v7.n8.2026

REVISTA CIENTÍFICA - RECIMA21 ISSN 2675-6218

PRODUÇÃO DE AMILASES E CELULASES MICROBIANAS POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA EM BATELADA SIMPLES

PRODUCTION OF MICROBIAL AMYLASES AND CELLULASES BY SIMPLE BATCH SUBMERGED FERMENTATION

PRODUCCIÓN DE AMILASAS Y CELULASAS MICROBIANAS MEDIANTE FERMENTACIÓN SUMERGIDA EN LOTES SIMPLES

Haroldo Yukio Kawaguti[1], Livia de Carvalho Fontes Matsumoto[1], Nathalia Ramalho Moreira[1]

e788680
https://doi.org/10.47820/recima21.v7i8.8680

PUBLICADO: 08/2026

RESUMO

O potencial biotecnológico de uma cepa de *Bacillus* sp. foi avaliado quanto à produção de enzimas hidrolíticas por fermentação submersa. A caracterização qualitativa, realizada pela metodologia “cup plate”, confirmou a produção multienzimática da cepa, evidenciada pela formação de halos de hidrólise em substratos específicos. Os resultados destacam a versatilidade metabólica do isolado, reforçando o interesse industrial na obtenção de coquetéis enzimáticos para o processamento de resíduos agroindustriais e bioconversão de biomassa. A análise da cinética fermentativa demonstrou que a síntese de amilases e celulases ocorre de forma associada ao metabolismo primário, com produção acelerada durante a fase exponencial de crescimento e atividade máxima atingida após 48 horas de cultivo. Observou-se uma predominância da atividade celulolítica, indicando elevada aptidão da cepa para aplicações em processos de sacarificação e produção de açúcares fermentescíveis. A estabilização da atividade enzimática na fase estacionária sugere uma transição metabólica esperada para o gênero *Bacillus*. Assim, a linhagem de *Bacillus* sp. avaliada apresenta características cinéticas e perfis de secreção compatíveis com microrganismos de uso industrial, evidenciando seu potencial para o desenvolvimento de processos biotecnológicos sustentáveis.

PALAVRAS-CHAVE: Carboidrases. Cinética de fermentação. Hidrolases.

ABSTRACT

The biotechnological potential of a Bacillus sp. strain was evaluated regarding the production of hydrolytic enzymes via submerged fermentation. Qualitative characterization, performed using the “cup plate” methodology, confirmed the strain multi-enzymatic production, as evidenced by the formation of hydrolysis halos on specific substrates. The results highlight the metabolic versatility of the isolate, reinforcing industrial interest in obtaining enzyme cocktails for the processing of agro-industrial waste and biomass bioconversion. Analysis of fermentation kinetics demonstrated that the synthesis of amylases and cellulases is associated with primary metabolism, with accelerated production during the exponential growth phase and maximum activity reached after 48 hours of cultivation. A predominance of cellulolytic activity was observed, indicating the strain's high aptitude for applications in saccharification processes and the production of fermentable sugars. The stabilization of enzymatic activity in the stationary phase suggests a metabolic transition typical of the Bacillus genus. Thus, the evaluated Bacillus sp. strain exhibits kinetic characteristics and secretion profiles compatible with industrially relevant microorganisms, highlighting its potential for the development of sustainable biotechnological processes.

KEYWORDS: *Carbohydrases. Fermentation kinetics. Hydrolases.*

[1] Centro Universitário SENAI São Paulo (UniSENAI-SP), doutor.

Este artigo é publicado em acesso aberto (Open Access) sob a licença Creative Commons Atribuição 4.0 Internacional (CC-BY), que permite uso, distribuição e reprodução irrestritos em qualquer meio, desde que o autor original e a fonte sejam creditados.

RESUMEN
El potencial biotecnológico de una cepa de Bacillus sp. fue evaluado en relación con la producción de enzimas hidrolíticas mediante fermentación sumergida. La caracterización cualitativa, realizada mediante la metodología 'cup plate', confirmó la producción multienzimática de la cepa, como lo evidencia la formación de halos de hidrólisis en sustratos específicos. Los resultados destacan la versatilidad metabólica del aislado, reforzando el interés industrial en la obtención de cócteles enzimáticos para el procesamiento de residuos agroindustriales y la bioconversión de biomasa. El análisis de la cinética de fermentación demostró que la síntesis de amilasas y celulasas está asociada al metabolismo primario, con una producción acelerada durante la fase de crecimiento exponencial y una actividad máxima alcanzada tras 48 horas de cultivo. Se observó una predominancia de actividad celulolítica, lo que indica una elevada aptitud de la cepa para su aplicación en procesos de sacarificación y producción de azúcares fermentables. La estabilización de la actividad enzimática en la fase estacionaria sugiere una transición metabólica típica del género Bacillus. De este modo, la cepa de Bacillus sp. evaluada presenta características cinéticas y perfiles de secreción compatibles con los microorganismos utilizados en la industria, lo que pone de relieve su potencial para el desarrollo de procesos biotecnológicos sostenibles.

PALABRAS CLAVE: *Carbohidrasas. Cinética de fermentación. Hidrolasas.*

INTRODUÇÃO

O gênero *Bacillus* é a plataforma biotecnológica mais versátil utilizada industrialmente, fundamentada por um genoma de grande flexibilidade, que permite a síntese de uma variedade de compostos de alto valor agregado através de diversificadas vias metabólicas (Schallmey; Singh; Ward, 2004; Su *et al.*, 2020). A capacidade de produção de metabólitos secundários por *Bacillus* spp. posicionam essas bactérias como fábricas celulares capazes de sintetizar moléculas complexas, com propriedades únicas (Stein, 2005; Caulier *et al.*, 2019). Esses compostos desempenham funções ambientais vitais, como a proteção de plantas na rizosfera contra fitopatógenos através da secreção de agentes antibacterianos e antifúngicos (surfactina, iturina, fengicina) (Ongena; Jacques, 2008; Caulier *et al.*, 2019; Dimkić *et al.*, 2022). A classificação GRAS (*Generally Recognized as Safe*), conferida a muitas cepas do gênero, elimina barreiras regulatórias para sua utilização em indústrias de alimentos, cosméticos e farmacêuticas (Earl; Losick; Kolter, 2008; Su *et al.*, 2020). A integração de *Bacillus* spp. em modelos de biorrefinaria, conectando a produção de biomoléculas de alto valor com o tratamento de resíduos agrícolas, representa o estado da arte na biotecnologia sustentável (Nielsen; Keasling, 2016; Su *et al.*, 2020). Na agricultura moderna, formulações contendo endósporos viáveis de *Bacillus* spp. são aplicadas diretamente no solo como biofertilizantes e promotores de crescimento vegetal, colonizando as raízes e induzindo a Resistência Sistêmica Adquirida (RSA) contra estresses bióticos e abióticos, como na seca prolongada (Ongena; Jacques, 2008;

Este artigo é publicado em acesso aberto (Open Access) sob a licença Creative Commons Atribuição 4.0 Internacional (CC-BY), que permite uso, distribuição e reprodução irrestritos em qualquer meio, desde que o autor original e a fonte sejam creditados.

Hashem *et al.*, 2019; Backer *et al.*, 2018). Em relação ao potencial de aplicação industrial, as bactérias do gênero *Bacillus* são importantes produtoras de enzimas hidrolíticas com aplicações em diferentes segmentos industriais como a alimentícia, a farmacêutica, de bebidas, a têxtil, de biocombustíveis, de cosméticos, entre outras (Farias; Kawaguti; Koblitz, 2021; Schallmey; Singh; Ward, 2004; Contesini *et al.*, 2018; Anbu *et al.*, 2013). Deste modo, o potencial biotecnológico de uma cepa de *Bacillus* sp. foi avaliado quanto à produção de enzimas hidrolíticas para o futuro desenvolvimento de processos biotecnológicos sustentáveis.

