bacillus flexus* strain AE-BAF. **EFSA Journal**, v. 19, n. 6, p. 1–15, 2021. DOI: 10.2903/j.efsa.2021.6635.

SINGH, B. *et al.* Isolation and polyphasic characterization of a novel hyper catalase producing thermophilic bacterium for the degradation of hydrogen peroxide. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 39, n. 11, p. 1759–1773, 2016.

SINGH, M. G.; CHANDRAVEER; TRIPATHI, A. M. Isolation and screening of lipase producing microorganisms from natural sources. **Indian Journal of Ecology**, v. 44, n. 1, p. 19–23, 2017. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/315535512_Isolation_and_Screening_of_Lipase_Producing_Microorganisms_from_Natural_Sources. Acesso em: 7 set. 2024.

SINHA, D. *et al.* Enhanced biogas production from Lantana camara via bioaugmentation of cellulolytic bacteria. **Bioresource Technology**, v. 340, p. 125652, 2021. DOI: 10.1016/j.biortech.2021.125652.

SOLANKI, P. *et al.* Microbial proteases: ubiquitous enzymes with innumerable uses. **3 Biotech**, v. 11, n. 428, p. 1–25, 2021. DOI: 10.1007/s13205-021-02928-Z.

STRUCKMANN POULSEN, J. *et al.* Characterisation of cellulose-degrading organisms in an anaerobic digester. **Bioresource Technology**, v. 351, p.

126933, 2022. DOI: 10.1016/j.biortech.2022.126933.

SUJITHA, P.; SHANTHI, C. Importance of enzyme specificity and stability for the application of proteases in greener industrial processing- a review. **Journal of Cleaner Production**, v. 425, p. 138915, 2023. DOI: 10.1016/j.jclepro.2023.138915.

SULISTIOWATI, R.; SUDIN; HARMAIN, R. M. Chitinase activity potential and identification of chitinolytic bacteria isolated of swimmer crab's cell. **International Journal of Agricultural and Biological Engineering**, v. 14, n. 3, p. 228–231, 2021. DOI: 10.25165/j.ijabe.20211403.5273.

SUN, F. *et al.* Production, purification and biochemical characterization of the microbial protease produced by *Lactobacillus fermentum* R6 isolated from Harbin dry sausages. **Process Biochemistry**, v. 89, p. 37–45, 2020. DOI: 10.1016/j.procbio.2019.10.029.

SZYMCZAK, T. *et al.* Various perspectives on microbial lipase production using agri-food waste and renewable products. **Agriculture (Switzerland)**, v. 11, n. 6, p. 540–562, 2021. DOI: 10.3390/agriculture11060540.

THAPA, S. *et al.* Biochemical Characteristics of Microbial Enzymes and Their Significance from Industrial Perspectives. **Molecular Biotechnology**, v. 61, n. 8, p. 579–601, 2019. DOI: 10.1007/s12033-019-00187-1.

TIRUMALAI, M. R. *et al.* *Bacillus safensis* FO-36b and *Bacillus pumilus* SAFR-032: A whole genome comparison of two spacecraft assembly facility isolates. **BMC Microbiology**, v. 18, n. 57, p. 1–16, 2018. DOI: 10.1186/s12866-018-1191-y.

TYAGI, D.; SHARMA, D. Production and Industrial Applications of Xylanase: A Review. **International Journal of Scientific Research & Engineering Trends** v. 7, n. 3, p. 2395–566 , 2021. Disponível em: https://ijsret.com/wp-content/uploads/2021/05/IJSRET_V7_issue3_446.pdf. Acesso em: 18 jul. 2024.

UNDERKOFER, L. A.; BARTON, R. R.; RENNERT, S. S. Production of Microbial Enzymes and Their Applications. **Microbiological Process Report**, v. 6, n. 3, p. 212–221, 1958. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/pdf/10.1128/am.6.3.212-221.1958>. Acesso em: 05 mai. 2024.

