



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

JOÃO MOREIRA DE MATOS NETO

**BIOPROSPECÇÃO DE ENZIMAS DE INTERESSE BIOTECNOLÓGICO A PARTIR
DE ACTINOBACTÉRIAS ISOLADAS DO SEMIÁRIDO NORDESTINO**

FORTALEZA

2022

JOÃO MOREIRA DE MATOS NETO

BIOPROSPECÇÃO DE ENZIMAS DE INTERESSE BIOTECNOLÓGICO A PARTIR DE
ACTINOBACTÉRIAS ISOLADAS DO SEMIÁRIDO NORDESTINO

Monografia apresentada ao curso de Graduação
em Biotecnologia da Universidade Federal do
Ceará, como parte dos requisitos para obtenção
do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Profa. Dra. Claudia Miranda
Martins

Coorientador: Ms. Leonardo Lima Bandeira

FORTALEZA

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

M381b Matos Neto, João Moreira de.
Bioprospecção de enzimas de interesse biotecnológico a partir de actinobactérias isoladas do semiárido nordestino / João Moreira de Matos Neto. – 2022.
128 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Biotecnologia, Fortaleza, 2022.

Orientação: Profa. Dra. Claudia Miranda Martins.

Coorientação: Prof. Me. Leonardo Lima Bandeira.

1. Biotecnologia. 2. Biocatalisadores Microbianos. 3. Screening. I. Título.

CDD 661

JOÃO MOREIRA DE MATOS NETO

BIOPROSPECÇÃO DE ENZIMAS DE INTERESSE BIOTECNOLÓGICO A PARTIR DE
ACTINOBACTÉRIAS ISOLADAS DO SEMIÁRIDO NORDESTINO

Monografia apresentada ao curso de Graduação
em Biotecnologia da Universidade Federal do
Ceará, como parte dos requisitos para obtenção
do título de Bacharel em Biotecnologia.

Aprovada em: 09/ Dezembro/ 2022.

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Claudia Miranda Martins (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^ª. Dr^ª. Daniele de Oliveira Bezerra de Souza
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Msc. Leonardo Lima Bandeira (Coorientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Aos meus pais, irmãos, amigos e namorado
A Israel Aguiar (*in memoriam*)

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Ceará, por me propiciar as mais diversas experiências que culminaram na formação do ser que hoje sou.

Aos laboratórios os quais tive a honra de compor durante esses últimos anos: Laboratório de Toxinas Vegetais de Defesa (LabTox), Laboratório de Biotecnologia de Algas e Bioprocessos (BioAP) e, principalmente, ao Laboratório de Microbiologia Ambiental (LAMAB).

Aos meus orientadores nessa caminhada: Prof^ª. Dr^ª. Daniele de Oliveira Bezerra de Souza, Prof^ª. Dr^ª. Marjory Lima Holanda Araújo e Prof^ª. Dr^ª. Claudia Miranda Martins, pelo incentivo, compreensão e apoio mútuo.

Aos meus co-orientadores: Dr. Lucas Pinheiro Dias, Msc. Marina Gabrielle Guimarães de Almeida, Msc. Francisco Ewerton de Sousa Lima, Dr. Fernando Gouveia Cavalcante e Msc. Leonardo Lima Bandeira, pelo ensino, companheirismo e parceria.

Ao meu eterno amigo, Israel Aguiar, que, infelizmente, não pôde continuar sua caminhada ao nosso lado e compartilhar deste momento comigo, mas que tem minha eterna gratidão, amor e saudade.

Aos meus pais, William e Socorro, pelo apoio incondicional, abnegação, amor, esperança e sonhos compartilhados. Por colocarem meus planos pessoais acima dos seus próprios, torcendo por cada momento, comemorando cada pequena vitória e lamentando cada obstáculo enfrentado. Vocês foram e serão tudo para mim até o fim da minha jornada.

Ao meu namorado, Sergio Filho, que compartilhou comigo cada momento de vitória e agonia, sendo meu maior incentivador, principalmente durante os duros períodos encontrados no final dessa caminhada, acreditando no meu potencial mesmo quando eu não conseguia vê-lo.

Aos meus irmãos, Mirella e Rennan, por cada momento de apoio disfarçado por descontrações e risadas.

Aos meus tios, Edson e Vânia, e primos, Arthur e Matheus, por, mesmo distantes, não deixarem de me apoiar e de torcer pelo meu sucesso sempre que possível.

À minha avó, Margarida, por cada docinho, cada bolo, cada momento de carinho e por cada preocupação, e à minha avó, Isa, que, mesmo não sendo tão presente na minha vida quanto eu gostaria, comemora desta vitória junto a mim.

Aos meus avôs, João e Antônio, que não puderam me acompanhar até este momento da minha vida, mas que carregarei na memória para sempre.

Aos meus amigos do *Cluster*, pelos momentos vividos durante todos esses anos, tanto felizes quanto sombrios. Vocês foram e ainda são boa parte da minha base, sei que posso contar com vocês independentemente da situação e espero que saibam que essa é uma via de mão dupla. Vocês são boa parcela do motivo de eu ter conseguido caminhar até aqui.

À minha segunda família durante os muitos anos da minha graduação, T6.

Aos meus amigos de graduação que não foram citados anteriormente: Amanda, Ariane, Ariel, Arlene, Gabice, Eric, Joyce, Laís e Thiago, pelo apoio mútuo e amizade.

Aos meus amigos: Felipe, Isa, Ivan, João Neto, Joyce, Kaio, Karen, Levy, Letícia, Lucas, Marina, Paulo, Samara e Vitória, por terem entrado na minha vida, mesmo que em momentos e situações distintas, auxiliando indiretamente nesse processo.

À família do meu namorado: Socorro, André e Mayra. Vocês me ajudaram muito em momentos difíceis e continuam me auxiliando até hoje.

Ao ex-secretário do Bacharelado em Biotecnologia Gilmar Ferreira pelo auxílio quando eu pensei já ter desistido. Esse ciclo só terá um final apropriado por sua causa.

Aos meus *pets* Andy, Bob, Calvin, Joey e Lua.

Aos profissionais que me acompanharam durante esses últimos anos e que foram absolutamente necessários a essa e outras conquistas: Henrique, Mônica Fontenelle, Raquel Oliveira e Tiffany Shimabukuro.

À moça na Beira Mar, por ter me ensinado o verdadeiro significado de persistência.

A todos os membros do LAMAB, um lar que encontrei dentro da universidade e que me auxiliou a me reencontrar dentro do meio acadêmico, dentro da biotecnologia e dentro da pesquisa.

Aos Professores Suzana Claudia Silveira Martins, Ilka Maria Vasconcelos, Cleverson Diniz Teixeira de Freitas, Oscarina Viana de Sousa, Emilio de Castro Miguel e Maria Raquel Alcântara de Miranda, pela orientação direta ou indireta em pontos diferentes da minha graduação.

À Prof^ª. Dr^ª. Claudia Miranda Martins e Msc. Leonardo Lima Bandeira, pela excelente orientação e amizade desenvolvida durante o processo de execução da minha Monografia.

