



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA MOLECULAR E CELULAR**

**SAMUEL DE SOUZA SOARES**

**PRODUÇÃO DE AMILASES E PECTINASES POR BACTÉRIAS  
MARINHAS USANDO RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS**

JOÃO PESSOA - PB

2021

**SAMUEL DE SOUZA SOARES**

**PRODUÇÃO DE AMILASES E PECTINASES POR BACTÉRIAS  
MARINHAS USANDO RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado como requisito parcial para  
obtenção do grau de Bacharel em  
Biotecnologia pela Universidade Federal da  
Paraíba.

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Krystyna Gorlach Lira.

**Coorientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Amália Geiza Gama Pessoa.

JOÃO PESSOA - PB

2021

**Catálogo na publicação**  
**Seção de Catalogação e Classificação**

S676p Soares, Samuel de Souza.  
Produção de amilases e pectinases por bactérias  
marinhas usando resíduos agroindustriais. / Samuel de  
Souza Soares. - João Pessoa, 2021.  
49 p. : il.

Orientação: Krystyna Gorlach Lira.  
Coorientação: Amália Geiza Gama Pessoa.  
TCC (Graduação/Bacharelado em Biotecnologia) -  
UFPB/CBIOTEC.

1. Microrganismos. 2. Enzimas. 3. Resíduos  
agroindustriais. 4. Microbiologia industrial. I. Lira,  
Krystyna Gorlach. II. Pessoa, Amália Geiza Gama. III.  
Titulo.

UFPB/CCEN

CDU 579.66(043.2)

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA (UFPB)  
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA (CBiotec)  
CAMPUS I – JOÃO PESSOA/PB  
Coordenação do Curso de Bacharelado em  
Biotecnologia



**ATA DE DEFESA PÚBLICA DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

Aos vinte e três dias do mês de novembro de 2021, às 18:00 h, em sessão pública realizada de forma remota, na Plataforma Google Meet, em atendimento à Portaria N° 125/GR/REITORIA/UFPB, de 08 de março de 2021 ea Resolução Consepe N° 27/2021, na presença da Banca Examinadora presidida pela Professora Dra. Krystyna Gorlach Lira (DBM/CCEN/UFPB) e composta pelas avaliadoras: 1. Profa. Dra. Amalia Geiza Gama Pessoa (DBCM/CBIOTEC/UFPB), orientadora; 2. Profa. Dra. Márcia Rosa de Oliveira (DBM/CCEN/UFPB), o discente Samuel de Souza Soares, matrícula 20170022590, apresentou o Trabalho de Conclusão de Curso intitulado: **“Produção de Amilases e Pectinases por Bactérias Marinhas usando Resíduos Agroindustriais”**, como requisito curricular indispensável para a integralização do Curso de Graduação em Biotecnologia. Após reunião em sessão reservada, a Banca Examinadora deliberou e decidiu pela **aprovação** do referido trabalho, divulgando o resultado formalmente a(ao) discente e demais presentes e eu, Krystyna Gorlach Lira, na qualidade de Presidente da Banca, lavrei a presente ata que será assinada por mim, pelas demais avaliadoras e pelo discente.

(Assinado digitalmente em 29/11/2021 19:02 )

KRYSTYNA GORLACH LIRA  
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR  
2305006

Presidente da Banca Examinadora

Discente

(Assinado digitalmente em 30/11/2021 10:44 )

AMALIA GEIZA GAMA PESSOA  
COORDENADOR DE CURSO  
1297184

Orientadora e Avaliadora 1

(Assinado digitalmente em 30/11/2021 14:01 )

MARCIA ROSA DE OLIVEIRA  
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR  
338028

Avaliadora 2

Para verificar a autenticidade deste documento entre em <https://sipac.ufpb.br/documentos/> informando seu número: **1**, ano: **2021**, documento (espécie): **ATA**, data de emissão: **29/11/2021** e o código de verificação: **26f544ed54**

João Pessoa/PB, 23 de novembro de 2021.

Dedico este trabalho aos meus pais, que acima de tudo nunca me impediram de sonhar.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente ao meu pai Cosme Gomes Soares e a minha mãe Elisete Maria de Souza Soares por todo o apoio que me foi concedido durante todo esse percurso, sem que sem o apoio dos mesmos esse sonho não estaria se tornando realidade.

A minha orientadora a professora Krystyna Gorlach Lira que sou grato por ter acreditado em mim e me dado a oportunidade de ingressar em seu grupo de pesquisa no qual foi possível crescer e adquirir conhecimentos, pelo auxílio para a realização das minhas atividades no ambiente laboratorial, além de estar sempre de prontidão para auxiliar em dúvidas e ser sempre compreensiva perante as adversidades do cotidiano.

Agradeço a minha coorientadora a professora Amália Geiza Gama Pessoa por aceitar o convite e me dá suporte nessa uma etapa da minha jornada como graduando em biotecnologia.

A meu grupo de apoio chamado winx's (since 25/09/2019) formado por Bruna Guedes, Brenda Rayane, Nubya Guimarães e Gabryel Marinho, por sempre me dá suporte e estar comigo nos altos e baixos. Além de todos os momentos que conseguimos passar e superar juntos devido as adversidades ocasionadas no ambiente universitário e familiar. As conversas paralelas, a formação de sonhos, as fã-fic, por tudo, amo vocês.

A minha tia Tereza Maria de Souza Soares e a minha irmã Roberta de Souza Soares por todo apoio e suporte, sempre estiveram ali me encorajando a concretização do meu sonho.

Aos que me deram suporte nessa trajetória e acreditaram que eu conseguiria alcançar meu sonho e ter um futuro melhor, em especial o meu tio João Paulo Souza e o senhor Lívio Aguiar.

Agradeço ao Laboratório de Biologia de Microrganismos no qual se tornou uma casa para mim desde o terceiro período, aos integrantes e amigos Fernando, Jalcinês, Radâmis, Thiago, Vanessa, Lucas, Jackelly, Maria Helena, Douglas, Sarah, Luana, Malu, no qual tive a oportunidade de trocar experiências, conversar, aprender e tornar um profissional melhor.

## RESUMO

Os resíduos gerados pela agroindústria ainda são pouco reaproveitados e em sua grande maioria são descartados por apresentarem baixo valor econômico agregado, porém, esses subprodutos são ricos em alguns compostos como as fibras e os açúcares, podendo ser empregados em diversos bioprocessos. Os microrganismos marinhos são pouco explorados com relação à produção de bioativos como as enzimas extracelulares, as quais podem apresentar características diferenciadas. O presente trabalho teve como objetivo analisar a produção de amilases e pectinases por bactérias marinhas usando resíduos agroindustriais. Foram usados treze isolados provenientes do tecido necrosado zoantídeo *Palythoa caribaeorum*. A análise da produção das enzimas foi feita no meio sólido mineral com as seguintes fontes de carbono: amido, ácido pécico, farinha de laranja e farinha de maracujá, variando a temperatura (37 e 50°C) e o pH (5, 6, 7 e 8) por um período de incubação de 48h. A produção de amilases foi observada em quatro e três isolados em meio contendo farinha de laranja e amido, respectivamente. As pectinases foram produzidas por sete isolados em meio contendo farinha de maracujá e seis isolados em meio com ácido pécico. O isolado *Bacillus* sp. N1 se sobressaiu dentre os isolados sendo escolhido para um estudo mais detalhado, no qual o cultivo foi realizado em meio líquido mineral com diferentes fontes de carbono por 72h à 37°C, com agitação. A cultura foi centrifugada e a atividade amilolítica e pectinolítica foi testada adicionando alíquotas do sobrenadante em poços nas placas de Petri contendo meio sólido com amido ou ácido pécico. O isolado *Bacillus* sp. N1 apresentou maior produção de amilases em pH 6 à 37°C no meio com farinha de laranja, apresentando o halo de hidrólise de 26,4 mm, e com farinha de maracujá com o halo de 25,6 mm, enquanto em meio com amido o maior halo de hidrólise (24,9 mm) foi registrado em pH 7 à 37°C. Com relação a atividade de pectinases do sobrenadante obtido do cultivo nos meios com as farinhas testadas, os maiores halos foram observados à 37°C em pH 8 para farinha de laranja (23,4 mm) e em pH 7 para farinha de maracujá (48,4 mm). O sobrenadante obtido do cultivo em meio com ácido pécico mostrou maior atividade pectinolítica em pH 7 à 37°C, com halo de 59,9 mm. A atividade enzimática das amilases e pectinases foi menor em temperatura de 50°C. Dessa forma, conclui-se que as farinhas de laranja e maracujá apresentam ser uma fonte viável de carbono alternativo para a produção de amilases e pectinases, podendo ser mais bem explorada a ser aplicada ao processo de produção de enzimas. Este estudo aponta que os isolados de bactérias marinhas, principalmente do gênero *Bacillus*, apresentam um potencial para produção de amilases e pectinases utilizando as farinhas de laranja e maracujá como fontes de carbono com baixo custo.

**Palavras-chave:** Microrganismos. Enzimas. Resíduos agroindustriais.

## PRODUCTION OF AMYLASES AND PECTINASES BY MARINE BACTERIA USING AGROINDUSTRIAL WASTE

### ABSTRACT

The residues generated by the agroindustry are still little reused and most of them are discarded because of their low added economic value, however, these by-products are rich in some compounds such as fibers and sugars, and can be used in various bioprocesses. The marine microorganisms are little explored in relation to the production of bioactives such as extracellular enzymes, which may have differentiated features. This study aimed to analyze the production of amylases and pectinases by marine bacteria using agro-industrial residues. The thirteen isolates of bacteria obtained from necrotic tissue of zoanthid *Palythoa caribaeorum* were analyzed. The analysis of enzyme production was carried out in mineral solid medium with the following carbon sources: starch, pectic acid, orange peel flour and passion fruit peel flour, at different temperature (37 and 50°C) and pH (5, 6, 7 and 8), and incubation period of 48h. The production of amylases was observed in four and three isolates in medium containing orange peel flour and starch, respectively. The pectinases were produced by seven isolates in the medium containing passion fruit peel flour and six isolates in medium with pectic acid. The *Bacillus* sp. N1 stood out among the isolates, being chosen for a more detailed study, in which the cultivation was carried out in mineral liquid medium with different carbon sources for 72h at 37°C, with agitation. The culture was centrifuged and the amylolytic and pectinolytic activity was tested by adding aliquots of the supernatant to wells in Petri dishes containing solid medium with starch or pectic acid. The *Bacillus* sp. N1 isolate showed higher production of amylases at pH 6 at 37°C in the medium with orange peel flour, with a hydrolysis halo of 26.4 mm, and with passion fruit peel flour with a halo of 25.6 mm, while in medium with starch the largest halo (24.9 mm) was recorded at pH 7 at 37°C. Regarding the pectinase activity of the supernatant obtained from the culture in the media with the tested flours, the largest halos were observed at 37°C at pH 8 for orange peel flour (23.4 mm) and at pH 7 for passion fruit peel flour (48.4 mm). The supernatant obtained from culture in medium with pectic acid showed higher pectinolytic activity at pH 7 at 37°C, showing hydrolysis halo of 59.9 mm. The enzymatic activity of amylases and pectinases was lower at a temperature of 50°C. Thus, it is concluded that orange and passion fruit peel flours present to be a viable alternative carbon source for the production of amylases and pectinases, which can be better exploited to be applied to the enzyme production process. This study shows that marine bacteria isolates, mainly of the genus *Bacillus*, have a potential for the production of amylases and pectinases using orange and passion fruit peel flours as carbon sources at low cost.