REFERENCIAL TEÓRICO

Enzimas Hidrolíticas Microbianas

As enzimas hidrolíticas, obtidas a partir de microrganismos, representam uma classe fundamental de biocatalisadores que são aplicados em inúmeros processos industriais (Singh *et al.*, 2016; Anbu *et al.*, 2013; de Souza; Kawaguti, 2021). A versatilidade metabólica dos microrganismos permite que estes atuem como fábricas celulares eficientes, produzindo enzimas de alta especificidade que superam frequentemente os catalisadores químicos convencionais em termos de sustentabilidade, seletividade e condições operacionais (Singh *et al.*, 2016; Bornscheuer *et al.*, 2012). Atualmente, a biotecnologia moderna concentra-se na otimização da produção dessas enzimas por meio do controle de parâmetros físico-químicos como temperatura, pH, tensão de oxigênio dissolvido e composição do meio de cultura, sendo o gênero *Bacillus* um dos mais importantes devido à sua capacidade natural de secreção extracelular (Contesini *et al.*, 2018; Schallmey; Singh; Ward, 2004). A exploração de ambientes extremos, como fontes termais, solos salinos e depósitos minerais, tem possibilitado a descoberta de enzimas com propriedades únicas, capazes de resistir a condições severas que inativariam proteínas convencionais (Dumorné *et al.*, 2017; Sarmiento *et al.*, 2015; Niehaus *et al.*, 1999). Além disso, a aplicação da metagenômica e da bioinformática tem permitido revelar “clusters” genéticos anteriormente silenciados, fornecendo novas ferramentas para a engenharia de proteínas direcionada (Robinson *et al.*, 2021; Uchiyama; Miyazaki, 2009). A transição para uma economia circular estabelece que a produção dessas enzimas seja integrada à utilização de resíduos amiláceos, lignocelulósicos e agroindustriais como substratos, diminuindo custos e valorizando cadeias produtivas (Chandra *et al.*, 2020; Singh *et al.*, 2016). A eficiência das enzimas hidrolíticas é fundamental para a química verde, pois permite processos de extração e processamento com menor geração de subprodutos tóxicos, menor consumo energético e maior

Este artigo é publicado em acesso aberto (Open Access) sob a licença Creative Commons Atribuição 4.0 Internacional (CC-BY), que permite uso, distribuição e reprodução irrestritos em qualquer meio, desde que o autor original e a fonte sejam creditados.

pureza do produto final, consolidando seu papel como promotores da inovação industrial no século XXI (Singh *et al.*, 2016; Bornscheuer *et al.*, 2012). As principais enzimas hidrolíticas de interesse industrial, produzidas por microrganismos, são as proteases e as carboidrases que incluem as amilases, celulases e pectinases (de Souza; Kawaguti, 2021; Singh *et al.*, 2016; Anbu *et al.*, 2013).

Proteases

As proteases alcalinas produzidas por *Bacillus* spp. constituem o maior segmento do mercado mundial de enzimas, sendo indispensáveis para a indústria de detergentes devido à sua capacidade de hidrolisar proteínas em condições de pH elevado (Razzaq *et al.*, 2019; Contesini *et al.*, 2018). Além disso, essas enzimas desempenham papéis críticos no processamento de alimentos, onde são utilizadas para a hidrólise de proteínas para melhorar as propriedades funcionais, reduzir a alergenicidade e auxiliar na maturação de laticínios (Contesini *et al.*, 2018; Sharma *et al.*, 2017). Muitas dessas enzimas alcalinas são serino proteases e baseiam-se em uma tríade de aminoácidos no centro catalítico, composta por resíduos de aspartato, histidina e serina, cujo arranjo espacial altamente conservado é diretamente responsável pela eficiência na clivagem de ligações peptídicas, sendo utilizadas, por exemplo, na coagulação do leite para a produção de queijos (Rawlings *et al.*, 2024; Contesini *et al.*, 2018). A estabilidade frente a surfactantes, agentes oxidantes e condições de estresse a altas temperaturas tornam as proteases de *Bacillus* spp. altamente competitivas para aplicações em processos de beneficiamento de couro e na indústria de laticínios. Muitas dessas enzimas são aspartato proteases com atuação em pH ácido (Razzaq *et al.*, 2019; Sharma *et al.*, 2017). O desenvolvimento científico recente concentra-se na utilização de técnicas de evolução dirigida para modificar o sítio ativo destas enzimas, visando maior tolerância a íons metálicos e solventes orgânicos (Bornscheuer *et al.*, 2019; Arnold, 2018). A regulação da produção é importante, sendo frequentemente controlada por mecanismos de repressão catabólica por nitrogênio ou carbono, os quais vêm sendo manipulados geneticamente para aumentar o rendimento (Contesini *et al.*, 2018; van Dijl; Hecker, 2013). A purificação destas moléculas segue padrões rigorosos para atender indústrias farmacêuticas, onde são aplicadas na produção de nutracêuticos e agentes anti-inflamatórios de origem natural, consolidando a relevância contínua das proteases na biotecnologia moderna (Contesini *et al.*, 2018; Sharma *et al.*, 2017). Além dessas aplicações tradicionais, as proteases de matriz alcalina têm se destacado na gestão ambiental através do tratamento biológico de resíduos ricos em queratina, como penas da indústria avícola e pelos de

Este artigo é publicado em acesso aberto (Open Access) sob a licença Creative Commons Atribuição 4.0 Internacional (CC-BY), que permite uso, distribuição e reprodução irrestritos em qualquer meio, desde que o autor original e a fonte sejam creditados.

curtumes, que são quimicamente recalcitrantes e poluentes (Vidmar; Vodovnik, 2018). Na indústria de panificação e processamento de cereais, o controle preciso da atividade proteolítica permite modificar a elasticidade do glúten de forma controlada, resultando em massas com propriedades reológicas otimizadas para biscoitos e pães especiais (Raveendran *et al.*, 2018). Essa flexibilidade operacional, aliada à capacidade de secreção em alta densidade celular, consolida as proteases bacterianas como referências em engenharia de bioprocessos (Razzaq *et al.*, 2019; Contesini *et al.*, 2018).

Amilases

As amilases, em particular as α-amilases de *Bacillus* spp. desempenham um papel importante na hidrólise industrial do amido, transformando polissacarídeos complexos em açúcares simples essenciais para a indústria de xaropes e fermentação alcoólica (de Souza; Kawaguti, 2021; Farias; Kawaguti; Koblitz, 2021; Souza; Magalhães, 2010; van der Maarel *et al.*, 2002). O mecanismo de ação baseia-se na hidrólise aleatória de ligações glicosídicas α-(1,4), o que reduz rapidamente a viscosidade de suspensões concentradas de amido gelatinizado (van der Maarel *et al.*, 2002). A aplicação destas enzimas na produção de bioetanol de primeira geração é fator relevante da economia de biocombustíveis, onde a eficiência da quebra da estrutura cristalina do amido é determinante para o rendimento final (Souza; Magalhães, 2010; van der Maarel *et al.*, 2002). As amilases de *Bacillus* spp. destacam-se pela sua termoestabilidade natural e resistência a variações de pH, o que permite o uso direto em processos de liquefação em temperaturas mais elevadas (Farias; Kawaguti; Koblitz, 2021; Souza; Magalhães, 2010; van der Maarel *et al.*, 2002). O mercado atual demanda variantes destas enzimas que operem com baixas concentrações de íons cálcio, o que é um fator crítico para evitar a inibição em etapas subsequentes do processamento de alimentos e bebidas (Souza; Magalhães, 2010; van der Maarel *et al.*, 2002). Pesquisas recentes exploram a imobilização de amilases em suportes para permitir a reutilização do biocatalisador e aumentar sua estabilidade operacional em reatores de leito fixo (Souza; Magalhães, 2010). A integração de novas cepas de *Bacillus* spp. com alta capacidade de secreção através de ferramentas de engenharia metabólica tem impulsionado a produtividade e reduzido drasticamente os custos operacionais, tornando as amilases um exemplo de sucesso na biotecnologia de enzimas industriais (Westers; Westers; Quax, 2004; van der Maarel *et al.*, 2002). Na indústria de panificação, a adição controlada de α-amilases retarda o processo de retrogradação do amido, atuando diretamente como um agente natural contra o envelhecimento do pão e melhorando a

Este artigo é publicado em acesso aberto (Open Access) sob a licença Creative Commons Atribuição 4.0 Internacional (CC-BY), que permite uso, distribuição e reprodução irrestritos em qualquer meio, desde que o autor original e a fonte sejam creditados.

textura do miolo por períodos prolongados (van der Maarel *et al.*, 2002). O sinergismo catalítico estabelecido entre as amilases e outras enzimas, como as pululanases e glicoamilases, é explorado em processos de sacarificação simultânea para maximizar a conversão de dextrinas em glicose pura (Farias; Kawaguti; Koblitz, 2021; van der Maarel *et al.*, 2002). Em lavanderias industriais, o desenvolvimento de amilases com atividade em baixas temperaturas representa uma aplicação tecnológica importante, viabilizando a remoção completa de manchas à base de amido sem a necessidade de aquecimento da água de lavagem (Souza; Magalhães, 2010; van der Maarel *et al.*, 2002). Assim, o contínuo aprimoramento dessas enzimas assegura sua participação nas rotas tecnológicas voltadas à diminuição do uso de recursos naturais, diminuindo os impactos ambientais, e sustentabilidade industrial (Souza; Magalhães, 2010).