USMAN, A.; MOHAMMED, S.; MAMO, J. Production , Optimization , and Characterization of an Acid Protease from a Filamentous Fungus by Solid-State Fermentation. **International Journal of Microbiology**, v. 2021, n. 1, p. 6685963, 2021. DOI: 10.1155/2021/6685963.

VOS, M. *et al.* A comparison of rpoB and 16S rRNA as markers in pyrosequencing studies of bacterial diversity. **PLoS ONE**, v. 7, n. 2, p. e30600 , 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0030600.

- WANG, C. *et al.* Responsiveness extracellular electron transfer (EET) enhancement of anaerobic digestion system during start-up and starvation recovery stages via magnetite addition. **Bioresource Technology**, v. 272, p. 162–170, 2019. DOI: 10.1016/j.biortech.2018.10.013.
- WU, D. *et al.* Anaerobic digestion: A review on process monitoring. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 103, n. July 2018, p. 1–12, 2019. DOI: 10.1016/j.rser.2018.12.039.
- XU, R. *et al.* A critical review on the interaction of substrate nutrient balance and microbial community structure and function in anaerobic co-digestion. **Bioresource Technology**, v. 247, p. 1119–1127, 2018. DOI: 10.1016/j.biortech.2017.09.095.
- YASSIN, S. N.; JIRU, T. M.; INDRACANTI, M. Screening and Characterization of Thermostable Amylase-Producing Bacteria Isolated from Soil Samples of Afdera, Afar Region, and Molecular Detection of Amylase-Coding Gene. **International Journal of Microbiology** v. 2021, n. 1, p. 5592885, 2021. DOI: 10.1155/2021/5592885.
- YI, J. *et al.* Effect of increasing total solids contents on anaerobic digestion of food waste under mesophilic conditions: Performance and microbial characteristics analysis. **PLoS ONE**, v. 9, n. 7, 2014. DOI: 0.1371/journal.pone.0102548.
- YILDIRIM, E. *et al.* Improvement of biogas potential of anaerobic digesters using rumen fungi. **Renewable Energy**, v. 109, p. 346–353, 2017. DOI: 10.1016/j.renene.2017.03.021.
- YOUNAS, H. *et al.* Metabolic profile and molecular characterization of endophytic bacteria isolated from *Pinus sylvestris* L. with growth-promoting effect on sunflower. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 30, p. 40147–40161, 2023. DOI: 10.1007/s11356-022-25118-7.
- ZAFAR, A. *et al.* Efficient biomass saccharification using a novel cellobiohydrolase from *Clostridium clariflavum* for utilization in biofuel industry. **RSC Advances**, v. 11, n. 16, p. 9246–9261, 2021. DOI: 10.1039/d1ra00545f.
- ZAKOURA, M. *et al.* Performance evaluation of three mesophilic upflow anaerobic sludge blanket bioreactors treating olive mill wastewater: Flocculent and granular inocula tests, organic loading rate effect and anaerobic consortia structure. **Fuel**, v. 313, p. 122951, 2022. DOI: 10.1016/j.fuel.2021.122951.
- ZAMRI, M. F. M. A. *et al.* A comprehensive review on anaerobic digestion of organic fraction of municipal solid waste. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 137, p. 110637, 2021. DOI: 10.1016/j.rser.2020.110637.
- ZANGO, U. U.; IBRAHIM, M.; SULEIMAN, M. Effect of Chemical Mutagens on Alpha Amylase Activity of *Bacillus Amyloliquefaciens*. **International Journal of Scientific Research in Chemical Sciences**, v. 8, n. 1, p. 09–16, 2021.

Disponível em:

https://www.researchgate.net/publication/361433197_Effect_of_Chemical_Mutagens_on_Alpha_Amylase_Activity_of_Bacillus_Amyloliquefaciens. Acesso em: 25 set. 2024.