**Keywords:** Microorganisms. Enzymes. Agro-industrial waste.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Esquema da degradação da pectina pelas enzimas pectina liase e poligalacturonase. .... 17
- Figura 2.** Zoantídeo *P. caribaeorum* sadio (A) e necrosado (B) nos recifes de Carapibus – PB. .... 22
- Figura 3.** Atividade amilolítica em temperatura de 37°C em diferentes pHs do sobrenadante do isolado *Bacillus* sp. N1 cultivado no meio contendo farinha de laranja. As setas indicam o halo de hidrolise do amido. .... 33
- Figura 4.** Atividade pectinolítica em temperatura de 37°C em diferentes pHs do sobrenadante do isolado *Bacillus* sp. N1 cultivado no meio contendo farinha de maracujá. As setas indicam o halo de hidrolise do ácido pécico. .... 35

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Isolados de bactérias provenientes do tecido necrosado de *P. caribaeorum*. ..... 27
- Tabela 2.** Os valores do índice enzimático para amilases dos isolados de bactérias nos meios de cultivo contendo amido em diferentes condições de pH e temperatura. .... 28
- Tabela 3.** Os valores do índice enzimático para amilases dos isolados de bactérias nos meios de cultivo contendo farinha da laranja em diferentes condições de pH e temperatura. .... 29
- Tabela 4.** Os valores do índice enzimático para pectinases dos isolados de bactérias nos meios de cultivo contendo ácido pécico em diferentes condições de pH e temperatura. .... 31
- Tabela 5.** Os valores do índice enzimático para pectinases dos isolados de bactérias nos meios de cultivo contendo farinha de maracujá em diferentes condições de pH e temperatura. .... 32
- Tabela 6.** Atividade amilolítica do sobrenadante do isolado *Bacillus* sp. N1, cultivado nos meios com diferentes fontes de carbono e em diferentes condições de pH e temperatura. .... 33
- Tabela 7.** Atividade pectinolítica do sobrenadante do isolado *Bacillus* sp. N1, cultivado nos meios com diferentes fontes de carbono e em diferentes condições de pH e temperatura. .... 35

# SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	9
<b>2</b>	<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b>	11
2.1	RESÍDUOS AGROÍNDUSTRIAIS	11
2.1.1	RESÍDUOS DE LARANJA	12
2.1.2	RESÍDUOS DE MARACUJÁ	13
2.3	ENZIMAS MICROBIANAS	14
2.3.1	AMILASES	15
2.3.2	PECTINASES	16
2.4	BACTÉRIAS MARINHAS	18
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	20
3.1	OBJETIVO GERAL	20
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	21
4.1	MICROORGANISMOS	21
4.2	OBTENÇÃO DAS FARINHAS DE CASCAS DE FRUTAS	22
4.3	ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE ENZIMAS EXTRACELULARES	22
4.3.1	AMILASES	22
4.3.2	PECTINASES	23
4.3.4	ÍNDICE ENZIMÁTICO	24
4.4	PRODUÇÃO DE AMILASES E PECTINASES POR ISOLADO <i>Bacillus</i> sp. N1	25
4.4.1	ATIVIDADE AMIOLÍTICA	25
4.4.2	ATIVIDADE PECTINOLÍTICA	26
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	27
5.1	PRODUÇÃO DE AMILASES	27
5.2	PRODUÇÃO DE PECTINASES	30
5.3	ATIVIDADE AMIOLÍTICA E PECTINOLÍTICA DO ISOLADO <i>Bacillus</i> sp. N1	32
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	37
	<b>REFERÊNCIAS</b>	38

# 1 INTRODUÇÃO

O crescimento da população mundial tem aumentado gradativamente, gerando uma maior demanda em diversos setores como o de alimentos em termos de quantidade, qualidade de produtos, custos e uma nutrição adequada. Os subprodutos gerados pelas agroindústrias como os resíduos de frutas provenientes do processamento para a produção de polpa de frutas e outros produtos apresentam uma diversidade de compostos como açúcares fermentáveis que podem ser usados em diversos processos biotecnológicos, como a produção de bioetanol e enzimas, dentre outros. No entanto, o processamento de muitos produtos alimentícios tem gerado subprodutos que são descartados por não apresentarem valor econômico.

O processamento de frutas para a produção de polpa, por exemplo, tem gerado subprodutos que podem ser empregados em outros bioprocessos por apresentarem ainda uma alta concentração de açúcares fermentáveis. A laranja é processada de diversas formas, uma delas é para produção de suco no qual a polpa é extraída e o bagaço é descartado, esse resíduo rico em fibras, pectina, óleos essenciais e D-limoneno. Além disso, outro resíduo é o do maracujá, no qual a polpa é extraída principalmente para a produção de suco e a casca e sementes são descartados, esse resíduo apresenta o óleo da semente e a casca que é rica em pectina e os minerais presentes como magnésio, fosforo, cálcio, potássio. Dentre esses resíduos, existem diversos outros que são gerados cada dia mais e não são reaproveitados.

As enzimas produzidas por microrganismos como bactérias, fungos e leveduras, tem ganhado espaço na indústria, pois têm o poder de acelerar diversas reações, logo diminuindo o tempo de produção e a necessidade do uso de outros compostos. As aplicações enzimáticas são diversas, podendo ser empregadas para a produção de alimentos, bebidas, cosméticos, medicamentos, dentre outros.

Há uma crescente busca de novas enzimas com características específicas e alta atividade, explorando microrganismos em diversos ambientes. As amilases são capazes de degradar diversas formas de amido e o emprego dessas enzimas tem crescido já que essas enzimas têm apresentado um papel

importante na indústria de laticínios, têxtil, bebidas, panificação, dentre outros. Outra classe de enzimas são as pectinases as quais são responsáveis de degradar as diversas formas de pectina, essas enzimas vem sendo alvo de diversos estudos visto que podem ser empregadas em diversas áreas como na indústria de sucos, bebidas, alimentos, têxtil, extração de óleos vegetais, na fermentação de chá, café e cacau, dentre outros processos no qual essa molécula desempenha papel fundamental.

O ambiente marinho apresenta uma alta diversidade filogenética e metabólica de microrganismos ainda pouco explorada para a produção de substâncias bioativas. A bioprospecção de novas moléculas produzidas por isolados marinhos tem sido alvo de alguns estudos nos últimos anos visto que essas moléculas, tais como as enzimas, podem apresentar características diferenciadas, por exemplo, a halotolerância e estabilidade em uma ampla faixa de pH e de temperatura.

O ambiente marinho apresenta alterações de disponibilidade de nutrientes e salinidade, influenciando os microrganismos que podem apresentar características diferenciadas como a produção de moléculas com propriedades específicas e uteis para processos industriais e biotecnológicos.

Devido a necessidade industrial por novas enzimas com características que possam diminuir o tempo de diversos processos e redução do custo de produção, a bioprospecção de enzimas bacterianas de origem marinha tem sido alvo de estudos para seu uso no mercado industrial.

Dessa forma, esse trabalho teve como objetivo avaliar a produção de amilases e pectinases por bactérias marinhas, isoladas do tecido do zoantídeo *Palythoa caribaeorum*, utilizando farinha de cascas de laranja e de maracujá como substratos.

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 RESÍDUOS AGROÍNDUSTRIAIS

Os subprodutos provenientes da agroindústria são gerados a partir de processos industriais e/ou de produtos agrícolas. Em geral, esses resíduos não são aproveitados totalmente visto que tem pouco valor econômico agregado (PANESAR et al., 2016).

Estima-se que até 2031 a produção de grãos tenha um aumento de cerca de 27,1% e as exportações de outros alimentos como milho, grão de soja, leite, carnes, manga e outros produtos também se encontram em crescimento para suprir a demanda mundial de alimentos (BRASIL, 2021). Dessa forma, ocorre o aumento na produção de subprodutos que são em grande maioria desperdiçados.

Uma pesquisa feita pela Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO) estimou que cerca de 931 milhões de toneladas de alimento em 2019 foram desperdiçados de alguma forma, por exemplo no lixo das residências, varejo, restaurantes, fast food e outro serviços alimentares. Além disso, 54% do desperdício de alimentos no mundo ocorre na fase inicial da produção, que é composta pela manipulação pós-colheita e pela armazenagem (FAO, 2013).

Os subprodutos gerados pela agroindústria vêm sendo estudados como fontes alternativas de carbono, visto que apresentam uma alta concentração de açúcares fermentáveis podendo ser empregados em uma gama de bioprocessos como a produção de enzimas, biocombustíveis, produtos farmacêuticos, dentre outros (SOUZA et al., 2020; ANDRADE et al., 2018; UYGUT; TANYILDIZI, 2018; JULICH et al., 2016; UENOJO; PASTORE, 2007).

Com a crescente quantidade de resíduos agroindustriais diversos projetos vêm sendo elaboradas ao decorrer dos anos como modo de aproveitar esses resíduos como método de minimizar os impactos ambientais gerados pelo descarte incorreto no ambiente. Logo, esses resíduos podem ser empregados em uma gama de bioprocessos diminuindo seus custos (MARZO et al., 2019).

### 2.1.1 RESÍDUOS DE LARANJA

A laranja (*Citrus sinensis* L.) pertence à família Rutaceae sendo popularmente conhecida como laranja pêra (PIMENTA et al., 2016). Essa fruta é originária do sul da China e nordeste da Índia, a sua inserção no Brasil remete ao processo de colonização e a cultivar dessa fruta mais produzida no Brasil é a do tipo laranja pêra (LACERDA; LORENZI et al., 2006).

Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE (2019) atualmente o Brasil é considerado líder mundial quando se fala de citricultura, além de ser um dos maiores exportadores de laranja. Segundo Alves et al. (2019) as regiões mais produtivas de laranja no Brasil compreendem aos Estados de São Paulo e Minas Gerais, sendo São Paulo responsável pela produção de 13.357.732 toneladas com rendimento de 33,15 t/há, além disso, é considerado o maior produtor nacional representando 77% da produção de laranja.

O consumo da laranja in natura no Brasil é muito comum, visto que 30% da produção é destinada ao país, no entanto, em outros países o consumo é maior do suco extraído da fruta de forma industrializada ou da fruta fresca. A nível mundial, três a cada cinco copos de suco de laranja consumidos são produzidos por fabricas brasileiras (CITRUS BR, 2019).

Segundo dados da Associação Nacional dos Exportadores de Suco Cítrico (CITRUS BR) há uma previsão que a produção de suco de laranja das safras de 2019 e 2020 gire em torno de 1.202.702 toneladas de *Frozen Concentrate Orange Juice* (FCOJ) (CITRUS BR, 2020). Além disso, deve-se levar em consideração que cerca de 50% do peso da fruta corresponde ao resíduo gerado no processamento da fruta para suco, logo se tem em torno de 1,2 milhões de toneladas anuais de resíduos no Brasil (SILVA; OLIVEIRA; MENDES, 2020; REZZADORI, BENEDETTI, 2009).

Os resíduos da laranja são ricos em pectina, celulose e polissacarídeos hemicelulósicos (MATSUURA, 2005) e são geralmente transformados em farelo, o qual pode ser usado para produção de doces, celulose, propectina, carboidratos solúveis, pectina, flavonóides, aminoácidos, essências aromáticas, bem como complemento alimentar para os animais (CLEMENTE et al., 2012). A casca da laranja é composta de 16,9% açúcares solúveis, 9,21% celulose, 10,5%

hemicelulose e 42,5% pectina. O reaproveitamento do bagaço de laranja também inclui o albedo, os caroços e filamentos da casca que apresentam uma composição rica em pectina, fibras e outros carboidratos (REZZADORI; BENEDETTI, 2009).

Um estudo conduzido por Deitos et al. (2014) aponta a viabilidade do aproveitamento da casca da laranja para produção de pectina e óleo essencial. Dos resíduos foram inicialmente extraídos o óleo essencial da laranja com um rendimento de 2,5% e do subproduto gerado foi extraída a pectina com um rendimento de cerca de 23%.

### 2.1.2 RESÍDUOS DE MARACUJÁ

O maracujá (*Passiflora edulis*) pertence à família Passifloraceae, ao gênero *Passiflora*, o qual é o mais representativo dessa família e o mais cultivado com cerca de 400 espécies, dos quais cerca de 150 são encontradas no Brasil (FALEIRO et al., 2011). Entretanto, apenas duas espécies de *Passiflora*, maracujá-amarelo (*P. edulis*) e o maracujá-doce (*P. alata*), têm alto valor comercial nas indústrias de bebidas, cosméticos e farmacêutica (CERQUEIRA-SILVA et al. 2016).

Segundo o IBGE (2019) a produção brasileira de maracujá foi de 593.429 t com área colhida de 41.584 ha, apresentando um rendimento de 14,27 t/ha, sendo 64,5% produzido na região nordeste. Além disso, o Brasil é considerado maior produtor e consumidor de maracujá podendo atingir cerca de 1 milhão de toneladas por ano, entretanto o país um rendimento por área consideravelmente baixo (FALEIRO; JUNQUEIRA, 2016).

O fruto de maracujá apresenta alta quantidade de casca e sementes, sendo que as cascas representam cerca de 52% e as sementes de 6 a 12% do peso total, dependendo da espécie (CUNHA, 2013). Esse fruto apresenta teores elevados de acidez com um sabor consideravelmente forte e com propriedades sedativas. Além disso, é rico em vitaminas, fibras insolúveis e o albedo, que corresponde à camada interna branca, que é rica em fibras solúveis, em especial a pectina, com pequenas quantidades de mucilagens (CUNHA, 2013; MELETTI, 2011; JANEIRO et al., 2008; CORDOVA et al., 2005; FERRARI; COLUSSI; AYUB, 2004).

Estima-se que mais de 60% da produção brasileira de maracujá amarelo sejam atribuídos ao consumo in natura e o restante sendo destinado a indústria, principalmente para a produção de suco (CLARO; MONTEIRO, 2010). Em média cerca de 70% do volume de resíduos produzidos compreende as cascas e sementes desse fruto, esses subprodutos não têm aplicações industriais, logo são descartados (REGIS, 2015; OLIVEIRA; REGIS; REZENDE, 2011). Os resíduos de maracujá gerados apresentam um elevado teor de umidade, presença de açúcares solúveis que sofrem fermentação imediata devido as condições ambientais após a extração do suco (REGIS, 2015).

### 2.3 ENZIMAS MICROBIANAS

As enzimas são moléculas usadas no intuito de aumentar a velocidade de reações químicas, agindo na forma de um catalisador. As enzimas diminuem a energia de ativação necessária para que a reação se realize (NELSON, 2014).

A otimização dos processos enzimáticos vem sendo alvo gradativamente pela indústria para diminuir os custos e melhorar a qualidade do produto final. As enzimas podem ser de origem vegetal, animal ou microbiana, no entanto, as de origem microbiana são as mais usadas visto que apresentam algumas vantagens, tais como a produção independente de fatores sazonais, possibilidade do uso de substratos de baixo custo como os resíduos agroindústrias, além de apresentar condições maleáveis que podem aumentar sua produtividade (MONTEIRO; SILVA, 2009).