Celulases

As celulases representam o grupo de enzimas mais complexo e essencial para o aproveitamento da biomassa lignocelulósica, sendo compostas por um coquetel sinérgico de endoglucanases, celobiohidrolases e β-glicosidases (de Souza; Kawaguti, 2021; Kuhad; Gupta; Singh, 2011; Wilson, 2011; Lynd *et al.*, 2002). Enquanto as endoglucanases clivam as regiões amorfas internas da celulose, as celobiohidrolases atuam progressivamente nas extremidades das cadeias cristalinas, liberando celobiose, que é subsequentemente convertida em glicose livre pela ação das β-glicosidases (Wilson, 2011; Lynd *et al.*, 2002). A degradação eficiente da celulose é o maior desafio tecnológico para a viabilidade do bioetanol de segunda geração e outros bioprodutos derivados de resíduos agrícolas e florestais (Himmel *et al.*, 2007; Zhang; Himmel; Mielenz, 2006; Lynd *et al.*, 2002). Devido à estrutura recalcitrante da celulose, as enzimas de *Bacillus* spp. estão sendo consideradas por sua capacidade de atuar em ambientes de alta densidade de sólidos, superando as limitações de inibição por produto, como a glicose e celobiose (Sadhu; Maiti, 2013). A aplicação das celulases vai além da produção de combustível, estendendo-se à indústria de papel e celulose, onde são utilizadas para reduzir a energia necessária no beneficiamento de fibras (de Souza; Kawaguti, 2021; Kuhad; Gupta; Singh, 2011; Bhat, 2000). O uso de técnicas de *in silico* tem permitido o “design” de novas celulases com maior afinidade pelos sítios de ligação da celulose e maior resistência térmica, garantindo estabilidade durante o longo tempo de residência exigido nos processos de sacarificação (Payne *et al.*, 2015; Wilson, 2011). A rigidez estrutural dos complexos de lignina-carboidrato demanda o desenvolvimento de celulases bacterianas que possuam módulos de ligação ao carboidrato otimizados para guiar o domínio catalítico diretamente às fibras de celulose expostas (Gilbert *et*

Este artigo é publicado em acesso aberto (Open Access) sob a licença Creative Commons Atribuição 4.0 Internacional (CC-BY), que permite uso, distribuição e reprodução irrestritos em qualquer meio, desde que o autor original e a fonte sejam creditados.

al., 2013; Boraston *et al.*, 2004). O interesse no gênero *Bacillus* tem aumentado devido à estabilidade superior de suas celulases em condições alcalinas e teor de sais moderadas, um perfil catalítico raro entre os fungos filamentosos que dominam o mercado atual (Sadhu; Maiti, 2013). Na indústria têxtil, essas enzimas são fundamentais no processo de biopolimento de tecidos de algodão, eliminando microfibrilas salientes para conferir maciez e prevenir a formação de “pilling” após ciclos repetidos de lavagem (Kuhad; Gupta; Singh, 2011; Bhat, 2000).

Pectinases

As pectinases são um grupo diversificado de enzimas que degradam a pectina, sendo fundamentais para a indústria de sucos, onde atuam na clarificação e aumento do rendimento de extração do suco ao diminuir sua viscosidade (de Souza; Kawaguti, 2021; Amin *et al.*, 2019; Kashyap *et al.*, 2001; Jayani; Saxena; Gupta, 2005). A atuação sinérgica entre pectinases inclui endopoligalacturonases que clivam a cadeia de ácido galacturônico e pectinametilesterases que removem grupos metoxila, desestabilizando a matriz coloidal dos frutos (de Souza; Kawaguti, 2021; Jayani; Saxena; Gupta, 2005; Kashyap *et al.*, 2001). O gênero *Bacillus* fornece uma fonte abundante dessas enzimas, que são importantes por sua estabilidade em condições de processamento de alimentos (Amin *et al.*, 2019; Hoondal *et al.*, 2002). A aplicação das pectinases estende-se também à indústria têxtil, facilitando a degomagem de fibras naturais, como o algodão e o linho, sem a necessidade de agentes químicos agressivos (Jayani; Saxena; Gupta, 2005; Hoondal *et al.*, 2002). A viabilidade econômica dessas pectinases está ligada ao uso de subprodutos industriais ricos em pectina, como cascas de cítricos, na própria formulação do meio de cultivo para a fermentação (Amin *et al.*, 2019; Kashyap *et al.*, 2001). A engenharia genética viabiliza a obtenção de cepas que produzam pectinases com perfis enzimáticos específicos, como poligalacturonases e pectinaliases, permitindo um controle preciso sobre o grau de hidrólise (Amin *et al.*, 2019). Atualmente, a pesquisa dedica esforços para entender a estrutura cristalina dessas enzimas, visando otimizar sua interação com o substrato complexo e aumentar a durabilidade em ciclos sucessivos de utilização, consolidando sua importância nas indústrias de alimentos e fibras sustentáveis. No processamento de café e cacau, a aplicação de coquetéis pectinolíticos acelera a remoção da mucilagem hidrofílica ao redor dos grãos, reduzindo o tempo de fermentação espontânea e minimizando o risco de contaminações por fungos produtores de micotoxinas (Lee *et al.*, 2015; Esquivel; Jiménez, 2012; Abbott; Boraston, 2008). Além disso, o tratamento enzimático prévio de polpas de frutas otimiza os fluxos de filtração por membranas, prevenindo a rápida obstrução dos poros do filtro e diminuindo os ciclos de paradas operacionais

Este artigo é publicado em acesso aberto (Open Access) sob a licença Creative Commons Atribuição 4.0 Internacional (CC-BY), que permite uso, distribuição e reprodução irrestritos em qualquer meio, desde que o autor original e a fonte sejam creditados.

para limpeza química (Jayani; Saxena; Gupta, 2005; Kashyap *et al.*, 2001). Essas propriedades estabelecem as pectinases bacterianas como ferramentas biocatalíticas indispensáveis para garantir a integridade nutricional e o rendimento econômico na agroindústria moderna (Amin *et al.*, 2019; Hoondal *et al.*, 2002).

METODOLOGIA

Microrganismo

A cepa de *Bacillus* sp. foi preservada em tubos contendo meio de cultura ágar nutriente sólido e inclinado, composto de peptona animal 5,0% (m/v), extrato de carne 1,5% (m/v), extrato de levedura 1,5% (m/v), cloreto de sódio 5,0% (m/v) e ágar 15,0% (m/v), sob camada de óleo mineral a 5°C.

Caracterização qualitativa das enzimas hidrolíticas

A indução da produção de enzimas hidrolíticas foi realizada por fermentação submersa, utilizando-se frascos Erlenmeyer sob agitação orbital, contendo meios de cultura específicos, descritos a seguir. A caracterização qualitativa das enzimas produzidas foi realizada através de ensaios utilizando-se placas de Petri contendo meio sólido segundo metodologia “cup plate”.

Indução da produção de enzimas hidrolíticas por fermentação submersa

A cepa de *Bacillus* sp., preservada em óleo mineral como descrito no item anterior, foi inoculada com auxílio de alça de platina em tubos contendo meio de cultura sólido ágar nutriente inclinado, e incubada em estufa a 37°C (± 2°C) por 24 horas, antes da transferência para os meios líquidos de indução. Após incubação, uma alçada da linhagem microbiana foi inoculada em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 25 mL de meio líquido de indução apropriado, descrito a seguir, e incubados a 37°C, sob agitação orbital a 150 rpm, por 72 horas. Os meios líquidos de indução (Manachini *et al.*, 1987; com modificações) foram compostos de: extrato de levedura 0,1% (m/v); fosfato de amônio dibásico 0,7% (m/v); fosfato dibásico de potássio 0,15% (m/v); sulfato de magnésio heptaidratado 0,05% (m/v); cloreto de cálcio diidratado 0,03% (m/v); um dos

Este artigo é publicado em acesso aberto (Open Access) sob a licença Creative Commons Atribuição 4.0 Internacional (CC-BY), que permite uso, distribuição e reprodução irrestritos em qualquer meio, desde que o autor original e a fonte sejam creditados.

substratos indutores [1,0% (m/v) de caseína para protease; ou 1,0% (m/v) de pectina cítrica para pectinases; ou 1,0% (m/v) de carboximetilcelulose para celulases; ou 1,0% (m/v) de amido solúvel para amilases]; e o pH ajustado para 7,0 com solução 1M de hidróxido de sódio.

Recuperação das enzimas hidrolíticas do meio fermentado

Os meios líquidos de indução, fermentados pelo microrganismo, foram separados da massa celular. Os meios foram centrifugados a 3.000 x g, a 5°C (± 2°C), por 30 minutos. A massa celular foi descartada e o sobrenadante, utilizado como extrato enzimático bruto.