ZHANG, R. *et al.* Glycoside Hydrolase Family 39 β -Xylosidases Exhibit β -1,2-Xylosidase Activity for Transformation of Notoginsenosides: A New EC Subsubclass. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 67, n. 11, p. 3220–3228, 2019. DOI: 10.1021/acs.jafc.9b00027.

ZHAO, J. *et al.* Characterization of a novel lipase from *Bacillus licheniformis* NCU CS-5 for applications in detergent industry and biodegradation of 2,4-D butyl ester. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 176, p. 126–136, 2021. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2021.01.214.

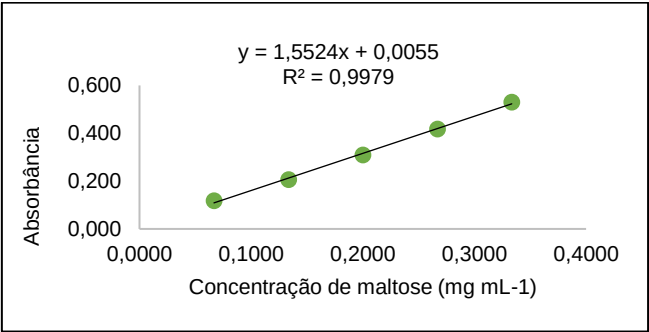
ANEXO A – Curva padrão

Tabela 20 – Curva padrão de maltose

Concentração solução padrão de maltose 1,0 mg mL ⁻¹ (mg mL ⁻¹)	Volume de solução padrão de maltose 1,0 mg mL ⁻¹ (µL)	Volume de tampão fosfato 0,2 M (pH 7,0) (µL)	Volume de DNS (µL)	Água destilada (µL)	Absorbância (540 nm)
0	0	1000	2000	5000	Branco
0,066	200	800	2000	5000	0,118
0,133	400	600	2000	5000	0,206
0,200	600	400	2000	5000	0,309
0,267	800	200	2000	5000	0,417
0,333	1000	0	2000	5000	0,530

Fonte: Elaborada pela autora (2024).

Figura 11 - Curva padrão da maltose



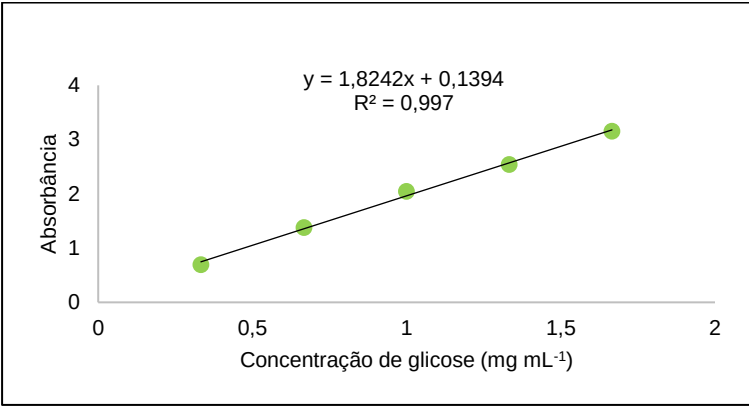
Fonte: Elaborada pela autora (2024).

Tabela 21 - Curva padrão da glicose

Concentração solução padrão de glicose 5,0 mg mL ⁻¹ (mg mL ⁻¹)	Volume de solução padrão de glicose 5,0 mg mL ⁻¹ (μL)	Volume de tampão citrato 50 mM (pH 4,8) (μL)	Volume de DNS (μL)	Água destilada (μL)	Absorbância (540 nm)
0,000	0	1000	2000	5000	Branco
0,333	200	800	2000	5000	0,696
0,667	400	600	2000	5000	1,380
1,000	600	400	2000	5000	2,045
1,333	800	200	2000	5000	2,540
1,666	1000	0	2000	5000	3,155

Fonte: Elaborada pela autora (2024).