As enzimas produzidas por microrganismos vêm sendo amplamente usadas na indústria pois apresentam uma alta facilidade de manipulação, produção em grandes volumes, liberação de do produto em meio extracelular, baixo custo de produção, redução de tempo de reação, estabilidade em diversas condições e a viabilidade de expressão e produção de enzimas recombinantes em células hospedeiras (GOPINATH et al., 2017).

A produção de enzimas microbianas extracelulares apresenta um grande interesse biotecnológico devido ao seu vasto emprego no mercado industrial, do mesmo modo que sua importância na degradação de matéria orgânica em diversos ambientes, com destaque das amilases, celulasas, pectinases e lipases (GURUNG et al., 2013; CHOUDHURY; BHUNIA, 2015).

O mercado global de enzimas com aplicações industriais cresceu entre 2014 e 2019 cerca de 51,7% segundo estimativas do Grand View Research – GVR (2019). Além disso, é estimado que em 2024 o mercado de enzimas movimentará mais de 9 milhões de dólares. Esse crescimento pode ser explicado por diversos fatores, incluindo o aumento da demanda pela indústria principalmente na área de alimentos e bebidas, bem como o crescimento do mercado farmacêutico. A exploração e o desenvolvimento da biotecnologia industrial também devem ser levados em consideração como um fator para o gradativo crescimento do mercado mundial de enzimas (GVR, 2019).

### 2.3.1 AMILASES

O amido é um homopolissacarídeo composto por duas cadeias: amilose e amilopectina. A amilose é formada por duas unidades de glicose unida pela ligação glicosídica  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 4) (BULÉON et al., 1998), enquanto a amilopectina é formada por duas moléculas de glicose unidas pelas ligações  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 4) e  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 6) gerando uma estrutura ramificada (CEREDA et al., 2001).

Encontrado em diversas plantas de importância econômica mundial, como por exemplo, no trigo, arroz, batata e mandioca, e pode ser extraído das raízes, tubérculos e sementes (GADHAVE; MAHANWAR; GADEKAR, 2017). Além de ser um dos mais importantes constituintes da dieta humana, amido representa um potencial como fonte de energia renovável e biodegradável (MAAREL et al., 2002; KARAKI et al., 2016).

As enzimas amilolíticas são capazes de hidrolisar ligações  $\alpha$ -glicosídicas gerando mono ou oligossacarídeos, e possuem a capacidade de formar ligações  $\alpha$ -1,4 ou  $\alpha$ -1,6 (transglicosilação) (AGIRRE et al., 2019; MAAREL, et al., 2020). Existem três tipos de amilases: as  $\alpha$ -amilases (endo-1,4- $\alpha$ -D-glucohidrolase), as  $\beta$ -amilases ( $\beta$ -1,4-glucomaltohidrolase) e glucoamilases (amiloglucoosidase) (RAO; SWAMY; SIVARAMAKRISHNA, 2007).

Além disso, essas enzimas são divididas em 4 subclasses: endoamilases, exoamilases, enzima desramificadoras e transferases. As endoamilases são capazes de hidrolisar ligações na parte interna da cadeia do amido, enquanto as exoamilases hidrolisam ligações do tipo  $\alpha$ -1,4 e/ou  $\alpha$ -1,6 nas partes externas da cadeia. Por outro lado, as enzimas desramificadoras hidrolisam ligações do tipo  $\alpha$ -1,6 do amido fazendo com que ramificações sejam

desfeitas, e as transferases geram novas ligações  $\alpha$ -1,4 e/ou  $\alpha$ -1,6, uma vez que novos monômeros são incorporados numa cadeia linear ou na forma de ramificações na cadeia amilácea. Para conseguir desfazer toda a cadeia glicosídica é necessária a utilização de um conjunto de diferentes tipos de amilases (AGIRRE et al., 2019; MAAREL, et al., 2020).

As amilases ocorrem amplamente em animais, plantas e microrganismos (SHAFIEI; ZIAEE; AMOOZEGAR, 2012) e são produzidas principalmente por bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus* (LIU; KOKARE, 2016; SINGH; SINGH; PANDEY, 2019). As enzimas amilolíticas compõem uma categoria de enzimas que desempenham papel fundamental no mercado industrial, podendo ser utilizadas em diversos processos como: alimentos panificados, diversos tipos de fermentações, indústrias têxteis e de papel, detergentes, liquefação de amido a aplicação bioenergética, utilizando o amido para a produção de etanol (BATISTA et al., 2018; TANG et al., 2020).

As amilases estão entre as hidrolases mais utilizadas em processos biotecnológicos, que representam anualmente nas vendas cerca de 65% no mercado mundial de enzimas (SIMAIR et al., 2017; SINGH; SINGH; PANDEY, 2019).

### 2.3.2 PECTINASES

A pectina é um homopolissacarídeo vegetal que contribui para a estrutura dos tecidos vegetais como componente da lamela média e parede celular primária (MARTOS et al., 2013). É composta por um complexo de polissacarídeos ácidos, no qual os resíduos de ácido galacturônico estão conectados por ligações  $\alpha$ -(1,4), parcialmente esterificados por grupos metil éster, além disso podem estar de forma parcial ou completamente neutralizadas como íons de sódio, potássio ou amônio. (GUMMADI; PANDA, 2003; KASHYAP et al., 2000; LIMBERG et al., 2000; SAKAI et al., 1993)

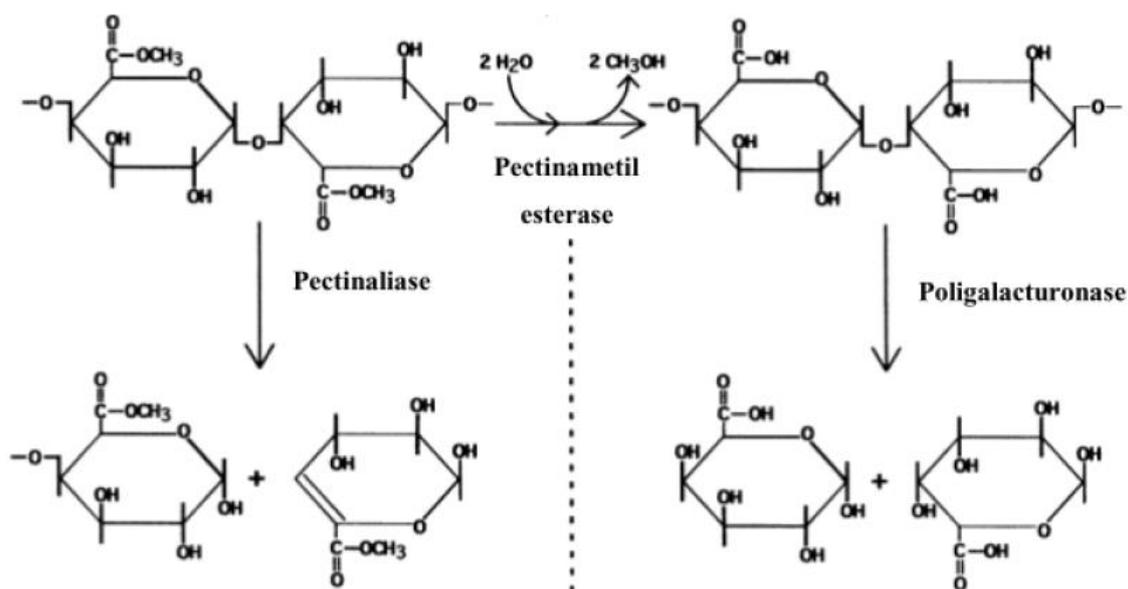
As pectinases são um grupo de enzimas que degradam a substâncias pécticas, essas enzimas são classificadas de acordo com seu mecanismo de ação. Por exemplo, as metilesterases removem grupos metoxi de galacturonano altamente ou parcialmente esterificado. As poligalacturonases catalisam a hidrólise das ligações glicosídicas de forma aleatória (endopoligalacturonase) ou a partir da extremidade não redutora de homogalacturonana, liberando resíduos

de ácido glucurônico ou galacturônico (exopoli-galacturonases) (CORNUAULT; POSÉ; KNOX, 2018; KAVUTHODI; SEBASTIAN, 2018; PEDROLLI et al., 2009).

Essas enzimas são classificadas como: poligalacturonases, que são subclassificadas como endo-poligalacturonases (EC 3.2.1.15) e exopoligalacturonases (EC 3.2.1.67); liases, que são subclassificadas em pectatites (EC 4.2.2.9 e EC. 4.2.2.2) ou pectina liases (EC 4.2.2.10); e pectina metilesterases (EC 3.1.1.11). Para que se consiga a degradação total da pectina é necessário usar diferentes tipos de pectinases, juntamente com outras enzimas, como celulases e hemicelulases, visto que esse conjunto de enzimas vai atuar em diferentes partes do biopolímero (OUMER; ABATE, 2018; GARG et al., 2016). Na figura 1 é possível observar a ação da pectina liase e poligalacturonase sobre a molécula de pectina.

As pectinases são produzidas por fungos, bactérias, insetos, nematóides e protozoários, sendo que para a produção comercial são usados principalmente *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. e *Bacillus* spp. (OUMER, 2017; DHITAL; PANTA; KARKI, 2013; KHAIRNAR et al., 2009). Entre os microrganismos que produzem enzimas extracelulares, destacam-se os fungos que possuem grande participação na decomposição da matéria orgânica. As pectinases produzidas por fungos são secretadas para quebrar a lamela média nas plantas, para que possam inserir hifas fúngicas e extrair nutrientes da planta (GUMMADI; PANDA, 2003; HOONDAL et al., 2002).

**Figura 1.** Esquema da degradação da pectina pelas enzimas pectina liase e poligalacturonase.



FONTE: Zielinski, 2013.

As pectinases microbianas apresentam ampla especificidade de substrato, versatilidade e capacidade de atuar sobre uma variedade de substâncias da pectina, o que as tornam biocatalisadores valiosos em diversos processos industriais (AMIN; BHATTI; BILAL, 2019). Além disso, constituem aproximadamente 10% da produção total de enzimas no mercado mundial e 25% da venda global na indústria alimentícia (OUMER, 2017; NADERI et al. 2012).

As enzimas pectinolíticas têm sido amplamente utilizados na produção de suco de frutas e vinho, indústria têxtil, no tratamento de resíduos vegetais, nos processos de fabricação de papel, na desengomagem de fibras vegetais, os processos de extração de óleo, e no processamento de chocolate, chá e café (KUBRA et al., 2018; NADERI et al., 2012; ZOHDI; AMID, 2013). As amilases podem ser usadas também no tratamento de águas residuais em indústrias de processamento de cítricos (HAMTA; DEHGhani, 2017).

## 2.4 BACTÉRIAS MARINHAS

O mundo marinho apresenta uma alta diversidade de organismos vivos tais como plantas, animais, bactérias, fungos e algas. A complexidade desse ecossistema é pouco conhecida quando se compara aos ambientes terrestres, visto que os oceanos consistem em cerca de 71% da superfície da terra (MATOS, 2012) e de forma geral são mais difíceis de serem estudadas.

As comunidades bacterianas marinhas vem sendo alvo de diversos estudos nas últimas décadas, tais como corais e esponjas, dentre outros (IMHOFF; LABES; WIESE, 2011; WATER et al., 2018; SOUZA et al., 2020). Essas populações de microrganismos sofrem diversas instabilidades do ambiente com relação a temperatura, pressão, salinidade, disponibilidade de nutrientes, além de diversas contaminações ambientais. Logo, esses microrganismos são capazes de sobreviver as diversas condições marinhas, podendo apresentar novas e únicas propriedades bioquímicas (JACKSON et al., 2015).

Devido a variação de diversos fatores abióticos, os microrganismos marinhos precisam aperfeiçoar os mecanismos de captação de nutrientes e defesa para sua sobrevivência. Dessa forma, os microrganismos associados as algas, esponjas, ascídios e corais produzem uma ampla diversidade de enzimas e metabólitos secundários que na maioria das vezes são quimicamente

diferentes quando comparado aos encontrados em ambientes terrestres (FELICIO; OLIVEIRA; DEBONSI, 2012; PENESYAN et al., 2013; SINGH et al., 2015).

Os corais são encontrados unicamente em ambientes marinhos, principalmente em áreas do Indo-Pacífico (SOARES et al., 2006; PECHENIK, 2016). No Brasil, o zoantídeo *Palythoa caribaeorum* (DUCHASSAING; MICHELOTTI, 1860), chamado de “coral mole”, é encontrado em grande parte do litoral brasileiro, como nos estados da Paraíba, Pernambuco e Rio Grande do Norte.