Caracterização qualitativa da produção de enzimas hidrolíticas

A verificação qualitativa da atividade das enzimas hidrolíticas produzidas foi realizada através da metodologia “cup plate” (Rose; Miller, 1939; Dingle *et al.*, 1953; Oliveira *et al.*, 2006; com modificações). Os ensaios foram realizados pela estimativa qualitativa da atividade enzimática em placas de Petri contendo meio sólido e substrato específico. Os meios sólidos para a detecção das enzimas hidrolíticas secretadas foram compostos de ágar bacteriológico 1,5% (m/v); um substrato específico [1,0% (m/v) de gelatina para proteases; ou 1,0% (m/v) de pectina cítrica para pectinases; ou 1,0% (m/v) de carboximetilcelulose para celulase; ou 1,0% (m/v) de amido solúvel)], e o pH ajustado para 7,0 com solução 1M de hidróxido de sódio. Alíquotas de 150 µL do extrato enzimático bruto, recuperados do meio de indução fermentado como descrito no item anterior, foram aplicadas nos orifícios de 5 mm de diâmetro nas placas de Petri em meio sólido, contendo o substrato específico. As placas foram incubadas a 25°C (± 2°C), por 24 horas, com posterior revelação e observação de halo de degradação do meio sólido. A revelação, observação da formação de halo, foi realizada de modo distinto para cada substrato: placas com gelatina dispensou revelador devido a formação de halo incolor; caso necessário, adicionou-se solução de ácido acético 5,0% (v/v) para reforçar a visualização do halo; placas contendo pectina cítrica, carboximetilcelulose e amido solúvel utilizou-se, para revelação, a adição de 5 mL de solução de lugol com descarte do revelador após 30 segundos de contato. A estimativa da dosagem qualitativa da atividade enzimática das enzimas hidrolíticas foi determinada através da relação entre o diâmetro do halo de degradação e o diâmetro dos poços perfurados, sendo expressa como índice enzimático de atividade (IEA), segundo a equação abaixo:

IEA = diâmetro do halo descolorido (mm)/diâmetro dos poços perfurados (mm)

Este artigo é publicado em acesso aberto (Open Access) sob a licença Creative Commons Atribuição 4.0 Internacional (CC-BY), que permite uso, distribuição e reprodução irrestritos em qualquer meio, desde que o autor original e a fonte sejam creditados.

O diâmetro dos halos foi medido com auxílio de paquímetro. No caso de os diâmetros dos poços serem fixos pode-se referenciar a atividade enzimática somente pelo diâmetro do halo descolorido.

Cinética de fermentação da cepa de *Bacillus* sp. potencialmente produtora de amilases e celulases

A cinética de fermentação da cepa de *Bacillus* sp. foi realizada utilizando-se frascos Erlenmeyer sob agitação, e visou verificar os estágios de desenvolvimento do microrganismo e a produção de amilases e celulases. Uma alçada da cultura de *Bacillus* sp., preservada em óleo mineral como descrito em item anterior, foi inoculada para tubos contendo ágar nutriente inclinado e incubados a 37°C por 24 horas. Posteriormente, uma alçada do microrganismo foi inoculada para frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 25 mL de caldo nutriente composto de peptona 5,0% (m/v), extrato de carne 1,5% (m/v), extrato de levedura 1,5% (m/v), cloreto de sódio 5,0% (m/v), e pH ajustado para 7,0 com solução 1M de hidróxido de sódio e incubados a 37°C, sob agitação a 150 rpm. Após 24 horas, uma alíquota de 15 mL foi transferida para frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 300 mL de meio de cultura líquido composto de extrato de levedura 0,1% (m/v); fosfato de amônio dibásico 0,7% (m/v); fosfato dibásico de potássio 0,15% (m/v); sulfato de magnésio heptaidratado 0,05% (m/v); cloreto de cálcio diidratado 0,03% (m/v); amido solúvel 1,0 % (m/v) para produção de amilases ou carboximetilcelulose 1,0% (m/v) para produção de celulases, e pH ajustado a 7,0 com solução 1M de hidróxido de sódio. Os frascos, em duplicata, foram incubados sob agitação orbital a 150 rpm a 37°C. Alíquotas de 10,0 mL do meio de fermentação foram retiradas em diferentes tempos de fermentação. As amostras foram analisadas, como descrito nos itens abaixo, em relação a estimativa do crescimento celular pela densidade óptica e em relação a atividade enzimática.

Estimativa do crescimento celular por densidade óptica

As alíquotas de 10,0 mL foram acondicionadas em tubos cônicos e centrifugadas a 3.000 rpm, a 5°C, por 30 minutos. Posteriormente, o sobrenadante foi utilizado como extrato enzimático bruto na atividade enzimática e a massa celular foi lavada uma vez com solução 0,85% (m/v) de cloreto de sódio e centrifugada. Na sequência, o sobrenadante foi descartado, a massa celular foi ressuspendida em 10 mL de solução salina e a leitura foi feita em espectrofotômetro a 620nm, contra solução 0,85% (m/v) de

Este artigo é publicado em acesso aberto (Open Access) sob a licença Creative Commons Atribuição 4.0 Internacional (CC-BY), que permite uso, distribuição e reprodução irrestritos em qualquer meio, desde que o autor original e a fonte sejam creditados.

NaCl; caso houvesse necessidade (Abs_{620nm} > 0,5), a suspensão contendo o microrganismo foi diluída para a leitura.

Determinação da atividade enzimática de amilases e celulases

As estimativas das atividades enzimáticas foram realizadas segundo método DNS com modificações. As amostras de extrato bruto foram colocadas em solução tamponada de tampão fosfato 0,05M, pH 7,0 ou com substrato amido solúvel 0,5 % (m/v) para atividade de amilases ou substrato carboximetilcelulose 0,5 % (m/v) para atividade de celulases. As reações foram realizadas a 40°C por 15 minutos. Cada tubo continha 1,0 mL da solução de substrato específico e 1,0 mL do extrato enzimático bruto. Após a reação, adicionou-se 1,0 mL de solução de ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS) e os tubos foram colocados em banho maria em ebulição por 5 minutos. Na sequência, os tubos foram resfriados e os volumes completados a 10,0 mL com água destilada. As amostras foram homogeneizadas e analisadas em espectrofotômetro (λ = 540nm). Uma unidade de atividade de amilases ou de celulases foi definida como a quantidade de açúcar redutor formada, expressa em miligramas de glicose, por minuto e por mL de amostra, nas condições padrão de ensaio (pH 7,0 e 40 °C).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A produção de enzimas hidrolíticas, pela cepa de *Bacillus* sp., foi realizada através da fermentação submersa em frascos Erlenmeyer, sob agitação orbital, em meios líquidos contendo indutores. Os ensaios de caracterização qualitativa das enzimas produzidas foram realizados através da metodologia “cup plate”.

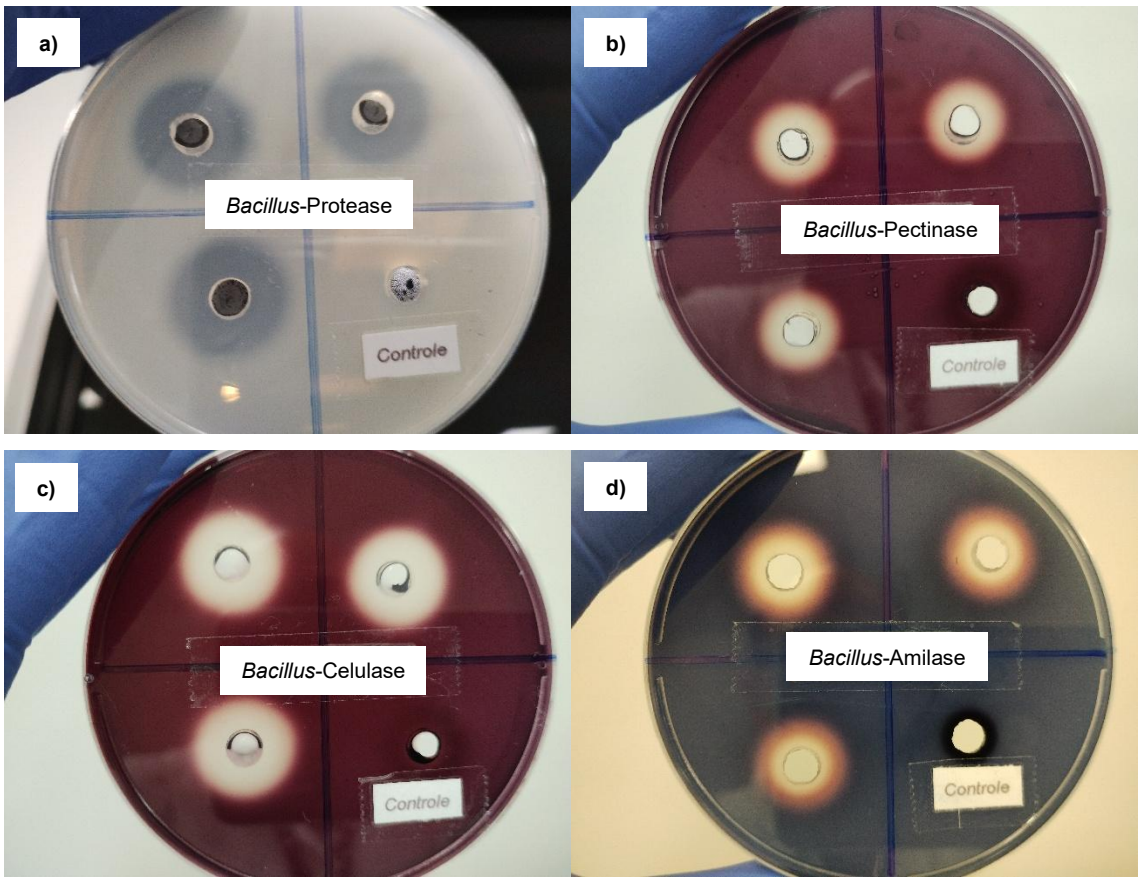
Caracterização qualitativa da produção de enzimas hidrolíticas

A estimativa qualitativa da atividade das enzimas hidrolíticas produzidas foi verificada pela metodologia “cup plate” (Figura 1).