Aos membros da banca examinadora Prof^ª. Dr^ª Claudia Miranda Martins, Prof^ª. Dr^ª. Daniele de Oliveira Bezerra de Souza e Msc. Leonardo Lima Oliveira pelas valiosas colaborações e sugestões.

“Don't be afraid to make mistakes. it's all part of the learning process.” (Tighnari, 2022).

RESUMO

Actinobactérias são microrganismos Gram-positivos capazes de desempenhar inúmeros papéis ecológicos e biotecnológicos. Seu padrão de reprodução e aparato enzimático robusto as tornam procaríotos de distribuição ubíqua, sendo capazes de prosperar mesmo em ambientes adversos, como é o caso do solo do semiárido nordestino, que possui uma alta concentração de sais, baixa disponibilidade de nutriente e que é afetado por uma irradiação solar acima da média, altas temperaturas e baixos volumes de água devido à precipitação escassa. O predomínio dessas bactérias no solo mesmo sob tais condições dá margem à produção de enzimas com maior estabilidade e maior espectro de ação, características desejáveis à indústria. Portanto, o atual estudo utilizou de uma amostra de 45 cepas de actinobactérias isoladas a partir do solo de diversos pontos dessa região, nas quais foram realizados ensaios para o *screening* de sete tipos de enzimas de interesse industrial. Desta amostra, todas as cepas foram capazes de produzir efetivamente ao menos uma das classes enzimáticas do estudo e quatro demonstraram alta capacidade de produção de pelo menos três tipos enzimáticos. Dentre os testes realizados, destacou-se a necessidade de maior aprofundamento na produção de proteases devido à importância ímpar que essa enzima possui na indústria, portanto, um ensaio quantitativo foi realizado onde constatou-se a produção de enzimas com alta atividade associada, sobretudo na cepa SN18. Ao final do trabalho, todos os dados obtidos em relação ao perfil de produção enzimática das 45 cepas foram unidos para que pudesse haver a identificação daquelas com múltiplos potenciais associados, onde foram observados que quatro destas: SN12, SN19, SN20 e SN32 apresentaram alta produção de pelo menos três tipos enzimáticos. Por fim, o atual trabalho prevê a necessidade da continuidade da pesquisa aqui iniciada para que haja de fato uma aplicação prática do conhecimento aqui gerado.

Palavras-chave: Biotecnologia; Biocatalisadores Microbianos; *Screening*.

ABSTRACT

Actinobacteria are Gram-positive microorganisms capable of accomplish several ecological and biotechnological roles. Their reproduction pattern and enzymatic robustness make them prokaryotes of ubiquitous distribution, being able to thrive even under harsh conditions. As the case of the Brazilian semiarid soil, who possesses a high salt concentration and low nutrient disposal, along with above average solar irradiation, high temperatures and minor levels of water availability due to rain scarcity. The prevalence of those bacteria on soil under those condition give margin to the production of enzymes with greater stability and spectrum of action, industrial desired characteristics. Thus, the given study utilized 45 actinobacterial strains isolated from distinct points of this region soil, where we were able to carry out a screening of seven enzymatic types of industrial interest. From this sample, all of the tested strains were capable to produce at least one of the studied enzymes and four of them denoted a high capacity of producing at least three enzymatic classes. Among the test performed, the necessity of a greater deepening into the protease producing strains was denoted due to the unique importance of this enzymatic class for industry. Hence, a quantitative assay was done, where we could assess the high activity enzymes, specially that from the strain SN18. At the end of the study, the obtained enzymatic productivity data from the 45 strains were put together in order to investigate of those with multiple inherent potential, where four of them: SN12, SN19, SN20 and SN32 manifested a higher production of at least three enzymatic types. Ultimately, this study oversees a necessity of the continuity of the research here initiated for the actual application of the gathered knowledge.

Keywords: Biotechnology; Microbial Biocatalysts; Screening.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - (a) Mecanismo de ação da hidrólise do amido mediado por α -Amilase (BRENDA) (b) Estrutura tridimensional de α -Amilase isolada de *Bacillus subtilis* (código de acesso RCSB PDB: 1BAG) 24
- Figura 2 - (a) Mecanismo de ação da hidrólise da celulose mediada por β -glucosidase (BRENDA) (b) Estrutura tridimensional de β -glucosidase isolada de *Neotermes koshunensis* (código de acesso RCSB PDB: 3VIK).
da informação 26
- Figura 3 (a) Mecanismo de ação da hidrólise de triacilglicerol mediada por triacilglicerol lipase (BRENDA) (b) Estrutura tridimensional de lipase isolada de *Streptomyces rimosus* (código de acesso RCSB PDB: 5MAL) 27
- Figura 4 - (a) Esquema de reação da hidrólise de pectina mediada por endo poligalacturonase (BRENDA) (b) Estrutura tridimensional de endo poligalacturonase isolada de *Stereum purpureum* (código de acesso RCSB 1KCD) 28
- Figura 5 - (a) Esquema de reação da hidrólise de proteólise mediada por peptidases (BRENDA) (b) Estrutura tridimensional de protease psicofílica isolada de *Pseudomonas sp.* (código de acesso RCSB: 1H71) 29
- Figura 6 - (a) Esquema de reação da hidrólise de xilana mediada por endoxilanas (BRENDA) (b) Estrutura tridimensional de endoxilanas isolada de *Streptomyces olivaceoviridis* (código de acesso RCSB 1XYF) 31
- Figura 7 - (a) Esquema de reação da oxirredução de benzenediol a benzosemiquinona mediada por lacase (BRENDA) (b) Estrutura tridimensional de endoxilanas isolada de *Streptomyces coelicor* (código de acesso RCSB: 3CG8) 33
- Figura 8 - Representação esquemática do ciclo de vida de actinobactérias 34

Figura 9 - Localização do Parque Nacional de Sete Cidades	37
Figura 10 - Localização do Parque Nacional de Ubajara, no noroeste do Estado do Ceará	39
Figura 11 - Localização da Estação Ecológica de Aiuaba, a sudoeste do Estado do Ceará	41
Figura 12 - Padrão de coleta de solo, consistindo de área preservada homogênea (PHC) e áreas identificadas como Zona 1 e Zona 2. Além dos pontos de coletas aleatórios a, b e c	43
Figura 13 - Ensaio de contagem e isolamento de actinobactérias.....	45
Figura 14 - Esquema metodológico da coloração de Gram	48
Figura 15 - Esquema metodológico de microcultivo	49
Figura 16 - Esquema de Preparo de Amostras e Análise de Amostras por Microscopia Eletrônica de Varredura	50
Figura 17 - Esquema metodológico generalista para teste enzimático	52
Figura 18 - Testes enzimáticos positivos e negativos para a produção de amilases	53
Figura 19 - Testes enzimáticos positivos e negativos para a produção de celulasas	54
Figura 20 - Testes enzimáticos positivos e negativos para a produção de lipases	55
Figura 21 - Testes enzimáticos positivos e negativos para a produção de pectinases	56
Figura 22 - Testes enzimáticos positivos e negativos para a produção de proteases	57
Figura 23 - Testes enzimáticos positivos e negativos para a produção de xilanases	58
Figura 24 - Testes enzimáticos positivo forte, positivo fraco e negativo para a produção de lacases	59
Figura 25 - Esquema de preparo de amostras para o Ensaio Proteolítico	60
Figura 26 - Esquema metodológico de quantificação proteica e ensaio proteolítico	61
Figura 27 - Exemplos de resultados positivos para a Coloração de Gram	63
Figura 28 - Capturas das imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) para as cepas SN34, SN35 e SN44 sob <i>Working Distance</i> e <i>Horizontal Field Width</i> de 5,92µm (70.000x), 41,4 µm (10.000x) e 82,9 µm (5.000x)	68