O zoantídeo *P. caribaeorum* é majoritariamente encontrada em regiões rasas com até 15 metros de profundidade se agrupando em uma espécie de tapete com capacidade de permanecer submerso ou sob a maré baixa (SOARES et al., 2006; CAMPOS, 2011; MELO, 2017; PAULINO et al., 2017). Os zoantídeos apresentam uma grande interação com os microrganismos que provem diversos benefícios para ambos. As bactérias auxiliam o coral gerando proteção contra outros microrganismos que possam ser patogênicos, na manutenção de saúde do coral, além de estar envolvido na reciclagem de diversos nutrientes (PECHENIK, 2016)

As populações bacterianas associadas aos corais vem sendo destaque nos últimos estudos voltados a essa área, por apresentarem um alto potencial para a produção de compostos de interesse biotecnológico. Alguns estudos têm apontado o potencial de microrganismos provenientes do zoantídeo *P. caribaeorum* como bons produtores de amilases, pectinases, celulasas, proteases e lipases (SANTOS, 2016; SOUZA et al., 2020; BRITO, 2020), biosurfactantes (TAVEIRA; GORLACH-LIRA, 2017), substâncias antimicrobianas (PEREIRA, 2020), além de apresentarem tolerância a altas concentrações de NaCl (SANTOS, 2016; BRITO, 2020).

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Analisar a produção de amilases e pectinases por bactérias marinhas usando resíduos agroindustriais como fonte de carbono.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Determinar a produção de amilases e pectinases por isolados bacterianos utilizando diferentes fontes de carbono;
- Avaliar a viabilidade das farinhas de maracujá e laranja como fonte de carbono alternativo para produção de amilases e pectinases;
- Analisar a influência do pH e da temperatura na produção de enzimas.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

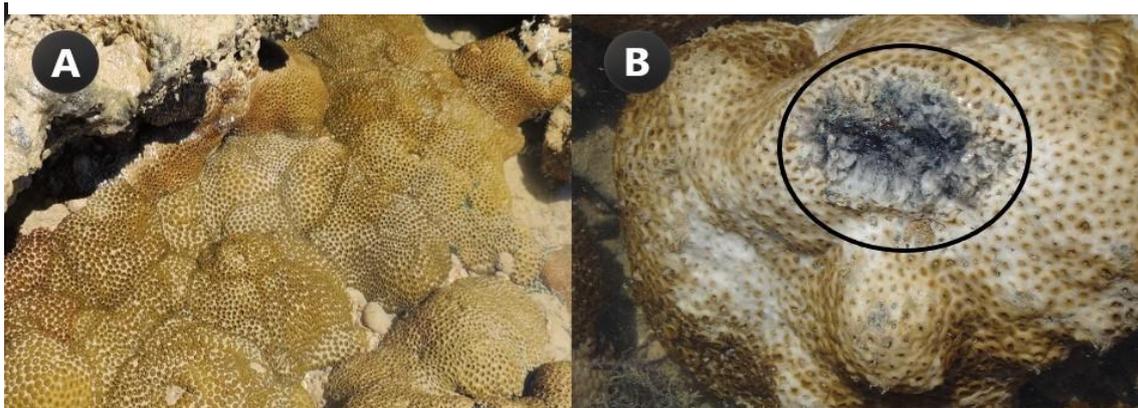
### 4.1 MICRORGANISMOS

O presente estudo foi realizado nas instalações do Laboratório de Biologia de Microrganismos (BIOMICRO) localizado no Departamento de Biologia Molecular (DBM) do Centro de Ciências Exatas e da Natureza (CCEN) na Universidade Federal da Paraíba (UFPB) – Campus I. Os isolados bacterianos usados nesse trabalho pertencem a uma coleção de bactérias proveniente do tecido necrosado do zoantídeo *Palythoa caribaeorum* (Figura 2), obtidos através de estudos anteriores realizados no BIOMICRO/DBM/CCEN/UFPB (2014, dados não publicados).

Nos trabalhos realizados anteriormente (2014, dados não publicados) as bactérias foram isoladas a partir de zoantídeos acometidos por uma necrose dos recifes da praia de Carapibus (7°18'03"S, 340 47'52"W) localizada no litoral Sul do município do Conde, Paraíba. Os isolados e foram denominadas como N\_ e NC\_. O isolamento bacteriano foi efetuado com auxílio de um suab no qual foi possível coletar células bacterianas do tecido necrosado do coral (Figura 2b) e em seguida cultivar em meio Agar marinho (pH 7,4) composto de 5,0 g de peptona (HiMedia), 1,0 g de extrato de levedura (DIFCO), 15,0 g de ágar bacteriológico (KASVI), 1000 mL de água do mar filtrada. Os isolados foram armazenados em tubos contendo ágar marinhos semisólido (4g/L de ágar) e em Eppendorf contendo células suspensas em água destilada estéril.

Os isolados foram identificados por Pereira (2020) e Brito (2020) na base das sequências de RNAr 16S submetidas a análise de similaridades com os dados do GenBank acessado através do site do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) e utilizando o programa BLAST - “*Basic Local Alignment Search Tools*” (ALTSCHUL, et al. 1997).

**Figura 2.** Zoantídeo *P. caribaeorum* sadio (A) e necrosado (B) nos recifes de Carapibus – PB.



FONTE: GORLACH-LIRA, 2014.

## 4.2 OBTENÇÃO DAS FARINHAS DE CASCAS DE FRUTAS

Os resíduos das frutas foram obtidos da casca da laranja pêra (*Citrus sinensis* L.) e das cascas do maracujá azeda (*Passiflora edulis*). As cascas foram submetidas a secagem em estufa a 60°C e o material seco passou pelo processamento no moinho de bolas e em seguida em moinho de facas devido a rigidez das cascas. A farinha foi peneirada para obter material homogêneo e com uma granulometria fina. As farinhas foram armazenadas em saco plástico em temperatura ambiente para posterior utilização.

## 4.3 ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE ENZIMAS EXTRACELULARES

Os ensaios foram efetuados em meios sólidos usando amido e farinha de laranja como substratos para produção de amilases, e ácido pécico e farinha de maracujá para a produção de pectinases. Todos os testes enzimáticos foram realizados em duplicata.

### 4.3.1 AMILASES

A produção de amilases foi analisada usando o meio composto por: amido ( $C_6H_{10}O_5$ )<sub>n</sub> (1 g/L), nitrato de sódio (NaNO<sub>3</sub>) (0,5 g/L), fosfato dipotássico (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) (1 g/L), sulfato de magnésio heptahidratado (MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O) (0,01 g/L) e ágar (15g/L) e água destilada (1000 mL) (TINDALL, et al., 2007; WOOD; KRIEG, 1989). Foi utilizado também um meio com a mesma composição, sendo que o amido foi substituído pela farinha de laranja (1 g/L). O pH dos meios de cultura foram ajustados para pH 5,0 usando o tampão acetato de sódio para pH

8,0 usando o tampão fosfato. Os meios foram autoclavados por 15 minutos a 121°C a 1 atm.

Para o preparo do tampão acetato de sódio a 0,1 mol/L<sup>-1</sup> (pH 5,0) utilizou-se 5,24g de C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub> e 2,16 mL de CH<sub>3</sub>COOH para 1000 ml de água destilada. O preparo da solução tampão fosfato de sódio foram feitas as seguintes soluções: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O a 0,1 mol/L<sup>-1</sup> (28,39 g foram diluídos em 1000 mL de água destilada) e NaHPO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O a 0,1 mol/L<sup>-1</sup> (27,60 g foram diluídos em 1000 mL de água destilada). Para alterar o pH do meio para 8 foi adicionado 5,3 mL da solução de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O e 94,7 mL NaHPO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O em 900 mL de água destilada.

Os isolados foram inoculados em placa de Petri contendo o meio indutor para a produção de amilases contendo amido ou farinha de laranja como fonte alternativa de carbono. Com o auxílio de uma alça de platina as bactérias foram inoculadas na placa em um ponto, e as placas foram incubadas em estufa bacteriológica por 72 h em duas temperaturas 37 e 50 °C.

Para a identificação da formação do halo de hidrólise do substrato usado uma solução de Lugol, contendo 3,3 g/L de iodo, 6,6 g/L de iodeto de potássio e 1000 mL de água destilada. Com o auxílio de um pistilo, o iodo e o iodeto de potássio foram macerados em um almofariz, com adições de concentrações de água destilada para dissolver os compostos que ficaram impregnados no almofariz. A solução foi armazenada em um recipiente opaco para não sofrer fotodegradação para posterior utilização.

Com a utilização de uma pipeta de Pasteur a solução de Lugol foi adicionada nas placas com o meio para amilases até que a superfície toda estivesse coberta. Após alguns minutos é possível visualizar os halos de hidrólise formado pelos isolados produtores de amilases. Posteriormente, o Lugol disposto nas placas foram descartados em um recipiente específico. Para determinar o índice enzimático foi realizado a medição do halo de hidrólise formado e da colônia bacteriana utilizando uma régua.

#### 4.3.2 PECTINASES

A produção de pectinases foi testada usando o meio composto por: ácido péctico (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>6</sub>)<sub>n</sub> (5 g/L), extrato de levedura (1 g/L), fosfato dipotássico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) (3 g/L), fosfato de sódio dibásico (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) (6 g/L), sulfato de

magnésio heptahidratado ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) (0,1 g/L), cloreto de cálcio dihidratado ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) (0,14 g/L), ágar (15g/L) e água destilada (1000 mL) (HANKIN; ANAGNOSTAKIS, 1975). Foi utilizado também um meio com a mesma composição, sendo que o ácido péctico foi substituído pela farinha de maracujá (5 g/L). O pH dos meios de cultura foram ajustados para pH 5 usando o tampão acetado de sódio e para pH 8 usando o tampão fosfato, como foi descrito no item 4.3.1. Os meios foram autoclavados por 15 minutos a 121°C a 1 atm.

Os isolados foram inoculados em placa de Petri com o meio indutor para a produção de pectinases contendo ácido péctico ou farinha de maracujá como fonte alternativa de carbono. Com o auxílio de uma alça de platina as bactérias foram inoculadas na placa em um ponto, posteriormente as placas foram incubadas em estufa bacteriológica por 72 h em duas temperaturas 37 e 50°C.

Para visualizar o halo de hidrólise de pectina foi usada uma solução de Lugol concentrado descrita no item 4.3.1. Com a utilização de uma pipeta de Pasteur a solução de Lugol foi adicionada nas placas como o meio para pectinases até cobrir toda a superfície. Após alguns minutos é possível visualizar os halos de hidrólise formados pelos isolados produtores de pectinases. Posteriormente, o Lugol disposto nas placas foi descartado em um recipiente específico. Para determinar o índice enzimático foi realizado a medição do halo de hidrolise formado e da colônia bacteriana utilizando uma régua.

#### 4.3.4 ÍNDICE ENZIMÁTICO

A atividade enzimática foi expressa como índice enzimático (IE), o qual apresenta a relação entre o diâmetro médio do halo de degradação e o diâmetro médio da colônia (HANKIN; ANAGNOSTAKIS, 1975).

$$\text{IE: } \frac{\text{diâmetro do halo de degradação}}{\text{diâmetro da colônia}}$$

Dessa forma, os isolados que exibirem maiores valores do IE, apresentam maior atividade enzimática (HITHA; GIRIJA, 2014).

#### 4.4 PRODUÇÃO DE AMILASES E PECTINASES PELO ISOLADO *Bacillus* sp. N1

O isolado *Bacillus* sp. N1 foi escolhido para um estudo mais detalhado na base dos dados obtidos nos testes anteriores para avaliar a atividade enzimática do sobrenadante livre de células em diferentes condições de pH e temperatura.

##### 4.4.1 ATIVIDADE AMILOLÍTICA

A produção de amilases foi realizada nos meios líquidos como descrito no item 4.4.1, mais sem a adição de ágar. Foram usados os seguintes substratos: amido (2 g/L), farinha de laranja (2 g/L) e farinha de maracujá (2 g/L).

O isolado foi previamente incubado em 10 mL do meio Brain Heart Infusion – BHI (HiMedia) por 48 horas à 37° C em uma estufa bacteriológica. 1 mL da cultura foi adicionado em um Erlenmeyer contendo 50 mL do meio com amido, farinha de laranja ou farinha de maracujá. As culturas foram incubadas a 37°C em shaker com agitação de 150 rpm por 3 dias, e as alíquotas foram submetidas a uma centrifugação a 10.000 rpm por 5 minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante livre de células foi armazenado em tubo de Falcon estéril de 15 mL em geladeira (4°C).

Para avaliar a influência do pH sobre atividade de enzimas contidas no sobrenadante foi usado o meio composto por amido (1 g/L) e ágar (15 g/L) dissolvidos em tampões de acetato de sódio 0,1 mol/L<sup>-1</sup>, pH 5 e o tampão fosfato de potássio mol/L<sup>-1</sup>, pH 6, 7 e 8. A análise foi feita nas temperaturas de 37 e 50°C.

A preparação do tampão acetato de sódio e fosfato de sódio foi realizado como descrito no item 4.3.1. A partir dessas soluções foram obtidos os tampões: pH 6 (87,7 mL da solução de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O e 12,3 mL NaHPO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O em 900 mL de água destilada); pH 7 (39,0 mL da solução de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O e 61,0 mL NaHPO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O em 900 mL de água destilada).

Foram feitos os poços com um diâmetro de 9 mm no meio com substrato específico na placa de Petri e em seguida alíquotas de 100 µL do sobrenadante foram adicionadas aos poços para avaliar a atividade de amilases. Como controle negativo, utilizou-se o meio BHI líquido substituindo o sobrenadante.

As placas em duplicata foram incubadas por 48h em 37 e 50°C, a visualização dos halos de hidrólise foi feita mediante a adição da solução de Lugol como descrito no item 4.3.1. A determinação dos halos de hidrólise do amido foi feita utilizando um paquímetro.