Figura 1. Placas de Petri contendo meio de cultura sólido e substrato inoculadas, nos poços, com extrato enzimático bruto de *Bacillus* sp.: a) meio contendo substrato gelatina para determinação qualitativa de atividade de proteases; b) meio contendo substrato pectina cítrica para determinação qualitativa de atividade de pectinases; c) meio contendo substrato

Este artigo é publicado em acesso aberto (Open Access) sob a licença Creative Commons Atribuição 4.0 Internacional (CC-BY), que permite uso, distribuição e reprodução irrestritos em qualquer meio, desde que o autor original e a fonte sejam creditados.

carboximetilcelulose para determinação qualitativa de atividade de celulases; d) meio contendo substrato amido solúvel para determinação qualitativa de atividade de amilases



Fonte: do Autor

Na Figura 1a observa-se a formação de halo translúcido ao redor dos poços contendo o extrato bruto obtido do cultivo em meio líquido suplementado com caseína, indicando a degradação do substrato proteico e evidenciando a produção de proteases extracelulares. Esse resultado está de acordo com a literatura, que descreve espécies do gênero *Bacillus* como importantes produtoras de proteases com ampla aplicação nas indústrias de alimentos, detergentes, couro, entre outras. Além disso, as proteases representam uma das principais classes de enzimas comercializadas mundialmente, sendo *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* e *Bacillus amyloliquefaciens* algumas das espécies mais empregadas na produção industrial (Devi *et al.*, 2026).

Este artigo é publicado em acesso aberto (Open Access) sob a licença Creative Commons Atribuição 4.0 Internacional (CC-BY), que permite uso, distribuição e reprodução irrestritos em qualquer meio, desde que o autor original e a fonte sejam creditados.

A Figura 1b demonstra que o cultivo em meio contendo pectina cítrica induziu a produção de enzimas pectinolíticas, evidenciada pela formação de halos de hidrólise após revelação. As pectinases produzidas por espécies de *Bacillus* apresentam crescente interesse industrial devido à sua utilização na clarificação de sucos, maceração de tecidos vegetais, processamento de frutas, extração de óleos essenciais e aproveitamento de resíduos agroindustriais. Revisões recentes ressaltam que *Bacillus* é um dos principais gêneros bacterianos utilizados para obtenção dessas enzimas, principalmente devido à elevada capacidade secretora, facilidade de cultivo e possibilidade de utilização de resíduos vegetais como substratos de fermentação (Kaissar *et al.*, 2025).

Resultados positivos também foram observados para as celulases (Figura 1c). A presença de halos em meio contendo carboximetilcelulose indica a produção de enzimas capazes de hidrolisar ligações β-1,4-glicosídicas da celulose, principalmente endoglucanases. A triagem utilizando carboximetilcelulose seguida de revelação constitui um dos métodos mais empregados para seleção de microrganismos produtores de celulases. Celulases produzidas por *Bacillus* têm sido amplamente estudadas devido ao seu potencial na conversão de biomassa lignocelulósica, produção de bioetanol de segunda geração, alimentação animal, indústria têxtil e tratamento de resíduos agrícolas (Guta *et al.*, 2024).

Da mesma forma, a Figura 1d evidencia atividade de amilases pela formação de halos de hidrólise em meio contendo amido solúvel. A produção de α-amilases por espécies de *Bacillus* constitui uma das aplicações mais consolidadas da biotecnologia microbiana, uma vez que essas enzimas apresentam elevada estabilidade e são empregadas em processos de sacarificação do amido, panificação, fabricação de cervejas, produção de xaropes de glicose, bioetanol e detergentes. Trabalhos recentes continuam apontando espécies de *Bacillus* entre os principais microrganismos utilizados comercialmente para produção de amilases devido ao elevado rendimento fermentativo e à facilidade de escalonamento industrial (Devi *et al.*, 2026).

A Tabela 1 apresenta a estimativa qualitativa da atividade enzimática, realizadas em triplicata, expressa como Índice Enzimático de Atividade (IEA), determinado pela relação entre o diâmetro do halo de degradação e o diâmetro do poço. Esse índice é amplamente utilizado na seleção preliminar de microrganismos produtores de enzimas hidrolíticas, permitindo comparar diferentes isolados quanto ao potencial de secreção enzimática. Embora não substitua ensaios quantitativos, o IEA apresenta boa aplicabilidade na etapa inicial de prospecção biotecnológica e continua sendo amplamente empregado em estudos recentes envolvendo bactérias produtoras de enzimas hidrolíticas (Guta *et al.*, 2024).

Este artigo é publicado em acesso aberto (Open Access) sob a licença Creative Commons Atribuição 4.0 Internacional (CC-BY), que permite uso, distribuição e reprodução irrestritos em qualquer meio, desde que o autor original e a fonte sejam creditados.

Em conjunto, os resultados demonstram que a cepa de *Bacillus* sp. utilizada apresentou capacidade de produzir proteases, pectinases, celulases e amilases, evidenciando um perfil multienzimático de elevado interesse biotecnológico. A produção dessas hidrolases representa uma vantagem para aplicações industriais, especialmente em processos integrados de bioconversão de resíduos agroindustriais, produção de bioinsumos, obtenção de coquetéis enzimáticos e aproveitamento de biomassas vegetais. Revisões recentes destacam que a obtenção de microrganismos capazes de produzir múltiplas enzimas hidrolíticas reduz custos operacionais e aumenta a eficiência dos processos industriais, reforçando o potencial biotecnológico do gênero Bacillus (Singh *et al.*, 2024).

Tabela 1. Caracterização qualitativa da produção de hidrolases pela linhagem de *Bacillus* sp.

Visualização do Halo em Placa – Método “cup plate”							
Proteases		Pectinases		Celulases		Amilases	
Halo	Desvio	Halo	Desvio	Halo	Desvio	Halo	Desvio
3,6	0,26	2,44	0,26	2,06	0,01	1,90	0,01

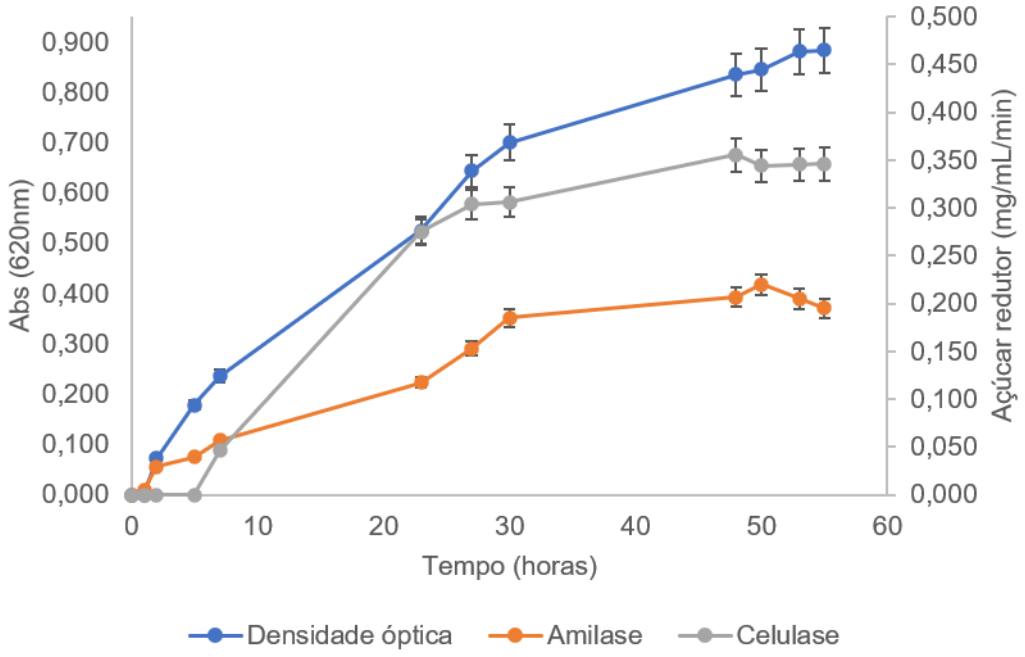
Fonte: do Autor

Cinética de fermentação da cepa de *Bacillus* sp. potencialmente produtora de amilases e celulases

O estudo da cinética de fermentação visou identificar as fases de crescimento do microrganismo e a produção de enzimas amilolíticas e celulolíticas. A Figura 2 mostra a cinética de fermentação utilizando-se a cepa de *Bacillus* sp. e os valores da estimativa do crescimento microbiano através da densidade óptica e da produção de enzimas, realizadas em duplicata.