LISTA DE GRÁFICOS

Equação 1 - Cálculo do Índice Enzimático.....	51
Gráfico 1 - Diversidade cromogênica das cepas de estudo em relação a seus micélios aéreo (a) e vegetativo (b)	64
Gráfico 2 - Distribuição da coloração de micélios aéreos (MA) e micélios vegetativos (MV) de acordo com o uso de terra do local de coleta dos isolados	65
Gráfico 3 - Proporção de prováveis gêneros de cepas de actinobactérias	66
Gráfico 4 - Distribuição dos prováveis gêneros de actinobactérias de acordo com o uso da terra dos seus locais de coleta	67
Gráfico 5 - Box plot com os resultados dos cálculos de índices enzimáticos (IEs) de cepas produtoras de amilase	69
Gráfico 6 - Box plot com os resultados dos cálculos de índices enzimáticos (IEs) de cepas produtoras de celulase	70
Gráfico 7 - Box plot com os resultados dos cálculos de índices enzimáticos (IEs) de cepas produtoras de lipase	71
Gráfico 8 - Box plot com os resultados dos cálculos de índices enzimáticos (IEs) de cepas produtoras de pectinase	73
Gráfico 9 - Box plot com os resultados dos cálculos de índices enzimáticos (IEs) de cepas produtoras de protease	74
Gráfico 10 - Concentração proteica do sobrenadante do meio de cultivo SMA, centrifugado 10000 rpm por 10min, após 5 dias de crescimento a 37°C	75
Gráfico 11 - Resultado do cálculo da atividade das proteases em UI/mL das 10 cepas utilizadas neste teste.....	76
Gráfico 12 - Box plot com os resultados dos cálculos de índices enzimáticos (IEs) de cepas produtoras de xilanases.....	78
Gráfico 13 - Proporção de cepas não produtoras, produtoras fracas e produtoras fortes de lacases.....	79
Gráfico 14 - Heatmap unido ao dendrograma para todas as atividades enzimática.....	82

LISTA DE TABELAS

Quadro 1 -	Especificações de critérios utilizados para os diferentes usos da terra	44
Quadro 2 -	Nomenclatura de colônias de acordo com área e localização	46
Tabela 1 -	Relação da localização dos pontos amostrais de coleta em Aiuaba (AIU), Ubajara (UBJ) e Sete Cidades (7CI)	44
Tabela 2 -	Formulação do meio de Cultivo Caseína-dextrose ágar (acrescido de nistatina)	46
Tabela 3 -	Formulação do meio de <i>International Streptomyces Program 2</i> (ISP-2)	51
Tabela 4 -	Formulação do Meio Amido	53
Tabela 5 -	Formulação do Meio Carboximetilcelulose	54
Tabela 6 -	Formulação do Meio de Tween 80	55
Tabela 7 -	Formulação Meio Pectina	56
Tabela 8 -	Formulação do Meio <i>Skim Milk Agar</i> (SMA)	57
Tabela 9 -	Formulação do Meio Xilana	58
Tabela 10 -	Formulação do Meio Guaiacol (Luria-Bertani + Guaiacol)	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BOD – *Biochemical Oxygen Demand*

CDA – *Casein Dextrose Agar*

CMC – Carboximetilcelulose

CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

Corg Total – Carbono Orgânico Total

Dh – Diâmetro de Halo de Degradação

Dc – Diâmetro da Colônia

EC – *Enzyme Commission number*

ESECA – Estação Ecológica de Aiuaba

EUA – Estados Unidos da América

FAPs – Fundação de Amparo à Pesquisa

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

ICMBio – Instituto Chico Mendes de Conservação e Biodiversidade

IE – Índice Enzimático

IEM – Índice Enzimático Médio

INMET – Instituto Nacional de Meteorologia

ISP – *International Streptomyces Project*

LAMAB – Laboratório de Microbiologia Ambiental

MA – Micélio Aéreo

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

MO – Matéria Orgânica

MV – Micélio Vegetativo

N Total – Nitrogênio Total

PARNA Ubajara – Parque Nacional de Ubajara

PHC – Área Preservada Homogênea

PNSC – Parque Nacional de Sete Cidades

ROS – Espécies Reativas de Oxigênio

SMA – *Skim Milk Agar*

TCA – Ácido Tricloroacético

UC – Unidade de Conservação

UI – Unidade Internacional

LISTA DE SÍMBOLOS

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - Sulfato de Amônio

μg – Micrograma

μL – Microlitro

CaCl – Cloreto de Cálcio

E^0 – Potencial Redox

FeSO_4 – Sulfato de Ferro

g – Gramas

H_2O – Água

K_2HPO_4 – Fosfato de Potássio Bibásico

KCl – Cloreto de Potássio

L – Litro

m – Metros

M – Molar

MgSO_4 – Sulfato de Magnésio

mL – Mililitro

mm – Milímetros

mM – Milimolar

NaCl – Cloreto de Sódio

NaNO_3 – Nitrato de Sódio

$^\circ\text{C}$ – Graus Celsius

pH – Potencial Hidrogeniônico

rpm – Rotação por minuto

$\text{U\$}$ – Dólares

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1	Biotecnologia	21
2.2	Enzimas	23
2.3	<i>Amilases</i>	23
2.3.1	<i>Celulases</i>	25
2.3.2	<i>Lipases</i>	25
2.3.3	<i>Pectinases</i>	27
2.3.4	<i>Proteases</i>	29
2.3.5	<i>Xilanases</i>	30
2.3.6	<i>Lucases</i>	30
2.3.7	Actinobactérias	33
2.4	Semiárido Nordeste	36
2.4.1	Unidades de Conservação no Semiárido Brasileiro	36
2.4.1.1	<i>Parque Nacional de Sete Cidades – PNSC</i>	36
2.4.1.2	<i>Parque Nacional de Ubajara – PARNA UBAJARA</i>	38
2.4.1.3	<i>Estação Ecológica de Aiuaba – ESECA</i>	40
3	OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS	42
3.1	Geral	42
3.2	Específicos	42
4	MATERIAIS E MÉTODOS	43
4.1	Amostragem e coleta	43
4.2	Isolamento de Actinobactérias	45
4.3	Nomenclatura dos Isolados	46
4.4	Coloração de Gram	47
4.5	Caracterização Cultural	47
4.6	Caracterização Micromorfológica	48
4.7	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) das Cepas	49
4.8	Atividades Enzimáticas	51
4.8.1	<i>Atividade Amilolítica</i>	52
4.8.2	<i>Atividade Celulolítica</i>	53
4.8.3	<i>Atividade Lipolítica</i>	54