#### 4.4.2 ATIVIDADE PECTINOLÍTICA

A produção de pectinases foi realizada no meio descrito no item 4.4.2, mais sem a adição de ágar, usando os seguintes substratos: ácido péctico (5 g/L), farinha de laranja (5 g/L) e farinha de maracujá (5 g/L).

O isolado foi previamente incubado em 10 mL do meio Brain Heart Infusion – BHI (HiMedia) por 48 horas à 37°C em uma estufa bacteriológica. 1 mL da cultura foi adicionado em um Erlenmeyer contendo 50 mL do meio com amido, farinha de laranja ou farinha de maracujá. As culturas foram incubadas a 37°C em shaker com agitação de 150 rpm por 3 dias.

As culturas foram submetidas a uma centrifugação a 10.000 rpm por 5 minutos em temperatura ambiente e o sobrenadante livre de células foi armazenado em tubo de Falcon estéril de 15 mL em geladeira (4°C).

A influência do pH foi analisada no meio composto por ácido péctico (1 g/L) e ágar (15 g/L) em tampões de acetato de sódio 0,1 mol/L<sup>-1</sup>, pH 5 e o tampão fosfato de potássio 0,1 mol/L<sup>-1</sup>, pH 6, 7 e 8, o preparo dos tampões foi descrito nos itens 4.3.1 e 4.4.1.

Foram feitos os poços com um diâmetro de 9 mm no meio com substrato específico na placa de Petri e em seguida alíquotas de 100 µL do sobrenadante foram adicionadas aos poços para avaliar a atividade de pectinases. Como controle negativo foi utilizado o meio líquido BHI substituindo o sobrenadante.

As placas em duplicata foram incubadas por 48h em 37 e 50°C, a visualização dos halos de hidrólise foi feita usando a solução de Lugol como descrita no item 4.3.1. A determinação dos halos de hidrólise da pectina foi feita utilizando um paquímetro.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 PRODUÇÃO DE AMILASES

No presente trabalho foram testados quatorze isolados de bactérias provenientes do tecido necrosado do zoantídeo *P. caribaeorum* pertencentes aos gêneros *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Staphylococcus*, *Exiguobacterium* e *Pseudomonas* (Tabela 1). Os isolados foram identificados nos estudos anteriores conduzidos por Pereira (2020) e Brito (2020).

**Tabela 1.** Isolados de bactérias provenientes do tecido necrosado de *P. caribaeorum*.

Gênero/Espécie	Isolado
<i>Bacillus</i>	N1, N5; NC1, NC3, NC4, NC7, NC8,
<i>Arthrobacter koreensis</i>	NC9, NC10
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	N2
<i>Exiguobacterium sp.</i>	NC6
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	NC2, NC5

Fonte: PEREIRA, 2020; BRITO, 2020.

As tabelas 2 e 3 mostram os resultados da atividade das amilases por isolados bacterianos em meio contendo amido e farinha da laranja, respectivamente, a 37°C e 50°C.

A atividade amilolítica foi observada nos isolados do gênero *Bacillus* (30,6%) N1, NC1, NC4 e NC8 em meio contendo amido, principalmente em pH 7,0 (Tabela 2). O maior índice enzimático (IE) (10,4) pode ser observado para o isolado *Bacillus sp.* N1 (10,4) em meio contendo amido em pH 7 a 50°C. Entretanto, esse mesmo isolado cultivado em meio contendo farinha de laranja apresentou uma menor atividade (Tabela 3). Os isolados das espécies *A. koreensis* e *P. stutzeri* apresentaram produção de amilases em pH 7,0 e 8,0.

A substituição do amido pela farinha de laranja (Tabela 3) como fonte de carbono para a produção de amilases foi favorável para os isolados do gênero *Bacillus* N1, NC1, NC8, *P. stutzeri* NC2, NC5 e para o isolado *A. koreensis* NC9 em pH 7 a 37°C, entretanto alguns isolados, ativos no meio com amido, não produziram amilases nesse meio (Tabela 3).

**Tabela 2.** Os valores do índice enzimático para amilases dos isolados de bactérias nos meios de cultivo contendo amido em diferentes condições de pH e temperatura.

Isolado	Índice Enzimático (IE)					
	pH 5		pH 7		pH 8	
	37°C	50°C	37°C	50°C	37°C	50°C
<b><i>Bacillus</i> spp.</b>						
N1	0,0	0,0	4,8	10,4	0,0	0,0
N5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
NC1	0,0	0,0	1,6	3,1	0,0	0,0
NC3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
NC4	0,0	0,0	2,6	0,0	0,0	0,0
NC7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
NC8	0,0	0,0	2,2	1,7	0,0	0,0
<b><i>Arthrobacter koreensis</i></b>						
NC9	0,0	0,0	3,0	0,0	3,1	0,0
NC10	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<b><i>Staphylococcus epidermidis</i></b>						
N2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<b><i>Exiguobacterium</i> sp.</b>						
NC6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<b><i>Pseudomonas stutzeri</i></b>						
NC2	0,0	0,0	1,9	5,4	1,3	0,0
NC5	0,0	0,0	1,8	0,0	0,0	0,0

Fonte: Autoria própria, 2020.

Os isolados mais ativos para a produção de amilases em meio contendo farinha de laranja (Tabela 3) foram *P. stutzeri* NC2 (5,8), NC5 (5,0) e NC8 (3,9) em pH 7 a 37°C. Em pH 8 a 37°C os isolados mais ativos foram *A. koreensis* NC9 (3,7), *P. stutzeri* NC5 (3,1) e NC8 (3,7). O maior índice enzimático (5,8) foi observado para o isolado *P. stutzeri* NC2 a 37°C no pH 7.

A produção de enzimas é influenciada por diversos fatores tais como temperatura, tempo de incubação, pH, quantidade do inóculo, dentre outros fatores, assim como a quantidade da enzima produzida também é influenciada pelo tipo de microrganismo (SUKMAWATI, 2018; PANGESTI et al., 2012; SUKMAWATI; ROSALINA, 2020).

No nosso estudo com relação a produção de amilases nos meios com amido e farinha de laranja podemos destacar a falta de produção dessas enzimas em pH 5 em ambas as temperaturas testadas (Tabelas 2 e 3).

Os isolados *Exiguobacterium* sp. NC6, *S. epidermidis* N2, *Bacillus* sp. NC7 não foram capazes de produzir amilases nos meios utilizados. Na literatura produção de  $\alpha$ -amilases por bactérias do gênero *Exiguobacterium* foi relatado

por Mojallali et al. (2014), porém, o isolado desse gênero testado nesse estudo não apresentou atividade.

**Tabela 3.** Os valores do índice enzimático para amilases dos isolados de bactérias nos meios de cultivo contendo farinha da laranja em diferentes condições de pH e temperatura.

Isolado	Índice Enzimático (IE)					
	pH 5		pH 7		pH 8	
	37°C	50°C	37°C	50°C	37°C	50°C
<b><i>Bacillus</i> spp.</b>						
N1	0,0	0,0	2,3	0,0	0,0	0,0
N5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
NC1	0,0	0,0	0,0	0,0	1,3	0,0
NC3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
NC4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
NC7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
NC8	0,0	0,0	3,9	0,0	2,1	0,0
<b><i>Arthrobacter koreensis</i></b>						
NC9	0,0	0,0	3,0	0,0	2,1	0,0
NC10	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<b><i>Staphylococcus epidermidis</i></b>						
N2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<b><i>Exiguobacterium</i> sp.</b>						
NC6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<b><i>Pseudomonas stutzeri</i></b>						
NC2	0,0	0,0	5,8	0,0	0,0	0,0
NC5	0,0	0,0	5,0	0,0	3,1	0,0

Fonte: A autoria própria, 2020.

Os resíduos oriundos do processamento da laranjas vêm sendo demonstrado como fonte viável para a produção de amilases. Uygut e Tanyildizi (2018), demonstrou a produção de enzimas amilolíticas por bactérias usando cascas de laranja como fonte de amido, destacando os isolados do gênero *Bacillus*.

Alguns estudos como de Gomes et al. (2007), Cordeiro e Martins (2009), Brack et al. (2015), Souza et al. (2020), Sukmawati et al. (2021) ressaltam o gênero *Bacillus* com alto potencial para a produção de amilases, corroborando com resultados desse estudo.

Mawati et al. (2021) realizaram a triagem de bactérias termofílicas produtoras de amilases provenientes de uma fonte de água quente em South Lampung, Indonésia e observaram que *P. stutzeri* apresentou maior atividade amilolítica em 50°C com um halo de hidrólise de 15,4 mm.

## 5.2 PRODUÇÃO DE PECTINASES

Nas tabelas 4 e 5 estão expostos os resultados dos halos de hidrólise da pectina usando as pectinases produzidas em meio contendo ácido pécico e farinha de maracujá, os testes foram realizados nas temperaturas de 37°C e 50°C.

As pectinases foram produzidas principalmente por isolados do gênero *Bacillus* (23%) N1, NC1 e NC8 em meio contendo ácido pécico, principalmente nos pH 7 e 8 (Tabela 4). O maior IE (5,9) foi observado para o isolado *Bacillus* sp. N1 em pH 7 e 8, porém, pode-se observar que esse isolado apresentou um maior IE (7,8) em meio contendo farinha de maracujá em pH 7 (Tabela 5).

O pH influencia a atividade de pectinases específicas, em pH 5 se tem atividade da pectina liase (PL) e em pH 8 de poligalacturonase (PG) ((HANKIN; ANAGNOSTAKIS, 1975). Nesse estudo é possível observar nas tabelas 4 e 5 que os isolados foram capazes de produzir pelo menos um dos tipos de enzimas pectinolíticas. O isolado *Bacillus* N1 foi o único capaz de produzir PG e PL em temperaturas de 37°C e 50°C.

Os isolados *Bacillus* spp. NC3, NC7, NC10, *Exiguobacterium* sp. NC6 e *S. epidermidis* N2 não foram capazes de produzir pectinases em nenhuma das condições testadas.

Em meio contendo farinha de maracujá (Tabela 5) para a produção de pectinases observa-se que a maioria dos isolados ativos pertencem ao gênero *Bacillus* (30,7 %), sendo este número maior que em meio com ácido pécico. O maior IE (7,8) foi observado para o isolado *Bacillus* sp. N1.

O meio com farinha de maracujá foi favorável principalmente para o isolado *Bacillus* NC4 já que ele não foi ativo em meio contendo ácido pécico. Além disso, é possível observar que o isolado *Bacillus* sp. NC1 foi capaz de produzir PL e PG apenas nesse meio, os demais isolados foram capazes de produzir pelo menos uma das enzimas testadas.

Os isolados mais ativos em meio contendo farinha de maracujá foram *Bacillus* spp. N1 (7,8), NC4 (3,0) com os maiores índices enzimáticos e *P. stutzeri* NC5 (1,9) em pH 7, enquanto em pH 8 os mais ativos foram *A. koreensis* (3,0), *P. stutzeri* NC5 (3,0) e *Bacillus* sp. NC4 (2,9), ambos em temperatura de 37°C.

O meio contendo FM (Tabela 5) proporcionou uma maior atividade dos isolados *Bacillus* spp. N1, NC1 e *A. koreensis* NC9 quando comparado com o meio contendo ácido pécico. No meio contendo farinha de maracujá a 50°C não houve produção de enzimas pectinolíticas em nenhum dos pH testados.

**Tabela 4.** Os valores do índice enzimático para pectinases dos isolados de bactérias nos meios de cultivo contendo ácido pécico em diferentes condições de pH e temperatura.

Isolado	Índice Enzimático (IE)					
	pH 5		pH 7		pH 8	
	37°C	50°C	37°C	50°C	37°C	50°C
<b><i>Bacillus</i> spp.</b>						
N1	1,9	1,7	5,9	0,0	5,9	3,6
N5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
NC1	1,6	0,0	0,2	0,0	1,1	0,0
NC3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
NC4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
NC7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
NC8	0,0	0,0	4,0	0,0	2,6	1,6
<b><i>Arthrobacter koreensis</i></b>						
NC9	1,2	0,0	1,3	0,0	1,3	0,0
NC10	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<b><i>Staphylococcus epidermidis</i></b>						
N2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<b><i>Exiguobacterium</i> sp.</b>						
NC6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<b><i>Pseudomonas stutzeri</i></b>						
NC2	0,0	2,0	1,9	0,0	1,5	0,0
NC5	2,7	0,0	2,5	0,0	2,0	0,0

Fonte: Autoria própria, 2020.

A biossíntese e atividade das pectinases pode ser afetada por diversos fatores, tais como os componentes do meio de cultura em especial da fonte de carbono, presença de indutores (UENOJO; PASTORE, 2007; BLANDINO et al., 2001), e das condições de cultivo, como pH, temperatura, tempo de incubação, concentração do inóculo, aeração, agitação e tempo de incubação (SOUZA et al., 2003).

O gênero *Bacillus* tem sido citado por diversos estudos sendo um gênero de bactérias com alto potencial para a produção de pectinases. Um estudo conduzido por Andrade et al. (2018) aponta o gênero *Bacillus* com alto potencial para a produção de pectinolíticas e celulolíticas a partir da fermentação sólida do resíduo do cajá, mostrando a melhor atividade de pectinases em 30°C.