Figura 2. Cinética de fermentação submersa utilizando-se a cepa de *Bacillus* sp. em meio de cultura contendo substratos indutores amido solúvel ou carboximetilcelulose, em processo em batelada simples: influência do tempo de fermentação no crescimento do microrganismo e na atividade de enzimas amilases e celulases utilizando-se frascos sob agitação a 150rpm, a 37°C

Este artigo é publicado em acesso aberto (Open Access) sob a licença Creative Commons Atribuição 4.0 Internacional (CC-BY), que permite uso, distribuição e reprodução irrestritos em qualquer meio, desde que o autor original e a fonte sejam creditados.



Fonte: do Autor

A cinética de fermentação visou avaliar o comportamento de crescimento da cepa de *Bacillus* sp. e sua capacidade de produção extracelular de enzimas hidrolíticas, especificamente amilases e celulases. A Figura 2 apresenta o perfil cinético do processo fermentativo, considerando a evolução da biomassa microbiana, estimada por densidade óptica, e a atividade enzimática ao longo do cultivo. O crescimento da cepa de *Bacillus* sp. apresentou comportamento característico de processos fermentativos submersos em sistema descontínuo simples, com uma fase inicial de adaptação seguida por crescimento acelerado durante o período entre 2 e 48 horas de cultivo. Esse padrão é esperado para bactérias do gênero *Bacillus*, que apresentam elevada capacidade metabólica, rápido crescimento celular e eficiente secreção de proteínas extracelulares, incluindo enzimas hidrolíticas utilizadas na degradação de polímeros complexos. Resultados semelhantes foram relatados por Rajesh e Gummadi (2022), que avaliaram a produção simultânea de α-amilase e celulase por uma cepa de *Bacillus* sp. PM06 cultivada em fermentação submersa. Os autores observaram aumento progressivo da atividade enzimática durante o crescimento celular, com máxima produção de ambas as enzimas após aproximadamente 48 horas de cultivo, demonstrando forte associação entre crescimento microbiano e síntese de hidrolases extracelulares.

Este artigo é publicado em acesso aberto (Open Access) sob a licença Creative Commons Atribuição 4.0 Internacional (CC-BY), que permite uso, distribuição e reprodução irrestritos em qualquer meio, desde que o autor original e a fonte sejam creditados.

A detecção inicial da atividade de enzimas amilases e de celulases, entre 2 e 5 horas, sugere que a produção dessas enzimas ocorreu predominantemente durante a fase exponencial de crescimento, caracterizando um comportamento associado ao metabolismo primário. Durante essa etapa, a rápida multiplicação celular demanda maior disponibilidade de carbono e energia, estimulando a expressão de enzimas capazes de hidrolisar macromoléculas presentes no meio de cultivo. Em microrganismos do gênero *Bacillus*, a presença de substratos polissacarídicos, como amido e celulose, atua como fator indutor da expressão de genes relacionados às enzimas carboidrato-ativas (CAZymes), promovendo a secreção de enzimas extracelulares para disponibilização de açúcares assimiláveis. Esse comportamento foi observado por Rajesh e Gummadi (2022), que verificaram produção concomitante de α-amilase e celulase quando o meio fermentativo continha fontes indutoras de carbono, como amido e carboximetilcelulose. Os autores demonstraram que a cepa de *Bacillus* sp. foi capaz de utilizar esses polímeros como fontes nutricionais, produzindo 31 U/mL de amilase e 15 U/mL de celulase após 48 horas de fermentação.

A maior atividade de celulase observada neste estudo, quando comparada à atividade de amilase, indica maior potencial da cepa avaliada em produzir enzimas envolvidas na degradação de polímeros celulósicos. Esse resultado apresenta elevada relevância biotecnológica, considerando que a celulose representa a fração polimérica predominante da biomassa lignocelulósica e sua conversão enzimática constitui uma etapa fundamental em processos de produção de bioetanol de segunda geração, obtenção de açúcares fermentescíveis e valorização de resíduos agroindustriais. A produção de celulases por bactérias do gênero *Bacillus* apresenta vantagens importantes em comparação com sistemas exclusivamente fúngicos, incluindo crescimento mais rápido, facilidade de manipulação genética e capacidade de secreção direta das enzimas no meio extracelular. Dessa forma, cepas bacterianas produtoras de múltiplas hidrolases apresentam potencial para desenvolvimento de coquetéis enzimáticos destinados à hidrólise de biomassa vegetal.

Após aproximadamente 50 horas de fermentação, observou-se estabilização da atividade enzimática, coincidindo com a transição do cultivo para a fase estacionária. Esse comportamento é frequentemente observado em processos fermentativos bacterianos, nos quais a redução da disponibilidade de nutrientes, limitação de oxigênio dissolvido, alteração do pH e acúmulo de metabólitos secundários reduzem a síntese de proteínas extracelulares. Além disso, durante a fase estacionária, espécies de *Bacillus*

Este artigo é publicado em acesso aberto (Open Access) sob a licença Creative Commons Atribuição 4.0 Internacional (CC-BY), que permite uso, distribuição e reprodução irrestritos em qualquer meio, desde que o autor original e a fonte sejam creditados.

podem alterar seu metabolismo direcionando recursos celulares para processos de sobrevivência, formação de esporos e produção de enzimas específicas relacionadas à adaptação ambiental. Consequentemente, pode ocorrer redução da atividade enzimática detectada devido à menor síntese ou à degradação parcial das proteínas extracelulares por proteases secretadas pelo próprio microrganismo.

Estudos envolvendo otimização fermentativa também demonstram que o tempo de cultivo é um dos fatores críticos para maximização da produção enzimática. Saad *et al.* (2021), avaliando a produção de α-amilase por *Bacillus licheniformis* WF67 em fermentação submersa, demonstraram que condições adequadas de cultivo e otimização estatística dos parâmetros fermentativos aumentaram significativamente a produtividade enzimática, reforçando a influência das variáveis operacionais sobre a síntese de hidrolases. Da mesma forma, Yao *et al.* (2023) demonstraram que modificações nos elementos regulatórios da expressão gênica associadas ao processo fermentativo podem aumentar a produção extracelular de α-amilase em *Bacillus subtilis*, evidenciando que a secreção enzimática depende não apenas da disponibilidade de substratos, mas também da regulação das vias biossintéticas. Assim, os resultados obtidos demonstram que a cepa de *Bacillus* sp. apresenta comportamento fermentativo compatível com microrganismos produtores de enzimas hidrolíticas industriais, apresentando rápida fase de crescimento, produção acelerada de amilases e celulases e manutenção da atividade enzimática até aproximadamente 50 horas.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos permitem concluir que a cepa de *Bacillus* sp. analisada possui um perfil multienzimático promissor, com capacidade para a secreção extracelular de proteases, pectinases, celulases e amilases. A metodologia “cup plate” demonstrou o potencial da cepa para a prospecção biotecnológica, enquanto o estudo cinético revelou que a produção de hidrolases está associada ao crescimento microbiano, atingindo níveis ótimos de atividade de amilases e de celulases após 48 horas de fermentação submersa. A predominância da atividade de celulases sobre a de amilases posiciona esta linhagem como um agente biológico de grande interesse para a indústria, particularmente para a degradação de biomassa lignocelulósica, etapa crucial em biorrefinarias para a produção de bioetanol de segunda geração e açúcares fermentescíveis. Sugere-se, para trabalhos futuros, a realização de ensaios quantitativos para a determinação precisa das unidades enzimáticas, bem como a otimização dos parâmetros físico-

Este artigo é publicado em acesso aberto (Open Access) sob a licença Creative Commons Atribuição 4.0 Internacional (CC-BY), que permite uso, distribuição e reprodução irrestritos em qualquer meio, desde que o autor original e a fonte sejam creditados.

químicos do meio de cultivo para maximizar a produtividade e a estabilidade das enzimas produzidas.