4.8.4	<i>Atividade Pectinolítica</i>	55
4.8.5	<i>Atividade Proteolítica</i>	56
4.8.6	<i>Atividade Xilanolítica</i>	57
4.8.7	<i>Atividade de Lacases</i>	58
4.9	Ensaio Proteolítico Quantitativo	59
4.9.1	<i>Cultivo em Meio Líquido</i>	59
4.9.2	<i>Preparo de Amostras</i>	59
4.9.3	<i>Quantificação Proteica</i>	60
4.9.4	<i>Ensaio Proteolítico com Azocaseína</i>	60
4.10	Análises Estatísticas	62
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
5.1	Isolados Actinobacterianos	63
5.2	Coloração de Gram	63
5.3	Caracterização Cultural	63
5.4	Características Micromorfológicas	65
5.5	Microscopia Eletrônica de Varredura	67
5.6	Atividade Enzimática	67
5.6.1	<i>Atividade Amilolítica</i>	67
5.6.2	<i>Atividade Celulolítica</i>	69
5.6.3	<i>Atividade Lipolítica</i>	71
5.6.4	<i>Atividade Pectinolítica</i>	72
5.6.5	<i>Atividade Proteolítica</i>	73
5.6.5.1	<i>Atividade Proteolítica Semiquantitativa</i>	73
5.6.5.2	<i>Atividade Proteolítica Quantitativa</i>	75
5.6.5.2.1	<i>Quantificação Proteica</i>	75
5.6.5.2.2	<i>Ensaio Proteolítico</i>	76
5.6.6	<i>Atividade Xilanolítica</i>	77
5.6.7	<i>Atividade de Lacases</i>	79
5.7	Potencial Biotecnológico das Cepas	80
6	CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS	83
	REFERÊNCIAS	84
	APÊNDICE A – ARTIGO I COMPLETO PUBLICADO EM PERIÓDICO	
	INDEXADO	97

APÊNDICE B – ARTIGO II COMPLETO PUBLICADO EM PERIÓDICO INDEXADO	102
ANEXO A – TABELA DE COLORAÇÃO DE MICÉLIOS DAS CEPAS	122
ANEXO B – DIVERSIDADE DE MICÉLIOS AÉREOS	123
ANEXO C – DIVERSIDADE DE MICÉLIOS VEGETATIVOS	125
ANEXO D – DIVERSIDADE DE COLÔNIAS INDIVIDUAIS	127
ANEXO E – RESULTADOS DAS LEITURAS DO MICRO CULTIVO	129

1 INTRODUÇÃO

Estudos diversos apontam para múltiplas soluções para demandas industriais em termo de processos. Microrganismos com atividades multifuncionais estão entre as soluções propostas para a redução dos impactos ambientais em múltiplos setores da indústria. Através da utilização de fontes alternativas a processos industriais de base química, substituição de fertilizantes químicos e pesticidas por compostos de origem microbiana de ação análoga, assim como outras propostas (LIU *et al.*, 2018; KHOSHRU *et al.*, 2020).

A utilização de enzimas, biocatalisadores capazes de viabilizar reações que não aconteceriam normalmente necessários a qualquer processo biológico, vem ganhando destaque em diversos segmentos industriais como alternativa a métodos convencionais (PINHEIRO *et al.*, 2021). O mercado global de enzimas foi avaliado em aproximada U\$11.5 bilhões em 2021 e espera crescer ainda mais nos próximos anos. O interesse crescente nestas proteínas de caráter lítico em detrimento de catalisadores químicos é justificado pela alta especificidade, baixo consumo de energia, atuação sobre condições mais amenas de temperatura e pH, e menor impacto ambiental (GIRELLI *et al.*, 2020).

Actinobactérias são microrganismos aptos a atender essa crescente demanda pelo mercado de enzimas, uma vez que são microrganismos capazes de produzir ativamente uma ampla proporção de moléculas bioativas de natureza diversa (PHAM *et al.*, 2019). Vários microrganismos pertencentes ao filo *Actinobacteria* já foram previamente relatados enquanto produtores de enzimas de interesse biotecnológico, como proteases, amilases, celulasas e lacases (GOHAIN *et al.*, 2020). Enzimas obtidas a partir de actinobactérias possuem alta disponibilidade, estabilidade, produtividade e baixos custos associados a produção e processos *downstream*, fazendo delas um grande investimento para este setor (FERREIRA *et al.*, 2020).

Actinobactérias isoladas de ambientes extremos, como é o caso do semiárido brasileiro, vêm mostrando potencial crescente devido ao seu pareamento com diversas condições desejadas do ponto de vista industrial (SILVEIRA *et al.*, 2021).

É neste intuito, que o presente trabalho enfoca em actinobactérias isoladas do semiárido como fonte de diversas classes enzimáticas para aplicações biotecnológicas diversas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Biotecnologia

Definida como a ciência da manipulação de organismos, sistemas orgânicos e processos no intuito de gerar um benefício social, ambiental ou industrial, a Biotecnologia vem se estabelecendo e crescendo cada vez mais nos últimos anos. Sendo uma área que foi consolidada em primeira instância nos EUA e que recentemente vem se firmando em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, como é o caso no Brasil (BARCELOS *et al.*, 2018).

Por se tratar de um campo de conhecimento altamente plural e interdisciplinar, muitos problemas estão associados à definição de Biotecnologia desde que foi citado pela primeira vez por Karl Erkey em 1919. Com seu conceito sofrendo várias mudanças no decorrer das décadas (VERMA *et al.*, 2011).

No intuito de facilitar o entendimento da pluralidade desta área, Kafarski (2012) desenvolveu um esquema de cores associado às áreas de atuação e aplicação da biotecnologia. Sendo as cores e suas respectivas contextualizações as seguintes:

- Amarela: Biotecnologia Nutricional - Uma das mais antigas ramificações da biotecnologia que possui como principal enfoque a produção de alimentos. Avanços recentes importantes nesta área estão sendo realizados no intuito de melhorar características alimentares, com a modificação de fatores nutricionais específicos, aumentando a disponibilidade de vitaminas ou diminuindo a presença de alérgenos, por exemplo.
- Azul: Biotecnologia Marinha - Fundamenta-se no estudo e aplicação de recursos naturais de fontes marítimas. O ambiente marítimo é uma fonte notável de compostos bioativos de interesse biotecnológico, onde se destacam as algas, microalgas e demais microrganismos nele presente. Esta área possui intersecção com diversas outras áreas da biotecnologia, uma vez que a biotecnologia marinha pode gerar insumos aplicáveis a vários outros ramos da biotecnologia.
- Branca: Biotecnologia Industrial – Baseia-se na aplicação de biocatalisadores a processos industriais. Focando na reposição de processos industriais tradicionais, produção de biopolímeros de ação específica, produção de biocombustíveis alternativos a combustíveis de origem fóssil e produção de enzimas ou microrganismos relevantes à indústria. A Biotecnologia Branca é considerada o maior dos domínios biotecnológicos e possui especial relevância dentro da área, concorrendo diretamente com tecnologias clássicas.