Por outro lado, o estudo de Oumer e Abate (2017) caracterizaram uma pectinase produzida por *B. subtilis*, a qual apresentou atividade máxima em pH

7 a 50°C, sendo que sua atividade foi estimulada por íons de Mg<sup>2+</sup> e Ca<sup>2+</sup> e permanecendo estável em EDTA, Triton-100, Tween 80 e Tween 20.

**Tabela 5.** Os valores do índice enzimático para pectinases dos isolados de bactérias nos meios de cultivo contendo farinha de maracujá em diferentes condições de pH e temperatura.

Isolado	Índice Enzimático (IE)					
	pH 5		pH 7		pH 8	
	37°C	50°C	37°C	50°C	37°C	50°C
<b><i>Bacillus</i> spp.</b>						
N1	0,0	0,0	7,8	0,0	2,4	0,0
N5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
NC1	1,8	0,0	1,3	0,0	1,2	0,0
NC3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
NC4	0,0	0,0	3,0	0,0	2,9	0,0
NC7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
NC8	0,0	0,0	1,7	0,0	1,6	0,0
<b><i>Arthrobacter koreensis</i></b>						
NC9	0,0	0,0	1,3	0,0	3,0	0,0
NC10	0,0	0,0	0,0	0,0	0	0,0
<b><i>Staphylococcus epidermidis</i></b>						
N2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<b><i>Exiguobacterium</i> sp.</b>						
NC6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<b><i>Pseudomonas stutzeri</i></b>						
NC2	0,0	0,0	1,0	0,0	2,5	0,0
NC5	0,0	0,0	1,9	0,0	3,0	0,0

Fonte: Autoria própria, 2020.

### 5.3 ATIVIDADE AMIOLÍTICA E PECTONOLÍTICA DO ISOLADO

#### *Bacillus* sp. N1

Na base dos dados da produção de amilases e pectinases por treze isolados analisados nesse estudo foi constatado que o isolado mais ativo foi o *Bacillus* sp. N1, o qual foi selecionado para um estudo mais detalhado sobre sua atividade enzimática em diferentes pHs e temperatura.

A tabela 6 e Figura 3 mostram atividade amilolítica do isolado *Bacillus* sp. N1. Atividade de amilases do sobrenadante livre de células obtido do cultivo em meio contendo amido foi mais alta em temperatura 37°C e pH 6,0, com halo de hidrólise de 26,4 mm (Tabela 6). Em temperatura 50°C o maior halo (18,6 mm) foi observado no pH 7.

A atividade amilolítica do sobrenadante obtido do cultivo em meio contendo farinha de laranja (Figura 3) foi mais alta em pH 7,0 em ambas as temperaturas: 37°C (26,0 mm) e 50°C (24,1 mm). As amilases produzidas em

meio com farinha de maracujá apresentaram um maior halo de hidrólise (24,9 mm) em pH 7,0 e 37°C, enquanto em 50°C foi possível notar que a atividade da enzima no mesmo pH foi mais baixa (19,2 mm).

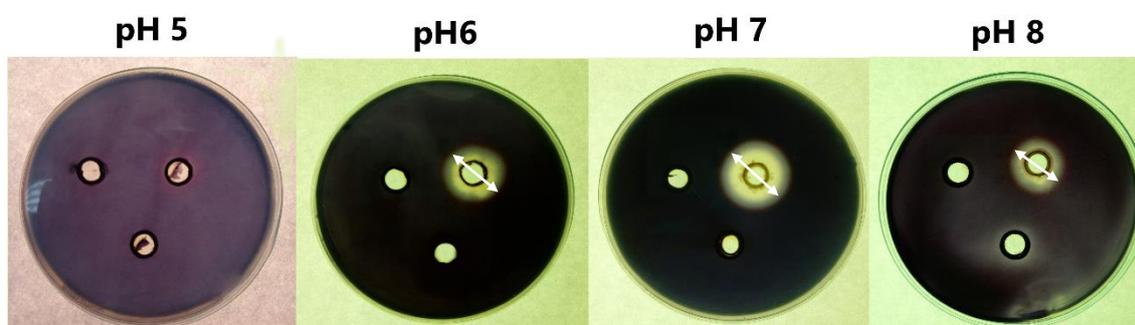
De forma geral, a produção de amilases foi maior em meio com farinha de laranja e de maracujá em temperatura 37°C em pH 7,0. Os valores obtidos para as farinhas de casca de frutas indicam sua viabilidade para produção amilases, oferecendo um substrato de baixo custo.

**Tabela 6.** Atividade amilolítica do sobrenadante do isolado *Bacillus* sp. N1, cultivado nos meios com diferentes fontes de carbono e em diferentes condições de pH e temperatura.

	Halos de Hidrólise (mm)					
	Amido		Farinha de laranja		Farinha de maracujá	
	37 °C	50 °C	37 °C	50 °C	37 °C	50 °C
<b>pH 5</b>	12,7	14,1	0,0	0,0	0,0	16,8
<b>pH 6</b>	26,4	12,6	25,6	21,0	21,4	0,0
<b>pH 7</b>	23,2	18,6	26,0	24,1	24,9	19,2
<b>pH 8</b>	20,8	0,0	23,3	0,0	20,7	0,0

**FONTE:** Autoria própria, 2021.

**Figura 3.** Atividade amilolítica em temperatura de 37°C em diferentes pHs do sobrenadante do isolado *Bacillus* sp. N1 cultivado no meio contendo farinha de laranja. As setas indicam o halo de hidrólise do amido.



**FOTO:** Autoria própria, 2021.

Nuraliyah (2017) analisou a produção de  $\alpha$ -amilase por *Bacillus* sp. e observou que a maior atividade específica foi em pH 6,0 e temperatura 40°C. Istia'nah et al. (2020) observou em seu trabalho a maior atividade de amilases produzidas por *B. megaterium* em 37°C e pH 5,0.

Algumas metodologias vêm sendo usadas para determinar condições ótimas para a produção de enzimas, Trentin et al. (2015) fez uso de planejamento estatístico de experimentos na determinação do pH e temperatura ótimos de  $\alpha$ -amilase de *B. licheniformis*. Os autores relatam que a  $\alpha$ -amilase produzida pelo isolado apresentou uma maior atividade enzimática (8,7 U/mL) e

estabilidade em temperatura acima de 60°C em uma ampla faixa de pH variando de 9 a 11.

Coca (2019) realizou em seu estudo a otimização e caracterização de  $\alpha$ -amilases produzidas pelo isolado *B. amyloliquefaciens*. Foi observado que a maior produção de  $\alpha$ -amilase ocorreu em temperatura de 30°C e pH inicial de 6,5. Além disso, percebeu-se que a adição fécula de batata ao meio na concentração de 1% aumentou a produção em 72%. Ainda, a autora afirma que a adição do íon de cobalto na concentração de 10 mM provoca um aumento na atividade enzimática de 1.004%.

Um estudo conduzido por Rachmania et al. (2019) avaliou a produção de amilases por *Bacillus firmus* KH.9.4. O isolado apresentou atividade ótima de  $\alpha$ -amilase após 15 horas de cultivo em meio líquido em pH 6 e temperatura de 80°C.

A Tabela 7 e Figura 4 mostram atividade pectinolítica do isolado *Bacillus* sp. N1. A maior atividade do sobrenadante obtido do cultivo em meio contendo ácido pécico foi observado em pH 7,0 a 37°C (halo de 59,9 mm) (Tabela 7). A farinha de maracujá mostrou-se melhor substrato para produção de pectinases comparando com farinha de laranja. Para o meio com farinha de maracujá maiores halos de hidrólise (48,4 mm) foram observados em pH 7,0 a 37°C, enquanto para o meio com farinha de laranja os halos foram menores (23,4 mm), sendo que as amilases foram mais ativas em pH 8,0 a 37°C. Em geral, a atividade de pectinases foi menor em 50°C quando comparada com temperatura de 37°C.

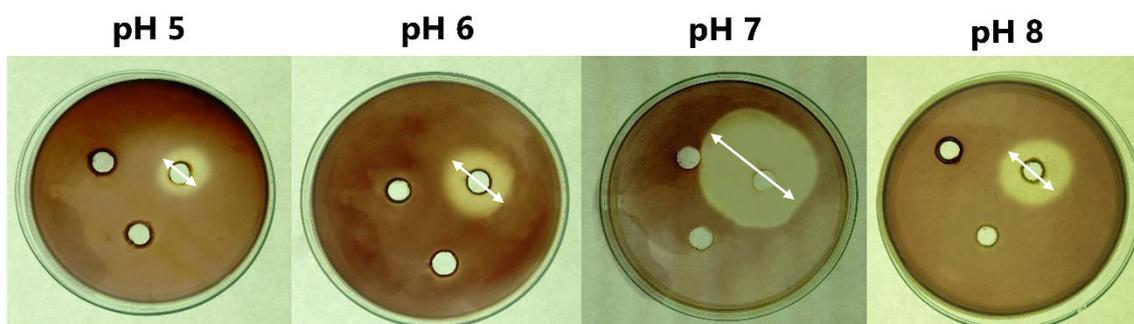
O pH influencia a produção de pectinases específicas, sendo que em pH 5 é produzido pectina liase (PL) enquanto em pH 8 se tem poligalacturonase (PG) (HANKIN; ANAGNOSTAKIS, 1975). O ácido pécico proporcionou uma maior produção de PL como pode ser observado na tabela 7, enquanto a farinha de maracujá (Figura 4) aumentou a produção de PG quando comparado aos resultados obtidos em meio contendo ácido pécico. Sendo assim, pode-se dizer que a farinha de maracujá é uma fonte promissora para a produção de pectinases.

**Tabela 7.** Atividade pectinolítica do sobrenadante do isolado *Bacillus* sp. N1, cultivado nos meios com diferentes fontes de carbono e em diferentes condições de pH e temperatura.

	Halos de Hidrólise (mm)					
	Ácido pécico		Farinha de laranja		Farinha de maracujá	
	37 °C	50 °C	37 °C	50 °C	37 °C	50 °C
<b>pH 5</b>	39,0	29,7	0,0	0,0	18,6	15,7
<b>pH 6</b>	33,5	28,0	0,0	0,0	32,5	24,5
<b>pH 7</b>	59,9	25,0	22,1	0,0	48,4	29,8
<b>pH 8</b>	27,2	28,3	23,4	0,0	31,9	22,4

**FONTE:** Aatoria própria, 2021.

**Figura 4.** Atividade pectinolítica em temperatura de 37°C em diferentes pHs do sobrenadante do isolado *Bacillus* sp. N1 cultivado no meio contendo farinha de maracujá. As setas indicam o halo de hidrólise do ácido pécico.



**FOTO:** Aatoria própria, 2021.

Uzuner e Cekmecelioglu (2015) demonstraram em seu estudo a produção de poligalacturonase (PG) pelo isolado *B. subtilis*, os resultados de otimização indicaram uma atividade máxima de PG de  $5,60 \text{ U / mL}^{-1}$  alcançada em pH 7 em temperatura de 30 °C. Os resultados mostraram um aumento de 2,7 vezes na atividade enzimática usando casca de avelã como substrato.

Por outro lado, o estudo de Kaur e Gupta (2017) avaliou a produção de pectinase e pectina liase por *Bacillus subtilis* SAV-21 isolado de frutas e vegetais. A maior produção de pectinase e pectina liase foi registrada na presença de uma combinação de casca de laranja e fibra de coco (4:1), com um teor de umidade de 60%, em temperatura 35°C e pH 4.

Murugan et al. (2021) retrata em seus achados que a maior produção de pectinases por *Bacillus* sp. ocorreu em pH 7 em temperatura de 37°C, sendo que as melhores condições para atividade dessas enzimas foram pH 6 e temperatura de 40°C.

O processo de otimização de produção de pectinase realizado por Yu e Xu (2018) demonstrou a atividade específica do isolado *Bacillus* sp. Zj1007 de

110,47 U/mg, em pH 5,0 e em temperatura de 37°C, mostrando também uma alta estabilidade térmica em 80 e 90°C.

Como foi exposto, vários estudos mostram a atividade amilolítica e pectinolítica de isolados pertencentes ao gênero *Bacillus*, bem como o uso de alguns substratos alternativos para produção dessas enzimas. Nosso estudo aponta que os isolados de bactérias marinhas, principalmente do gênero *Bacillus*, apresentam um potencial para produção de amilases e pectinases utilizando as farinhas de laranja e maracujá como fontes de carbono mais baratas.