Figura 12 - Curva padrão da glicose



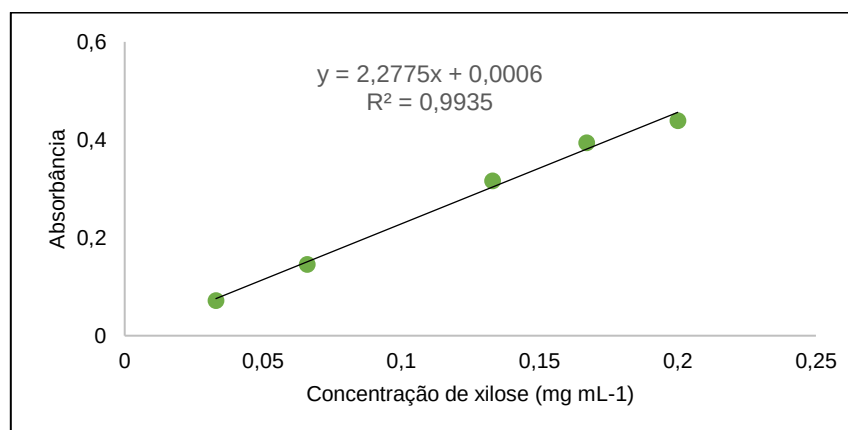
Fonte: Elaborada pela autora (2024).

Tabela 22 - Curva padrão da xilose

Concentração solução padrão de xilose 1,0 mg mL ⁻¹ (mg mL ⁻¹)	Volume de solução padrão de xilose 1,0 mg mL ⁻¹ (μL)	Volume de tampão citrate 50 mM (pH 4,8) (μL)	Volume de DNS (μL)	Água destilada (μL)	Absorbância (540 nm)
0	0	1000	2000	5000	Branco
0,033	100	900	2000	5000	0,072
0,066	200	800	2000	5000	0,146
0,133	400	600	2000	5000	0,316
0,167	500	500	2000	5000	0,394
0,200	600	400	2000	5000	0,439

Fonte: Elaborada pela autora (2024).

Figura 13 - Curva padrão da xilose



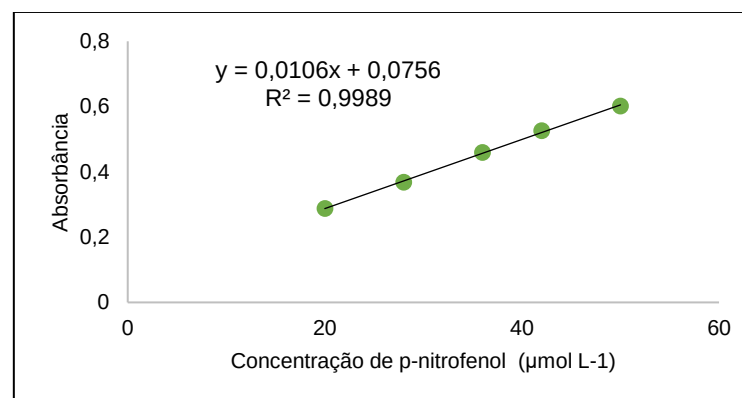
Fonte: Elaborada pela autora (2024).

Tabela 23 - Curva padrão do p-nitrofenol

Concentração solução padrão do p-nitrofenol (50 mM) ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Volume de solução padrão do p- nitrofenol (50 mM) (μL)	Volume de tampão fosfato de sódio 25 mM (pH 7,0) (μL)	Água destilada (μL)	Absorbância (540 nm)
0	0	1000	5000	Branco
20	400	600	5000	0,288
28	560	540	5000	0,368
36	720	280	5000	0,459
42	840	160	5000	0,526
50	1000	0	5000	0,601

Fonte: Elaborada pela autora (2024).

Figura 14 - Curva padrão do p-nitrofenol



Fonte: Elaborada pela autora (2024).