- Cinza: Biotecnologia Ambiental – Voltada à resolução de problemas de interesse ambiental, como o tratamento de efluentes da indústria, fitorremediação ou biorremediação baseada em microrganismos de áreas poluídas, reaproveitamento de resíduos e recuperação de solos degradados.
- Dourada: Bioinformática, Nanotecnologia e Biologia de Sistemas.
- Marrom: Biotecnologia de Desertos e Zonas Áridas - Este segmento da biotecnologia está atrelado à gestão de recursos naturais em regiões secas, onde o manejo de recursos é um ponto crítico às populações residentes destas regiões. A biotecnologia, no caso, se torna uma ferramenta de auxílio no enfrentamento das adversidades encontradas em zonas áridas, podendo ser utilizada no desenvolvimento de cultivares resistentes à salinidade elevada dos solos, com baixas demandas de água e resistentes a fitopatógenos.
- Preta: Bioterrorismo e Armas Biológicas – Nem todas as faces da biotecnologia possuem impacto positivo direto, como é o caso da biotecnologia preta, que utiliza de ferramentas biotecnológicas para a produção de armas biológicas.
- Verde: Biotecnologia Aplicada à Agricultura – Considerada a nova fase da revolução verde, utiliza de técnicas biotecnológicas para o desenvolvimento de cultivares mais férteis e mais resistentes a estresses bióticos e abióticos. Esta área também engloba aplicações modernas da biotecnologia, como técnicas de micropropagação e engenharia genética para o desenvolvimento de plantas com características específicas selecionadas artificialmente.
- Vermelha: Biotecnologia Aplicada à Saúde – É a área da biotecnologia envolvida com a preservação da saúde humana, englobando a produção de novas drogas, vacinas e antibióticos, assim como o desenvolvimento de novas terapias regenerativas, órgãos sintéticos e novos métodos de diagnóstico.
- Violeta: Biotecnologia Associada à Legislação e Bioética – Como a biotecnologia vem se tornando uma preocupação constante na vida das pessoas, tanto do ponto de vista ético-legislativo quanto do ponto de vista de leigos, a biotecnologia violeta surgiu como uma resposta a estes problemas, voltada principalmente para a discussão e resolução de tais problemas.

Contudo, o autor insiste em ressaltar que o sistema de cores se encontra incompleto, uma vez que a biotecnologia é uma área em constante evolução e que novas áreas de conhecimento podem ser desenvolvidas e adaptadas à esquematização.

2.2 Enzimas

Enzimas são biomoléculas líticas de natureza majoritariamente proteica, responsáveis por funções metabólicas chave em qualquer sistema biológico existente. O desempenho de seus encargos metabólicos se dá devido à capacidade que estas macromoléculas possuem em reconhecer substrato específicos e diminuir a energia de ativação das reações de conversão de substratos em produtos e vice-versa. A reação de catálise enzimática é realizada por meio da ação conjunta de duas porções peptídicas das enzimas: o sítio de ligação e o sítio de catálise. O sítio de ligação é responsável pela especificidade de ligação de enzimas aos seus substratos específicos e análogos, já o sítio de catálise é a porção peptídica caracterizada pela presença de grupamentos ou íons específicos que irão ser responsáveis por desempenhar as reações de conversão de fato (VITOLLO, 2020).

A Comissão Internacional de Enzimas ou *International Enzyme Commission* (IEC), categorizou um total de seis classes principais de enzimas de acordo com o tipo de reação catalisada: Oxirredutases [EC-1], Transferases [EC-2], Hidrolases [EC-3], Liases [EC-4], Isomerases [EC-5] e Ligases [EC-6] (MOJOSOV, 2012). Dentre estas seis classes, o grupo das hidrolases possui certo destaque, uma vez que reúne enzimas capazes de utilizar moléculas de água para efetivar reações de quebras de ligações covalentes, demonstrando importância ímpar em um contexto fisiológico, uma vez que são responsáveis pela conversão de nutrientes a subunidades monoméricas ou oligoméricas mais facilmente utilizáveis pelo organismo e, por conta da necessidade de ampla ação, acabam possuindo uma menor especificidade a substratos (HOYO; HERNÁIZ; ALCÂNTARA, 2017).

Por serem capazes de desempenhar incontáveis processos biológicos, as enzimas são consideradas biomoléculas de inigualável importância biotecnológica, sendo passíveis de aplicações em quase todas as áreas, como agricultura, indústria, meio ambiente e saúde. O interesse biotecnológico envolvendo essas enzimas acaba se voltando mais fortemente para fontes microbianas, uma vez que enzimas microbianas possuem menor tempo e custo para produção, maiores rendimentos e maior estabilidade sob condições extremas. Além disso, muitos microrganismos acabam secretando diversas enzimas diretamente no meio de cultura o que facilita o processo de *Downstream* (GOPINATH *et al.*, 2017).

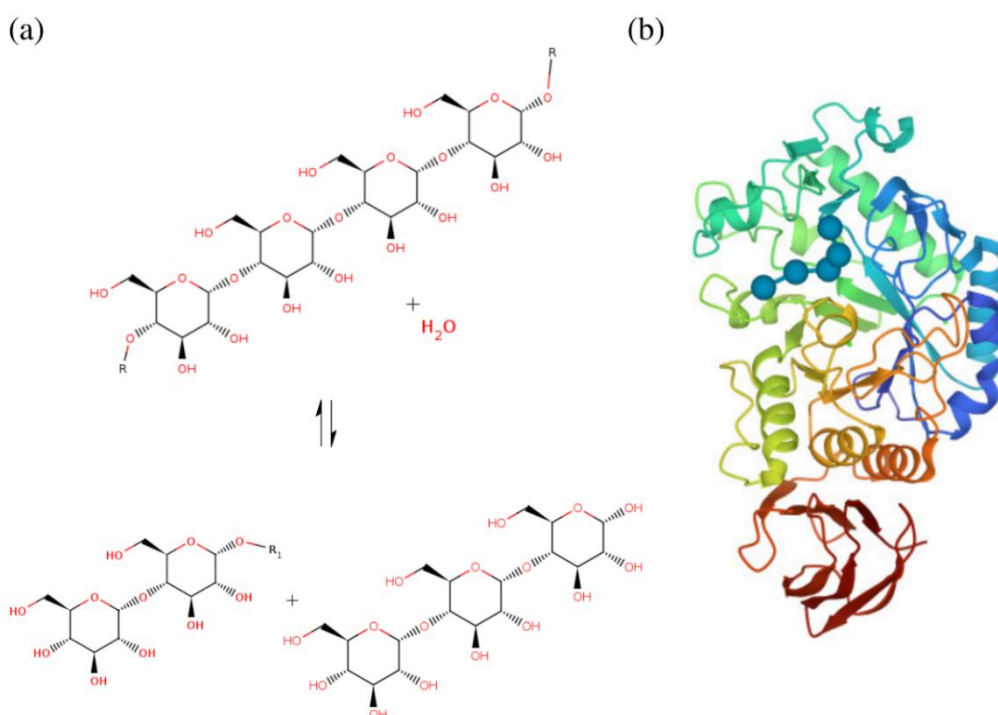
2.2.1 Amilases

O amido é um biopolímero de glicose resultante da mistura de dois outros polissacarídeos: a amilose (ligações α -1,4) e amilopectina (ligações α -1,4 e α -1,6). Essa molécula é uma das principais fontes de energias de seres vivos e é capaz de ser produzida e

metabolizada por diversos organismos, neste último caso, através da produção de enzimas hidrolíticas denominadas amilases, que são subdivididas em três grupos: γ -Amilases, β -Amilases e α -Amilases [EC-3.2.1.1], sendo este último grupo conhecido por possuir uma maior velocidade de reação se comparado com os outros dois.