## 6. CONCLUSÕES

1. Dentre os 13 isolados analisados, 4 isolados produziram amilases em meio contendo farinha de laranja e 3 isolados em meio com amido. A produção de pectinases foi observada para 7 isolados em meio com farinha de maracujá e para 6 isolados em meio com ácido pécico.
2. O isolado *Bacillus* sp. N1 apresentou maior índice enzimático para amilases e pectinases em meios com diferentes fontes de carbono.
3. O sobrenadante livre de células do isolado *Bacillus* sp. N1 apresentou halos de hidrólise de amido (25,0 a 26,4 mm) semelhantes para os cultivos em meio contendo amido, farinha de laranja e farinha de maracujá em temperatura de 37°C, pH 6 ou 7. Nessas condições atividade amilolítica foi mais alta.
4. Com relação a atividade pectinolítica do isolado *Bacillus* sp. N1 foi observado que o sobrenadante obtido do cultivo em meios contendo ácido pécico e farinha de maracujá apresentaram maiores halos de hidrólise, 59,9 e 48,4 mm, respectivamente, em 37°C e pH 7.
5. A atividade enzimática das amilases e pectinases testadas em temperatura de 50°C foi inferior aos dados obtidos à 37°C, demonstrando que o aumento da temperatura não foi favorável para a atividade dessas enzimas.
6. As farinhas de laranja e maracujá demonstraram ser boas fontes de carbono para a produção de amilases e pectinases por bactérias, que podem ser mais exploradas para diminuir os custos e otimizar a produção de enzimas.

## REFERÊNCIAS

AGIRRE, J. et al. The structure of the AliC GH13  $\alpha$ -amylase from *Alicyclobacillus* sp. reveals the accommodation of starch branching points in the  $\alpha$ -amylase family. **Acta Crystallographica Section D: Structural Biology**, v. 75, n. 1, p. 1–7, 2019.

ALTSCHUL, S. F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, p. 3389-3402, 1997.

ALVES, G. A. R.; AVIZ, R. O.; BORGES, L. S. Laranja – Panorama nacional da produção. **Revista Campos e Negócios**, Minas Gerais, 2019.

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.

ANDRADE, A.S.A et al. Estudo da produção de enzimas pectinolíticas e celulolíticas por fermentação em estado sólido a partir do bagaço de cajá. **Revista Saúde & Ciência Online**, v. 7, n. 2, p. 457-472, 2018.

ASSOCIAÇÃO NACIONAL DOS EXPORTADORES DE SUCOS CÍTRICOS (CITRUSBR). 2020. **Comunicado ao mercado: Estoques Auditados em 30 de junho de 2020**. Disponível em: <http://www.citrusbr.com/destaques/?id=312916>. Acesso em: 15 nov. 2021.

BATISTA, E.; PASSARINI, M. R. Z.; WATANABE, J. Y. M.; OLIVEIRA, V. M. Avaliação da produção de amilase e protease por bactérias da Antártica. **Revista Brasileira de Iniciação Científica**, São Paulo, Brasil, v.2, n. 2, 9 abr. 2018.

BLANDINO, A. et al. Utilisation of whole wheat flour for the production of extracellular pectinases by some fungal strains. **Process Biochemistry**, v. 37, n. 5, p. 497-503, 2001.

BRACK, C. et al. Antibacterial metabolites and bacteriolytic enzymes produced by *Bacillus pumilus* during bacteriolysis of *Arthrobacter citreus*. **Marine Biotechnology**, v. 17, n. 3, p. 290-304, 2015.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **PROJEÇÕES DO AGRONEGÓCIO – Projeções de longo prazo Brasil 2020-21 a 2030-31**. Brasília, 05 de julho de 2021.

BRITO, L. S. **Produção de enzimas extracelulares por bactérias isoladas do tecido do zoantídeo *Palythoa caribaeorum***. 2020. 1 v. TCC (Graduação) - Curso de Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2020.

CAMPOS, F. F. **Diversidade de Bactérias associadas ao muco do zoantídeo *Palythoa caribaeorum* (CNIDARIA, ANTHOZOA) do litoral sul de Pernambuco**. 2011. 76p. Dissertação (Mestrado em Saúde Humana e Meio

Ambiente) Programa de pós-graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente, Universidade Federal de Pernambuco - UFPE. Vitória do Santo Antão. PE. 2011.

CEREDA, M. P. (Ed.). **Propriedades gerais do amido**. Campinas: Fundação Cargill, 2001. v. 1, 224 p. (Série Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas).

CERQUEIRA-SILVA, C.B.M. et al. The genetic diversity, conservation, and use of passion fruit (*Passiflora* spp.). In: Genetic diversity and erosion in plants. **Springer**, Cham, 2016. p. 215-231.

CHOUDHURY, P.; BHUNIA, B. Industrial application of lipase: a review. **Biopharm. Journal**, 1(2), 41-47, 2015.

CITRUS BR. **Laranja e Suco**. [S. l.], 2019a. Disponível em: <<http://www.citrusbr.com/laranjaesuco/?ins=19>>. Acesso em: 06 ago. 2021.

CLARO, R. M.; MONTEIRO, C. A. Renda familiar, preço de alimentos e aquisição domiciliar de frutas e hortaliças no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 44, n. 6, p.1014-1020, 2010.

CLEMENTE, E.; FLORES, A. C.; ROSA, C. I. L. F.; OLIVEIRA, D. M. Características da farinha de resíduos do processamento de laranja. **RECEN-Revista Ciências Exatas e Naturais**, v. 14, n. 2, p. 257-269, 2012.

COCA, B. C. C. **Otimização da produção e caracterização de  $\alpha$ -amilase produzida por *Bacillus amyloliquefaciens***. Dissertação do Programa de Pós-graduação em Tecnologia Ambiental da Universidade Federal Fluminense, Volta Redonda -RJ, 2019.

CORDEIRO, C. A. M.; MARTINS, M. L. L. Produção de poligalacturonase, pelo termofílico *Bacillus* sp. e algumas de suas propriedades. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 1, p. 135-141, 2009.

CORDOVA, K. R. V. et al. Características físico-químicas da casca do maracujá amarelo (*Passiflora edulis* Flavicarpa Degener) obtida por secagem. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 23, n. 2, 2005.

CORNUAULT, V.; POSÉ, S.; KNOX, J. P. Disentangling pectic homogalacturonan and rhamnogalacturonan-I polysaccharides: Evidence for sub-populations in fruit parenchyma systems. **Food Chemistry**, v. 246, p. 275-285, 2018.

CUNHA, M. **Produtividade e características de frutos de pomares de maracujá implantados com sementes originais e reaproveitadas do híbrido BRS Gigante Amarelo**. Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília - DF. 46 p. Dissertação de Mestrado. 2013.

DEITOS, A.; KIELING, A. G.; MORAES, C. A. M.; BREHM, F. A. Avaliação do resíduo casca de laranja na obtenção de pectina e óleo essencial. In: **IX Simpósio Internacional de Qualidade Ambiental**, 2014.

DHITAL, R.; PANTA, O. P.; KARKI, T. B. Optimization of cultural conditions for the production of pectinase from selected fungal strain. **Journal of Food Science and Technology Nepal**, v. 8, p. 65-70, 2013.

FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V. **Maracujá: o produtor pergunta, a Embrapa responde**. Brasília, DF: Embrapa, p. 341, 2016.

FALEIRO, F.G. et al. Germoplasma e melhoramento genético do maracujá–histórico e perspectivas. **Documentos**, 2011.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Desperdício de alimentos tem consequências no clima, na água, na terra e na biodiversidade.2013. Disponível em: <http://www.fao.org.br/dacatb.asp>. Acesso em: 06 ago. 2021.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. ONU: 17% de todos os alimentos disponíveis para consumo são desperdiçados. 2021. Disponível em: <https://www.fao.org/brasil/noticias/detailevents/en/c/1379033/>. Acesso em: 08 de out. de 2021.

FELICIO. R.; OLIVEIRA. A. L. L.; DEBONSI. H. M. Bioprospecção a partir dos oceanos: conectando a descoberta de novos fármacos aos produtos naturais marinhos. **Ciência e Cultura**. São Paulo. v. 64, n. 3, p. 39-42. 2012.

FERRARI, R. A.; COLUSSI, F.; AYUB, R. A. Caracterização de subprodutos da industrialização do maracujá-aproveitamento das sementes. **Revista Brasileira de fruticultura**, v. 26, p. 101-102, 2004.

GADHAVE, R. V.; MAHANWAR, P. A.; GADEKAR, P. T. Starch-based adhesives for wood/wood composite bonding: review. **Open Journal of Polymer Chemistry**, v. 7, n. 2, p. 19–32, 2017.

GARG, G. et al. Microbial pectinases: an ecofriendly tool of nature for industries. **3 Biotech**, v. 6, n. 1, p. 1-13, 2016.

GOMES, E.; GUEZ, M. A. U.; MARTIN, N.; SILVA, R. D. Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. **Química nova**, p. 136-145, 2007.

GOPINATH, S. C. B. et al. Biotechnological processes in microbial amylase production. **BioMed Res. Inter**. 2017.

GUMMADI, S. N.; PANDA, T. Purification and biochemical properties of microbial pectinases—a review. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 7, p. 987-996, 2003.

GURUNG, N.; RAY, S.; BOSE, S.; RAI, V. A broader view: microbial enzymes and their relevance in industries, medicine and beyond. **Biomed. Res. Int.**, 329-121, 2013.

GVR - Grand View Research. Enzymes Market Size, Share & Trends Analysis Report By Product (Carbohydrases, Proteases, Lipases), By Application (Industrial, Specialty), By End Use, By Region, And Segment Forecasts, 2019 - 2025. Grand View Research, San Francisco, jun. 2019. Disponível em: <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/enzymes-market>

//www.grandviewresearch.com/industry-analysis/enzymes-industry. Acesso em: 05 ago. 2021.

HAMTA, A.; DEHGhani, M. R. Application of polyethylene glycol based aqueous two-phase systems for extraction of heavy metals. **Journal of Molecular Liquids**, v. 231, p. 20-24, 2017.

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

HITHA, P. K.; GIRIJA, D. Isolation and screening of native microbial isolates for pectinase activity. **International Journal of Science and Research**; 3: 632-4, 2014.

HOONDAL, G. et al. Microbial alkaline pectinases and their industrial applications: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 59, n. 4, p. 409-418, 2002.

IBGE. Sistema IBGE de Recuperação Automática. **Produção Agrícola Municipal**. Tabela 1613. Brasília: IBGE, 2018. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/1613>>. Acesso em: 06 ago. 2021.

IMHOFF, J. F.; LABES, A.; WIESE J. Bio-mining the microbial treasures of the ocean: new natural products. **Biotechnol. Adv.**, ;29(5):468-82, 2011.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Produção estimada de laranja. 2019. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/busca.html?searchword=Laranja>>. Acesso em: 06 ago. 2021.

ISTIA'NAH, D.; UTAMI, U.; BARIZI, A. Karakterisasi Enzim Amilase dari Bakteri *Bacillus megaterium* pada Variasi Suhu, pH dan Konsentrasi Substrat. **Jurnal Riset Biologi dan Aplikasinya**, v. 2, n. 1, p. 11-17, 2020.

JACKSON, S. A.; BORCHERT, E.; O'GARA, F.; DOBSON, A. D. W. Metagenomics for the discovery of novel biosurfactants of environmental interest from marine ecosystems. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 33, p. 176-182, 2015.

JANEBRO, D. I. et al. Efeito da farinha da casca do maracujá amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.) nos níveis glicêmicos e lipídicos de pacientes diabéticos tipo 2. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, p.9, 2008.

JULICH, J. et al. Produção de pectinases por *Arthrobacter* sp. A partir de resíduos industriais de *citrus reticulata*. **Seminário de Iniciação Científica**, p. 211, 2016.

KARAKI, N.; ALJAWISH, A.; HUMEAU, C.; MUNIGLIA, L.; JASNIEWSKI, J. Enzymatic modification of polysaccharides: Mechanisms, Properties, And potential applications: A review. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 90, p. 1–18, 2016.

KASHYAP, D. R. et al. Production, purification and characterization of pectinase from a *Bacillus* sp. DT7. **World journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 16, n. 3, p. 277-282, 2000.

KAUR, S. J.; GUPTA, V. K. Production of pectinolytic enzymes pectinase and pectin lyase by *Bacillus subtilis* SAV-21 in solid state fermentation. **Annals of Microbiology**, v. 67, n. 4, p. 333-342, 2017.

KAVUTHODI, B.; SEBASTIAN, D. Review on bacterial production of alkaline pectinase with special emphasis on *Bacillus* species. **Biosci. Biotech. Res. Comm.** 11(1): 18-30, 2018.

KHAIRNAR, Y. et al. Study of pectinase production in submerged fermentation using different strains of *Aspergillus niger*. **International Journal of Microbiology Research**, v. 1, n. 2, p. 13, 2009.

KUBRA, K. T. et al. Potential applications of pectinases in food, agricultural and environmental sectors. **J. Pharm. Chem. Biol. Sci**, v. 6, p. 23-34, 2018.

LACERDA, M.; LORENZI, H. Frutas brasileiras e exóticas cultivadas (De Consumo in Natura). **Nova Odessa: Plantarum**, 2006.

LIMBERG, G. et al. Analysis of different de-esterification mechanisms for pectin by enzymatic fingerprinting using endopectin lyase and endopolygalacturonase II from *A. niger*. **Carbohydrate Research**, v. 327, n. 3, p. 293-307, 2000.

LIU, X.; KOKARE, C. Microbial Enzymes of Use in Industry. IN: Brahmachari, G., Biotechnology of Microbial Enzymes. **Academic Press**, 2016, p. 267-298. doi:10.1016/B978-0-12-803725-6.00011-X.

MAAREL, M. J. E. C. V. D.; VEEN, B. V. D.; UITDEHAAG, J. C. M.; LEEMHUIS, H.; DIJKHUIZEN, L. Properties and applications of starch-converting enzymes of the  $\alpha$ -amylase family. **Journal of Biotechnology**, v. 94, n. 2, p. 137–155, 2002.