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos ao Centro Universitário SENAI São Paulo (UniSENAI-SP), especificamente ao SENAI - Biotecnologia “Dr. Celso Charuri, unidade Bom Retiro, pelo fornecimento de insumos e equipamentos para a realização dos ensaios.

REFERÊNCIAS

ABBOTT, D. W.; BORASTON, A. B. Structural biology of pectin degradation by Enterobacteriaceae. Microbiology and Molecular Biology Reviews, v. 72, n. 2, p. 301-316, 2008. Disponível em: https://doi.org/10.1128/mmbr.00038-07. Acesso em: 10 jul. 2026.

AMIN, F.; BHATTI, H. N.; BILAL, M. Recent advances in the production strategies of microbial pectinases—A review. International Journal of Biological Macromolecules, v. 122, p. 1017-1026, 2019. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.09.048. Acesso em: 10 jul. 2026.

ANBU, P. *et al.* Microbial enzymes and their applications in industries and medicine. BioMed Research International, 2013. Disponível em: https://doi.org/10.1155/2013/204014. Acesso em: 10 jul. 2026.

ARNOLD, F. H. Directed Evolution: Bringing New Chemistry to Life. Angewandte Chemie International Edition, v. 57, n. 16, p. 4143-4148, 2018. Disponível em: https://doi.org/10.1002/anie.201708408. Acesso em: 10 jul. 2026.

BACKER, R. *et al.* Plant Growth-Promoting Rhizobacteria: Context, Mechanisms of Action, and Roadmap to Commercialization of Biostimulants for Sustainable Agriculture. Frontiers in Plant Science, v. 9, 1473, 2018. Disponível em: https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01473. Acesso em: 10 jul. 2026.

BHAT, M. K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. Biotechnology Advances, v. 18, n. 5, p. 355-383, 2000. Disponível em: https://doi.org/10.1016/S0734-9750(00)00041-0. Acesso em: 10 jul. 2026.

BORASTON, A. B. *et al.* Carbohydrate-binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition. Biochemical Journal, v. 382, n. 3, p. 769-781, 2004. Disponível em: https://doi.org/10.1042/BJ20040892. Acesso em: 10 jul. 2026.

BORNSCHEUER, U. T. *et al.* Engineering the third wave of biocatalysis. Nature, v. 485, p. 185-194, 2012. Disponível em: https://doi.org/10.1038/nature11117. Acesso em: 10 jul. 2026.

CAULIER, S. *et al.* Overview of the antimicrobial compounds produced by members of the Bacillus subtilis group. Frontiers in Microbiology, v. 10, 302, 2019. Disponível em: https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00302. Acesso em: 10 jul. 2026.

CHANDRA, P. *et al.* Microbial lipases and their industrial applications: a comprehensive review. Microbial Cell Factories, v. 19, 169, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.1186/s12934-020-01428-8. Acesso em: 10 jul. 2026.

Este artigo é publicado em acesso aberto (Open Access) sob a licença Creative Commons Atribuição 4.0 Internacional (CC-BY), que permite uso, distribuição e reprodução irrestritos em qualquer meio, desde que o autor original e a fonte sejam creditados.

CONTESINI, F. J.; MELO, R. R.; SATO, H. H. An overview of Bacillus proteases: from production to application. Critical Reviews in Biotechnology, v. 38, n. 3, p. 321-334, 2018. Disponível em: https://doi.org/10.1080/07388551.2017.1354354. Acesso em: 10 jul. 2026.

DEVI, M. *et al.* Advances in microbial enzyme technology for food processing strategies and applications. Discovery Food, v. 6, 56, 2026. Disponível em: https://doi.org/10.1007/s44187-025-00779-8. Acesso em: 10 jul. 2026.

DE SOUZA, T. S. P.; KAWAGUTI, H. Y. Cellulases, Hemicellulases, and Pectinases: Applications in the Food and Beverage Industry. Food Bioprocess Technology, v. 14, p. 1446–1477, 2021. Disponível em: https://doi.org/10.1007/s11947-021-02678-z. Acesso em: 10 jul. 2026.

DINGLE, J.; REID, W. W.; SOLOMONS, G. L. The enzymic degradation of pectin and other polysaccharides. II—Application of the 'Cup-plate' assay to the estimation of enzymes. Journal of the Science of Food and Agriculture, v. 4, p. 149-155, 1953. Disponível em: https://doi.org/10.1002/jsfa.2740040305. Acesso em: 10 jul. 2026.

DIMKIĆ, I. *et al.* The profile and antimicrobial activity of lipopeptide extracts from Bacillus spp. Frontiers in Microbiology, v. 13, 822221, 2022. Disponível em: https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00925. Acesso em: 10 jul. 2026.

DUMORNÉ, K. *et al.* Extremozymes: A Potential Source for Industrial Applications. Journal of Microbiology and Biotechnology, v. 27, n. 4, p. 649-659, 2017. Disponível em: https://doi.org/10.4014/jmb.1611.11006. Acesso em: 10 jul. 2026.

EARL, A. M.; LOSICK, R.; KOLTER, R. Ecology and genomics of Bacillus subtilis. Trends in Microbiology, v. 16, n. 6, p. 269-275, 2008. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.tim.2008.03.004. Acesso em: 10 jul. 2026.

ESQUIVEL, P.; JIMÉNEZ, V. M. Functional properties of coffee and coffee by-products. Food Research International, v. 46, n. 2, p. 488-495, 2012. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.05.028. Acesso em: 10 jul. 2026.

FARIAS, T. C.; KAWAGUTI, H. Y.; KOBLITZ, M. G. B. Microbial amylolytic enzymes in foods: Technological importance of the Bacillus genus. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, v. 35, 102054, 2021. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102054. Acesso em: 10 jul. 2026.

GILBERT, H. J.; KNOX, J. P.; BORASTON, A. B. Advances in understanding the molecular basis of plant cell wall polysaccharide recognition by carbohydrate-binding modules. Current Opinion in Structural Biology, v. 23, n. 5, p. 669-677, 2013. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.sbi.2013.05.005. Acesso em: 10 jul. 2026.

GUTA, M. *et al.* Screening and characterization of thermostable enzyme-producing bacteria from selected hot springs of Ethiopia. Microbiology Spectrum, v. 12, e03710-23, 2024. Disponível em: https://doi.org/10.1128/spectrum.03710-23. Acesso em: 10 jul. 2026.

HASHEM, A.; TABASSUM, B.; ABD-ALLAH, E. F. Bacillus subtilis: A plant-growth promoting rhizobacterium that also impacts biotic stress. Saudi Journal of Biological Sciences, v. 26, p. 1291-1297, 2019. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2019.05.004. Acesso em: 10 jul. 2026.

HIMMEL, M. E. *et al.* Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. Science, v. 315, n. 5813, p. 804-807, 2007. Disponível em: https://doi.org/10.1126/science.1137016. Acesso em: 10 jul. 2026.

HOONDAL, G. S. *et al.* Microbial alkaline pectinases and their industrial applications: A review. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 59, n. 4-5, p. 409-418, 2002. Disponível em: https://doi.org/10.1007/s00253-002-1061-1. Acesso em: 10 jul. 2026.

Este artigo é publicado em acesso aberto (Open Access) sob a licença Creative Commons Atribuição 4.0 Internacional (CC-BY), que permite uso, distribuição e reprodução irrestritos em qualquer meio, desde que o autor original e a fonte sejam creditados.

JAYANI, R. S.; SAXENA, S.; GUPTA, R. Microbial pectinolytic enzymes: A review. Process Biochemistry, v. 40, n. 9, p. 2931-2944, 2005. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.03.026. Acesso em: 10 jul. 2026.

KAISSAR, F. Z. *et al.* Bacillus Pectinases as Key Biocatalysts for a Circular Bioeconomy: From Green Extraction to Process Optimization and Industrial Scale-Up. BioTech, v. 14, n. 3, 74, 2025. Disponível em: https://doi.org/10.3390/biotech14030074. Acesso em: 10 jul. 2026.

KASHYAP, D. R. *et al.* Applications of pectinases in the commercial sector: a review. Bioresource Technology, v. 77, n. 3, p. 215-227, 2001. Disponível em: https://doi.org/10.1016/S0960-8524(00)00118-8. Acesso em: 10 jul. 2026.

KUHAD, R. C.; GUPTA, R.; SINGH, A. Microbial cellulases and their industrial applications. Enzyme Research, v. 2011, 280696, 2011. Disponível em: https://doi.org/10.4061/2011/280696. Acesso em: 10 jul. 2026.

LEE, L. W. *et al.* Coffee fermentation and flavor – An intricate and delicate relationship. Food Chemistry, 2015. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.124. Acesso em: 10 jul. 2026.