Conhecidas também como glicosil-hidrolases, uma vez que as ligações glicosídicas são seus focos de hidrólise, estas enzimas podem ser subdivididas em outros dois subgrupos de acordo com o local de atuação enzimática nas moléculas de amido. As endoamilases hidrolisam a molécula de amido de maneira randômica, formando oligossacarídeos de características diversas, enquanto as exoglucanases atuam apenas sobre as extremidades das cadeias do polissacarídeo, formando D-Glicose (Monossacarídeo) e Maltose (Dissacarídeo). (GOPINATH *et al.*, 2017). O mecanismo de hidrólise do amido mediado por α -Amilases e um exemplo de estrutura pode ser encontrado na Figura 1.

Figura 1 – (a) Mecanismo de ação da hidrólise do amido mediado por α -Amilase (BRENDA) (b) Estrutura tridimensional de α -Amilase isolada de *Bacillus subtilis* (código de acesso RCSB PDB: 1BAG).



Fonte: Autor, 2022.

Essas hidrolases possuem aplicações diversas, sendo passíveis de aplicação na indústria de alimento, na indústria de conversão de amido, na indústria de detergentes e na indústria de

papel e celulose (FAROOQ *et al.*, 2021). Além disso o subproduto de hidrólise do amido possui diversas aplicações, sobretudo na indústria alimentícia, onde são utilizados como adoçantes, espessantes, géis e controladores de textura (WHISTLER; DANIEL, 2000)

2.2.2 *Celulases*

Considerado o biopolímero mais abundante na terra, a celulose é um polissacarídeo de D-glicose (ligações β -1,4), caracterizado pela formação de um arranjo em microfibrilas cristalinas que se conjugam formando a fibra de celulose. Por conta destas características (disposição das microfibrilas e tipo de ligação glicosídica), a celulose não é uma macromolécula facilmente metabolizada por boa parcela dos organismos vivos, requerendo um total de três tipos enzimáticos para sua degradação total: β -glucosidases [EC-3.2.1.21], exoglucanases [EC-3.2.1.91] e endoglucanases [EC-3.2.1.4] (BEHERA; RAY, 2016). Sendo os principais organismos responsáveis pela sua catálise de origem microbiana, como fungos (VIETO *et al.*, 2022), leveduras (SOHAIL *et al.*, 2022) e bactérias (MSANGOSOKO *et al.*, 2021), principalmente actinobactérias (ZAKALYUKINA; ZAYTSEV; BIRYUKOV, 2021; SHARMA; KUMAWAT; KAUR, 2022). A elucidação do mecanismo de ação e um exemplo estrutural de β -glucosidase pode ser encontrado na Figura 2.

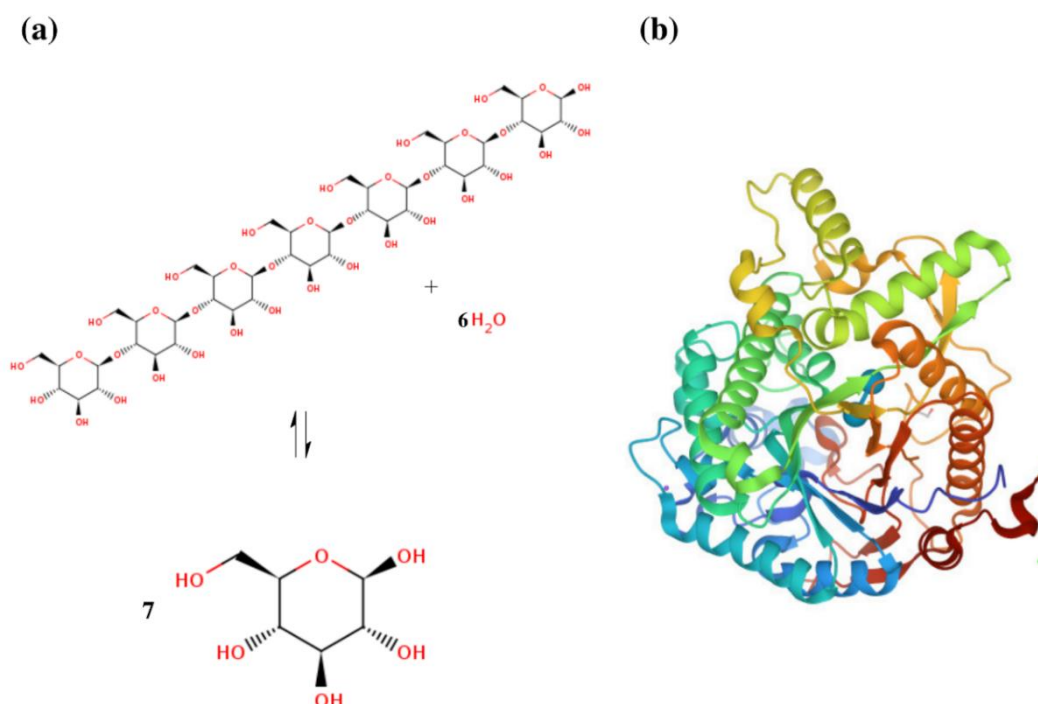
Enzimas celulolíticas e microrganismos produtores dessas enzimas, de um modo geral, possuem aplicações biotecnológicas diversas, como na agricultura (SILVA *et al.*, 2019), no tratamento de resíduos (SHARMA; KUMAWAT; KAUR, 2022), e em indústrias, como na de detergentes, papel e celulose, têxtil e na fermentação de biomassa em biocombustíveis (KUMARI *et al.*, 2019; RAJKUMAR *et al.*, 2021).

2.2.3 *Lipases*

Lipídios são biomoléculas de natureza diversificada que desempenham papéis fundamentais à homeostase metabólica. Estas moléculas podem atuar como fonte de energia celular, sinalizadores moleculares, componentes de membranas dentre muitas outras funções. Em suma, lipídios são biomoléculas de natureza apolar, insolúveis em água e solúveis em solventes orgânicos. Esta classe de moléculas inclui: triacilgliceróis, definidos como ésteres formados pela união de uma molécula de glicerol com outras três de ácidos graxos, que por sua vez são classificados como hidrocarbonetos de cadeia longa que podem ou não possuir insaturações em suas cadeias, com tais insaturações podendo ser classificadas como *cis* ou *trans* a depender de suas conformações, ceras éster, que são moléculas simples de ácidos graxos esterificados a uma molécula de álcool graxo, fosfolipídios, definidos como dois ácidos graxos

esterificados a um L-Glicerol-3-fosfato, fosfoesfingolipídios, moléculas similares a fosfolipídios, mas que possuem um amino álcool (esfingosina) esterificado a um ácido graxo de cadeia longa, e esteróis (SARGENT; TOCHER; BELL, 2003; AHMED; SHAH; AHMED, 2020).