MARTOS, M. A.; ZUBRESKI, E. R.; COMBINA, M. G.; OSCAR, A. H.; ROQUE, A. Isolation of a yeast strain able to produce a polygalacturonase with maceration activity of cassava roots. **Food Science and Technology**, 33(2), 332-338. May 24, 2013.

MARZO, C. et al. Valorization of agro-industrial wastes to produce hydrolytic enzymes by fungal solid-state fermentation. **Waste Management and Research**, v. 37, n. 2, p. 149–156, 2019.

MATOS, F. B. **Isolamento e caracterização de fungos isolados de ambiente marinho**. 63 f. 2012. Dissertação (Mestrado) Programa de pós-graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2021.

MATSUURA, F. C. A. U. **Estudo do albedo de maracujá e de seu aproveitamento em barra de cereais**. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, SP, 2005.

MAWATI, S. D.; HARPEN, E.; FIDYANDINI, H. P. Skrining bakteri termofilik potensial amilolitik dari sumber air panas way belerang kalianda lampung selatan. **Journal of Aquatropica Asia**, v. 6, n. 1, p. 1-7, 2021.

MELETTI, L. M. M. Avanços na cultura do maracujá no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, p. 83-91, 2011.

MELO, L. F. A. **Screening farmacológico e diversidade bacteriana do muco de *Palythoa caribaeorum* (Cnidaria, Anthozoa) da praia de Porto de Galinhas-PE, Brasil.** 2017. 96f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco -UFPE. Recife, PE. 2017.

MOJALLALI, L. et al. A novel ~34-kDa  $\alpha$ -amylase from psychrotroph *Exiguobacterium* sp. SH 3: Production, purification, and characterization. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 61, n. 2, p. 118-125, 2014.

MONTEIRO, V. N.; SILVA, R. N. Aplicações industriais da biotecnologia enzimática. **Revista processos químicos**, v. 5, n. 3, p. 9-24, 2009.

MURUGAN, T. et al. Production and characterization of extracellular pectinase from a newly isolated *Bacillus* species from fruit waste soil. **Materials Today: Proceedings**, v. 45, p. 2087-2090, 2021.

NADERI, S.; NAGHAVI, N. S.; SHAHANIPOOR, K. Pectinolytic activity of *Aspergillus niger* on pectic agricultural substrates. **The 1st International and the 4th National Congress on Recycling of Organic Waste in Agriculture, Isfahan, Iran**, Apr 26–27, 2012; p. 1–6.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Princípios de Bioquímica de Lehninger. ed. 6. **Porto Alegre**, 2014.

NURALIYAH, E. **Isolasi dan karakterisasi  $\alpha$ -Amilase dari *Bacillus* sp. K2Br5.** Tese de Doutorado. UIN Sunan Gunung Djati Bandung, 2017.

OLIVEIRA, E. M.; REGIS, S. A.; RESENDE, E. D. **Caracterização dos resíduos da polpa do maracujá-amarelo.** Ciência Rural. Santa Maria, 2011.

OUMER, O. J. Pectinase: substrate, production and their biotechnological applications. **International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology**, v. 2, n. 3, p. 238761, 2017.

OUMER, O. J.; ABATE, D. Characterization of pectinase from *Bacillus subtilis* strain Btk 27 and its potential application in removal of mucilage from coffee beans. **Enzyme research**, v. 2017, 2017.

OUMER, O. J.; ABATE, D. Screening and molecular identification of pectinase producing microbes from coffee pulp. **BioMed research international**, v. 2018.

PANESAR, Parmjit S. et al. Bio-processing of agro-industrial wastes for production of food-grade enzymes: progress and prospects. **Applied Food Biotechnology**, v. 3, n. 4, p. 208-227, 2016.

PANGESTI, N. W. I.; PANGASTUTI, A.; RETNANINGTYAS, E. Pengaruh penambahan molase pada produksi enzim xilanase oleh fungi *Aspergillus niger* dengan substrat jerami padi. **Asian Journal of Tropical Biotechnology**, v. 9, n. 2, p. 41-48, 2012.

PAULINO, G. V. B. **Diversidade de bactérias não cultiváveis associadas ao zoantídeo *Palythoa caribaeorum***. 57 f. 2017. Dissertação (Mestrado) Programa de Pós-graduação em Diversidade Biológica e Conservação nos Trópicos, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Universidade Federal de Alagoas, UFAL. Maceió, AL. 2017.

PECHENIK, J. A. **Biologia dos invertebrados 7 ed.** Porto Alegre: AMGH, 2016.

PEDROLLI, D. B. et al. Pectin and pectinases: production, characterization and industrial application of microbial pectinolytic enzymes. **Open Biotechnology Journal**, p. 9-18, 2009.

PENESYAN, A. et al. Assessing the effectiveness of functional genetic screens for the identification of bioactive metabolites. **Mar. Drugs**, 11:40–49, 2013.

PEREIRA, J. C. **Atividade antimicrobiana de bactérias isoladas do tecido de *Palythoa caribaeorum* dos recifes costeiros da Paraíba**. 2020. 1 v. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2020.

PIMENTA, F. C. F. et al. Anxiolytic effect of *Citrus aurantium* L. on patients with chronic myeloid leukemia. **Phytotherapy Research**, v. 30, n. 4, p. 613-617, 2016.

RACHMANIA, N.; ISWATI, R.; IMAS, T. Karakterisasi  $\alpha$ -Amilase *Bacillus firmus* KH. 9.4 Alkalotoleran dari Limbah Cair Tapioka. **Biota: Jurnal Ilmiah Ilmu-Ilmu Hayati**, v. 9, n. 3, p. 129-135, 2019.

RAO, D. M.; SWAMY, A. V. N.; SIVARAMAKRISHNA, G. Bioprocess technology strategies, production and purification of amylases: An overview. **The Internet Journal of Genomics and Proteomics**, v. 2, n. 2, p. 30-34, 2007.

REGIS, S. A. **Otimização de processo para desenvolvimento de co-produtos derivados dos resíduos do processamento industrial da polpa do maracujá**. 2015. 119 f. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) -Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, 2015.

REZZADORI, K.; BENEDETTI, S. Proposições para valorização de resíduos do processamento do suco de laranja. In: **International Workshop Advances in Cleaner Production**. São Paulo: UNIP, p. 1-11, 2009.

REZZADORI, K.; BENEDETTI, S. Proposições para valorização de resíduos do processamento do suco de laranja. In: **International Workshop Advances in Cleaner Production**. São Paulo: UNIP, 2009. p. 1-11.

SAKAI, T. et al. Pectin, Pectinase, and Protopectinase: Production, Properties, and Applications. **Advances in applied microbiology**, v. 39, p. 213-294, 1993.

SANTOS, Y. Q. **Produção, purificação e caracterização de uma celulase termotável e halotolerante de uma linhagem marinha de *Bacillus* sp.** 2016. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Dissertação de Mestrado. Brasil, 2016.

SHAFIEI, M.; ZIAEE, A. A.; AMOOZEGAR, M. A. Purification and characterization of a halophilic  $\alpha$ -amylase with increased activity in the presence of organic solvents from the moderately halophilic *Nesterenkonia* sp. strain F. **Extremophiles**, v. 16, n. 4, p. 627-635, 2012.

SILVA, L. A. S.; OLIVEIRA, V. C.; MENDES, F. B. Principais aplicações dos resíduos da laranja e sua importância industrial. **Revista Artigos. Com**, v. 22, p. e5139, 20 nov. 2020.

SIMAIR, A. A. et al. Production and partial characterization of  $\alpha$ -amylase enzyme from *Bacillus* sp. BCC 01-50 and potential applications. **BioMed Research International**, v. 2017, 2017.

SINGH, R. P.; KUMARI, P.; REDDY, C. R. K. Antimicrobial compounds from seaweeds-associated bacteria and fungi. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 99: 1571-1586., 2015.

SINGH, R. S.; SINGH, T.; PANDEY, A. Microbial Enzymes—An Overview. IN: Singh, R.S. **Advanced in Enzyme Technology**. Elsevier, P. 1-40, 2019. Doi:10.1016/B978-0-444-64114-4.00001-7.

SOARES, C. L. S. et al. Avaliação da atividade antiinflamatória e analgésica do extrato bruto hidroalcoólico do zoantídeo *Palythoa caribaeorum* (Duchassaing & Michelotti, 1860). **Revista Brasileira de Farmacologia**, v. 16, n. 4, p. 463-468, 2006.

SOUZA, S. S.; SANTOS, F. P.; SALES, T. S.; GORLACH-LIRA, K. Resíduos agroindustriais: uma alternativa para a produção de enzimas extracelulares por bactérias isoladas do ambiente marinho. In: Biotecnologia: tecnologia a serviço da saúde. Giselle Medeiros da Costa. (Org.). 1 ed., João Pessoa: **Instituto Medeiros de Educação Avançada - IMEA**, 2020, p. 180-199. 2020. ISBN: 978-85-53005-27-7.

SUKMAWATI, S. Isolasi Bakteri Selulolitik dari Limbah Kulit Pisang. **Biotropic: The Journal of Tropical Biology**, v. 2, n. 1, p. 46-52, 2018.

SUKMAWATI, S.; ROSALINA, F. Isolasi Bakteri Dari Tanah Sebagai Penghasil Senyawa Antimikrob. **Biospecies**, v. 13, n. 1, p. 46-51, 2020.

SUKMAWATI, S.; YUNITA, M.; ROSALINA, F. Measurement of alpha-Amilase Enzymes in *Bacillus subtilis* Bacteria. **Indonesian Journal of Biology Education**, v. 3, n. 2, p. 7-10, 2021.

TANG, S. et al. Overexpression of an endogenous raw starch digesting mesophilic  $\alpha$ -amylase gene in *Bacillus amyloliquefaciens* Z3 by in vitro

methylation protocol. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, n. 932, p. jsfa.10332, 13 fev. 2020.

TAVEIRA, I. C.; GORLACH-LIRA, K. Triagem de bactérias isoladas de ambiente marinho para produção de biossurfactantes. **Anais do Congresso Brasileiro de Gestão Ambiental e Sustentabilidade** - Vol. 5: Congestas, 2017.

TINDALL, B. J.; SIKORSKI, J.; SMIBERT, R. A.; KRIEG, N. R. Phenotypic characterization and the principles of comparative systematics. In: *Methods for General and Molecular Microbiology*, Third Edition. **American Society of Microbiology**, p. 330-393, 2007.

TRENTIN, A. et al. USO DE PLANEJAMENTO ESTATÍSTICO DE EXPERIMENTOS NA DETERMINAÇÃO DO PH E TEMPERATURA ÓTIMOS DE  $\alpha$ -AMILASE DE *Bacillus licheniformis*. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v. 1, n. 3, p. 1392-1397, 2015.

UENOJO, M.; PASTORE, G. M. Pectinases: aplicações industriais e perspectivas. **Química Nova**, v. 30, p. 388-394, 2007.

UYGUT, M. A; TANYILDIZI, M. S. Optimization of alpha-amylase production by *Bacillus amyloliquefaciens* grown on orange peels. **Iranian Journal of Science and Technology, Transactions A: Science**, v. 42, n. 2, p. 443-449, 2018.

UZUNER, S.; CEKMECELIOGLU, D. Enhanced pectinase production by optimizing fermentation conditions of *Bacillus subtilis* growing on hazelnut shell hydrolyzate. **Journal of molecular catalysis b: Enzymatic**, v. 113, p. 62-67, 2015.

WATER, J. A. J. M. et al. Antimicrobial and stress responses to increased temperature and bacterial pathogen challenge in the holobiont of a reef-building coral. **Molecular Ecology**, 27, 4, 1065-1080, 2018.

WOOD, W. A.; KRIEG, N. R. **Métodos para bacteriologia geral e molecular**. ASM Press, Washington DC, 1989.

YU, P.; XU, C. Production optimization, purification and characterization of a heat-tolerant acidic pectinase from *Bacillus* sp. ZJ1407. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 108, p. 972-980, 2018.

ZIELINSKI, A. A. F. **Impacto da aplicação de enzimas pectinolíticas comerciais no processamento e na qualidade de suco de maçã**. Dissertação - Universidade Estadual de Ponta Grossa, 2013.

ZOHDI, N. K.; AMID, M. Optimization of extraction of novel pectinase enzyme discovered in red pitaya (*Hylocereus Polyrhizus*) Peel. **Molecules**, 18, 14366–14380. 2013.

*Emitido em 23/11/2021*

**RELATÓRIO Nº 01/2021 - CBIOTEC- CCB (18.60.01.01)**  
**(Nº do Documento: 1)**

**(Nº do Protocolo: NÃO PROTOCOLADO)**

*(Assinado digitalmente em 10/12/2021 17:17 )*  
**SILDIVANE VALCACIA SILVA**  
*COORDENADOR DE CURSO*  
*1652922*

Para verificar a autenticidade deste documento entre em <https://sipac.ufpb.br/documentos/> informando seu número: **1**,  
ano: **2021**, documento (espécie): **RELATÓRIO**, data de emissão: **10/12/2021** e o código de verificação:  
**6b52d2dd5b**