LYND, L. R. *et al.* Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. Microbiology and Molecular Biology Reviews, v. 66, n. 3, p. 506-577, 2002. Disponível em: https://doi.org/10.1128/mmbr.66.3.506-577.2002. Acesso em: 10 jul. 2026.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959. Disponível em: https://doi.org/10.1021/ac60147a030. Acesso em: 10 jul. 2026.

NIEHAUS, F. *et al.* Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 51, p. 711-729, 1999. Disponível em: https://link.springer.com/article/10.1007/s002530051456. Acesso em: 10 jul. 2026.

NIELSEN, J.; KEASLING, J. D. Engineering Cellular Metabolism. Cell, v. 164, n. 6, p. 1185-1197, 2016. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.02.004. Acesso em: 10 jul. 2026.

OLIVEIRA, L. A. Enzimas hidrolíticas extracelulares de isolados de rizóbia nativos da Amazônia Central, Amazonas, Brasil. Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2006. Disponível em: https://doi.org/10.1590/S0101-20612006000400022. Acesso em: 10 jul. 2026.

ONGENA, M.; JACQUES, P. Bacillus lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. Trends in Microbiology, v. 16, n. 3, p. 115-125, 2008. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.tim.2007.12.009. Acesso em: 10 jul. 2026.

PAYNE, C. M. *et al.* Fungal cellulases. Chemical Reviews, v. 115, n. 3, p. 1308-1448, 2015. Disponível em: https://doi.org/10.1021/cr500351c. Acesso em: 10 jul. 2026.

RAJESH, R.; GUMMADI, S. N. α-Amylase and cellulase production by novel halotolerant Bacillus sp.PM06 isolated from sugarcane pressmud. Biotechnology and Applied Biochemistry, v. 69, n. 1, p. 149-159, 2022. Disponível em: https://doi.org/10.1002/bab.2091. Acesso em: 10 jul. 2026.

RAVEENDRAN, S. *et al.* Applications of microbial enzymes in food industry. Food Technology and Biotechnology, v. 56, n. 1, p. 16-30, 2018. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-3-031-51417-3_13. Acesso em: 10 jul. 2026.

RAWLINGS, N. D. *et al.* MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. Nucleic Acids Research, v. 52, n. 1, p. D679-D689, 2024. Disponível em: https://doi.org/10.1093/nar/gkr987. Acesso em: 10 jul. 2026.

Este artigo é publicado em acesso aberto (Open Access) sob a licença Creative Commons Atribuição 4.0 Internacional (CC-BY), que permite uso, distribuição e reprodução irrestritos em qualquer meio, desde que o autor original e a fonte sejam creditados.

RAZZAQ, A. *et al.* Microbial proteases applications. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, v. 7, 110, 2019. Disponível em: https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00110. Acesso em: 10 jul. 2026.

ROBINSON, S. L. *et al.* A roadmap for metagenomic enzyme discovery. The FEBS Journal, v. 288, n. 16, p. 4983-4999, 2021. Disponível em: https://doi.org/10.1039/d1np00006c. Acesso em: 10 jul. 2026.

ROSE, S. B.; MILLER, R. E. Studies with the Agar Cup-Plate Method: I. A Standardized Agar Cup-Plate Technique. Journal of Bacteriology, v. 38, n. 5, p. 525-537, 1939. Disponível em: https://doi.org/10.1128/jb.38.5.525-537.1939. Acesso em: 10 jul. 2026.

SAAD, W. F. *et al.* Response surface methodology as an approach for optimization of α-amylase production by the new isolated thermotolerant Bacillus licheniformis WF67 strain in submerged fermentation. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, v. 32, 101944, 2021. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.101944. Acesso em: 10 jul. 2026.

SADHU, S.; MAITI, T. K. Cellulase production by bacteria: a review. British Microbiology Research Journal, v. 3, n. 3, p. 235-258, 2013. Disponível em: https://doi.org/10.9734/BMRJ/2013/2367. Acesso em: 10 jul. 2026.

SARMIENTO, F.; PERALTA, R.; BLAMEY, J. M. Cold and Hot Extremozymes: Industrial Relevance and Current Trends. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, v. 3, 148, 2015. Disponível em: https://doi.org/10.3389/fbioe.2015.00148. Acesso em: 10 jul. 2026.

SCHALLMEY, M.; SINGH, A.; WARD, O. P. Developments in the use of Bacillus species for industrial production. Canadian Journal of Microbiology, v. 50, n. 1, p. 1-17, 2004. Disponível em: https://doi.org/10.1139/W03-076. Acesso em: 10 jul. 2026.

SHARMA, K. M. *et al.* Microbial alkaline proteases: optimization of production parameters and their properties. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology, v. 15, p. 115-126, 2017. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2017.02.001. Acesso em: 10 jul. 2026.

SINGH, B. *et al.* Microbial Multienzyme Viz., Pectinase, Cellulase and Amylase Production Using Fruit and Vegetable Waste as Substrate—A Review. Applied Microbiology, v. 4, n. 3, p. 1232-1246, 2024. Disponível em: https://doi.org/10.3390/applmicrobiol4030084. Acesso em: 10 jul. 2026.

SINGH, R. *et al.* Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. 3 Biotech, v. 6, 174, 2016. Disponível em: https://doi.org/10.1007/s13205-016-0485-8. Acesso em: 10 jul. 2026.

SOUZA, P. M.; MAGALHÃES, P. O. Application of microbial α-amylase in industry – A review. Brazilian Journal of Microbiology, v. 41, n. 4, p. 850-861, 2010. Disponível em: https://doi.org/10.1590/S1517-83822010000400004. Acesso em: 10 jul. 2026.

STEIN, T. Bacillus subtilis antibiotics: structures, syntheses and specific functions. Molecular Microbiology, v. 56, n. 4, p. 845-857, 2005. Disponível em: https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04587.x. Acesso em: 10 jul. 2026.

SU, Y. *et al.* Bacillus subtilis: a universal cell factory for industry, agriculture, biomaterials and medicine. Microbial Cell Factories, v. 19, 173, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.1186/s12934-020-01436-8. Acesso em: 10 jul. 2026.

UCHIYAMA, T.; MIYAZAKI, K. Functional metagenomics for enzyme discovery: challenges to efficient screening. Current Opinion in Biotechnology, v. 20, n. 6, p. 616-622, 2009. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.copbio.2009.09.010. Acesso em: 10 jul. 2026.

Este artigo é publicado em acesso aberto (Open Access) sob a licença Creative Commons Atribuição 4.0 Internacional (CC-BY), que permite uso, distribuição e reprodução irrestritos em qualquer meio, desde que o autor original e a fonte sejam creditados.

VAN DER MAAREL, M. J. E. C. *et al.* Properties and applications of starch-converting enzymes of the α-amylase family. Journal of Biotechnology, v. 94, n. 2, p. 137-155, 2002. Disponível em: https://doi.org/10.1016/S0168-1656(01)00407-2. Acesso em: 10 jul. 2026.

VAN DIJL, J. M.; HECKER, M. Bacillus subtilis: from soil bacterium to super-secreting cell factory. Microbial Cell Factories, v. 12, 3, 2013. Disponível em: https://doi.org/10.1186/1475-2859-12-3. Acesso em: 10 jul. 2026.

VIDMAR, B.; VODOVNIK, M. Microbial keratinases: enzymes with promising biotechnological applications. Food Technology and Biotechnology, v. 56, n. 3, p. 312-328, 2018. Disponível em: https://doi.org/10.17113/ftb.56.03.18.5658. Acesso em: 10 jul. 2026.

WESTERS, L.; WESTERS, H.; QUAX, W. J. Bacillus subtilis as cell factory for pharmaceutical proteins: a biotechnological approach to optimize the host organism. Biochimica et Biophysica Acta – Molecular Cell Research, v. 1694, n. 1-3, p. 299-310, 2004. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2004.02.011. Acesso em: 10 jul. 2026.

WILSON, D. B. Microbial diversity of cellulose hydrolysis. Current Opinion in Microbiology, v. 14, n. 3, p. 259-263, 2011. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.mib.2011.04.004. Acesso em: 10 jul. 2026.

YAO, D. *et al.* Enhanced extracellular production of raw starch-degrading α-amylase in Bacillus subtilis through expression regulatory element modification and fermentation optimization. Microbial Cell Factories, v. 22, 118, 2023. Disponível em: https://doi.org/10.1186/s12934-023-02116-z. Acesso em: 10 jul. 2026.

Este artigo é publicado em acesso aberto (Open Access) sob a licença Creative Commons Atribuição 4.0 Internacional (CC-BY), que permite uso, distribuição e reprodução irrestritos em qualquer meio, desde que o autor original e a fonte sejam creditados.