Figura 2 - (a) Mecanismo de ação da hidrólise da celulose mediada por β -glucosidase (BRENDA) (b) Estrutura tridimensional de β -glucosidase isolada de *Neotermes koshunensis* (código de acesso RCSB PDB: 3VIK).



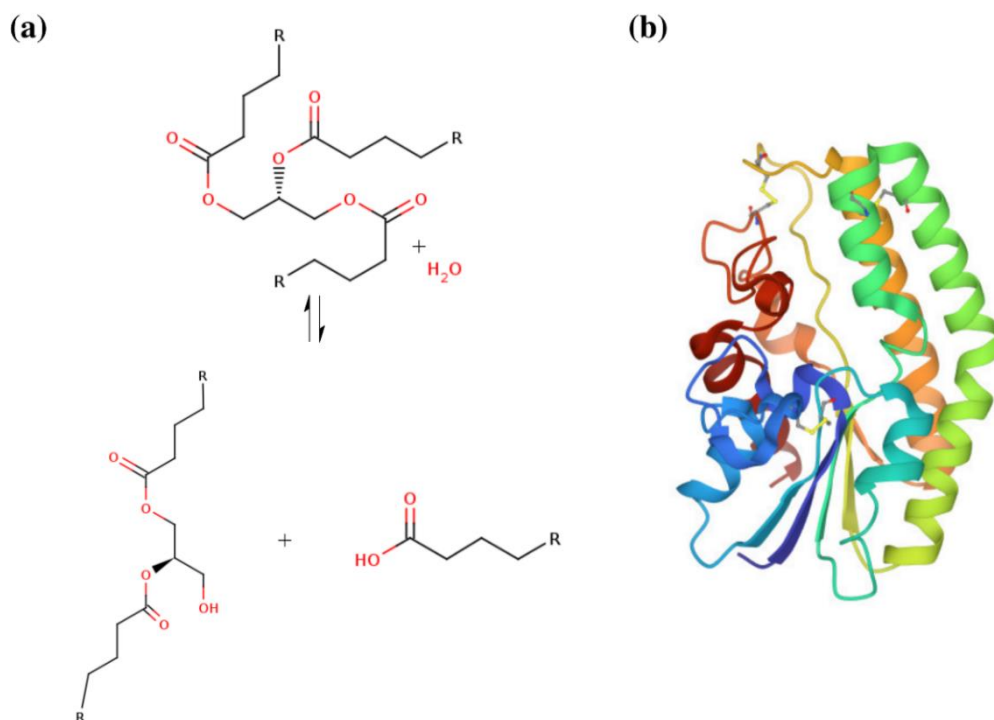
Fonte: Autor, 2022.

Lipases ou Triacilglicerol lipases [EC-3.1.1.3]., por sua vez, são enzimas capazes de degradar esta diversa classe de biomoléculas. O mecanismo de ação associado à reação de hidrólise de triacilgliceróis mediado por lipases e um exemplo estrutural de lipase estão ilustrados na Figura 3.

Essas enzimas hidrolisam regiões esterificadas, trans-esterificadas e inter-esterificadas, sendo extremamente versáteis e aplicáveis do ponto de vista biotecnológico, podendo ser utilizadas na produção de biocombustíveis (CONSTATINI; CALIFANO, 2021; RACHMADONA *et al.*, 2022), como biosensores (HASANAHA *et al.*, 2019), na indústria de couro (MOUJEHED *et al.*, 2022; LI *et al.*, 2020), no tratamento de efluentes industriais

(RACHMADONA *et al.*, 2022), na indústria têxtil (EL MENOIFY *et al.*, 2022), na indústria de óleos, de aromas e sabores, farmacêuticas (VANLEEUEW *et al.*, 2019), além de muitas outras.

Figura 3 - (a) Mecanismo de ação da hidrólise de triacilglicerol mediada por triacilglicerol lipase (BRENDA) (b) Estrutura tridimensional de lipase isolada de *Streptomyces rimosus* (código de acesso RCSB PDB: 5MAL).



Fonte: Autor, 2022.

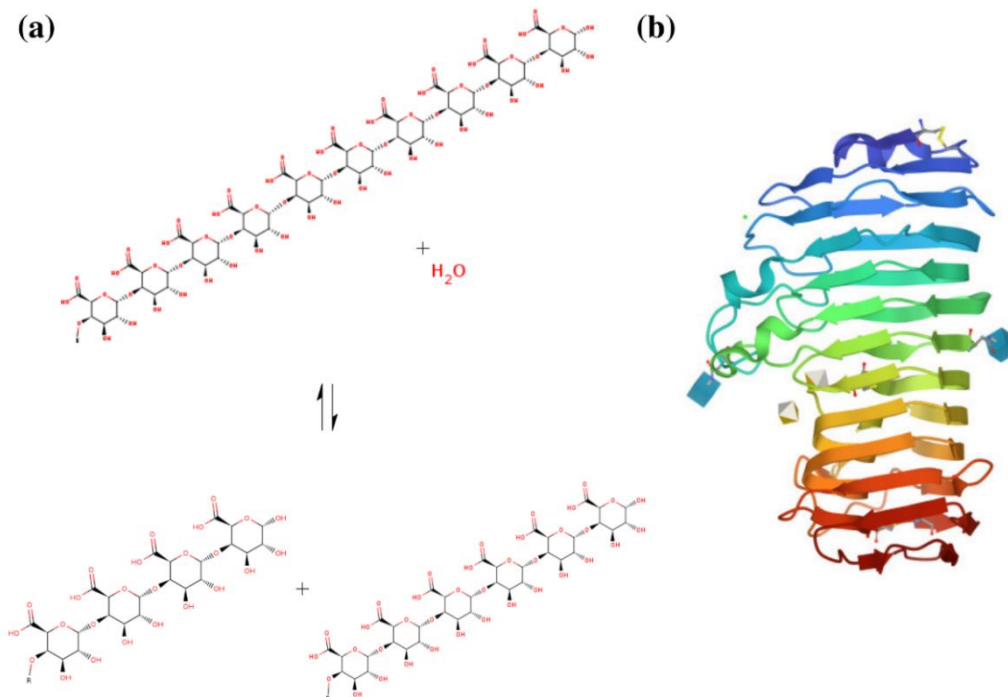
2.2.4 Pectinases

As pectinas ou substâncias pécnicas são uma das biomacromoléculas mais complexas que podem ser encontradas na natureza, podendo ser identificadas na lamela média da parede celular de plantas. São carboidratos polissacarídicos formados principalmente de unidades de ácido α -D-1,4-galacturônico com grupos carboxílicos formando metil ésteres. Estes polissacarídeos são classificados principalmente pelo seu grau de formação de grupamentos metóxi por esterificação, podendo ser classificados como pectinas muito metoxiladas (>50% esterificação) e pectinas pouco metoxiladas (LOCHHEAD *et al.*, 2017). Outra forma de classificação possível para estes polissacarídeos se dá de acordo com suas formas poliméricas, podendo ser classificadas como homogalacturonana, ramnogalacturonana-1, ramnogalacturonana-2 e xilogalacturonana-1, sendo a homogalacturonana corresponde a aproximadamente 60% das pectinas encontrada em plantas, a ramnogalacturonana-1

corresponde a uma porcentagem aproximada de 20 a 35% das pectinas em plantas e as ramnogalacturonana-2 e xilogalacturonana-1 correspondendo a aproximadamente 10% das pectinas em plantas cada (LI *et al.*, 2021).

Sendo assim, pectinases são as enzimas capazes de degradar estas complexas biomoléculas descritas. Sendo classificadas de acordo com o local específico de clivagem das substâncias pécticas, divididos em endo-poligalacturonases [EC-3.2.1.15], exopoligalacturonases [EC-3.2.1.67], exopoligalacturonosidases [EC-3.2.1.82]; ramnogalacturonases [EC-3.2.1.-], endo-xilogalacturonana hidrolases [EC-3.2.1], endo-pectato liases [EC-4.2.2.2], exo-pectato liases [EC-4.2.2.9] e as pectina liases [EC-4.2.2.10]. O esquema de reações catalisadas por endo-poligalacturonases e seu respectivo exemplo estrutural podem ser encontrados na figura 4.

Figura 4 - (a) Esquema de reação da hidrólise de pectina mediada por endo-poligalacturonase (BRENDA) (b) Estrutura tridimensional de endo-poligalacturonase isolada de *Stereum purpureum* (código de acesso RCSB: 1KCD).



Fonte: Autor, 2022.

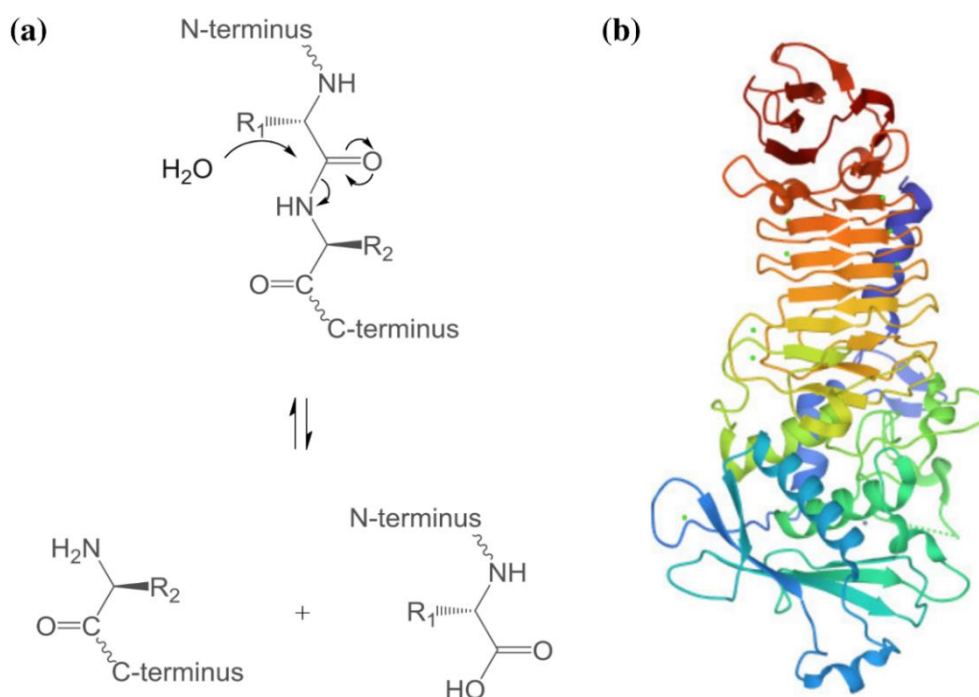
Essas enzimas são amplamente estudadas e produzidas, uma vez que são altamente demandadas pela mais ampla variedade de indústrias, sendo aplicáveis no processamento têxtil, combinando-as a celulases e proteases para um produto mais claro e absorvente, no

processamento de frutas e vegetais, na redução do tempo de fermentação, na clarificando sucos, na redução viscosidade de polpas, no processamento de vinhos e na extração de óleos (ANAND *et al.*, 2020) Além disso, essas enzimas e os microrganismos produtores destas são passíveis de aplicação no tratamento de águas residuárias destas indústrias (SHET; DESAI; ACHAPPA, 2018).

2.2.5 *Proteases*

As proteases ou peptidases [EC-3.4] são uma subclasse enzimática do grupo das hidrolases que realizam a clivagem de ligações C-N envolvendo dois aminoácidos (ligações peptídicas) em proteínas e peptídeos. Essa classe de enzimas, embora bastante singular no que diz respeito a funcionalidade, apresenta certa pluralidade estrutural quando se analisa seus mecanismos de catálise (nucleófilos). Que podem ser divididos em seis classes: peptidases serínicas [EC-3.4.21], glutamil peptidases [3.4.21.19], peptidases cisteínicas [EC-3.4.22], aspartato peptidases [EC-3.4.23], metallopeptidases [EC-3.4.24] e treonina peptidases (RAWLINGS; BATEMAN, 2019). O mecanismo de reação de peptidases e um exemplo estrutural pode ser encontrado na Figura 5.

Figura 5 - (a) Esquema de reação da hidrólise de proteólise mediada por peptidases (BRENDA) (b) Estrutura tridimensional de protease de *Pseudomonas sp.* (código de acesso RCSB: 1H71).



Essas enzimas possuem uma ampla variedade de aplicações biotecnológicas: representando um dos três maiores grupos de enzimas industriais, somando aproximadamente 60% do rendimento mundial na comercialização de enzimas (MAMO; ASSEFA, 2018), setor que prevê alcançar valor comercial de aproximadamente U\$20.31 bilhões até o final de 2030 (Industrial Enzymes Market, 2022), sendo passíveis de aplicação na indústria de bebidas (CHOI *et al.*, 2019; LIM *et al.*, 2022), na indústria de detergentes como bioaditivos (SALWAN; SHARMA, 2019), na indústria de queijos como coagulantes do leite (ALAVI; MOMEN, 2020), na indústria de carne como amaciantes (GAGAOUA *et al.*, 2021), na indústria de cosméticos (VIDMAR; VODOVNIK, 2018), no tratamento de efluentes (RAMAKODI *et al.*, 2020), como moléculas biorremediadoras (KUMAR; JAIN, 2020), como suplemento alimentar animal (WANG *et al.*, 2020), bem como inúmeras outras utilizações.

2.2.6 Xilanases

A xilana é a hemicelulose mais abundante presente nas paredes celulares de plantas e algas, podendo chegar a compor cerca de 30% da massa seca de plantas terrestres. Esse polissacarídeo consiste de um esqueleto de subunidades de D-xylose unidos por meio de ligações glicosídicas do tipo β -1,4, que pode ser variável no que diz respeito a sua estruturação, sendo capaz de se apresentar como um esqueleto puramente linear de polixilose, ou como um heteropolissacarídeo de estruturação diversa (BAJPAI, 2014). Portanto, xilanases ou xilanohidrolases [EC-3.2.1.8] são as principais enzimas responsáveis pelo processo de degradação das xilanas ou seja, são agentes hidrolíticos das ligações glicosídicas β -1,4 (HECK *et al.*, 2005). O mecanismo de reação de endoxilanases e um exemplo estrutural pode ser encontrado na Figura 6.

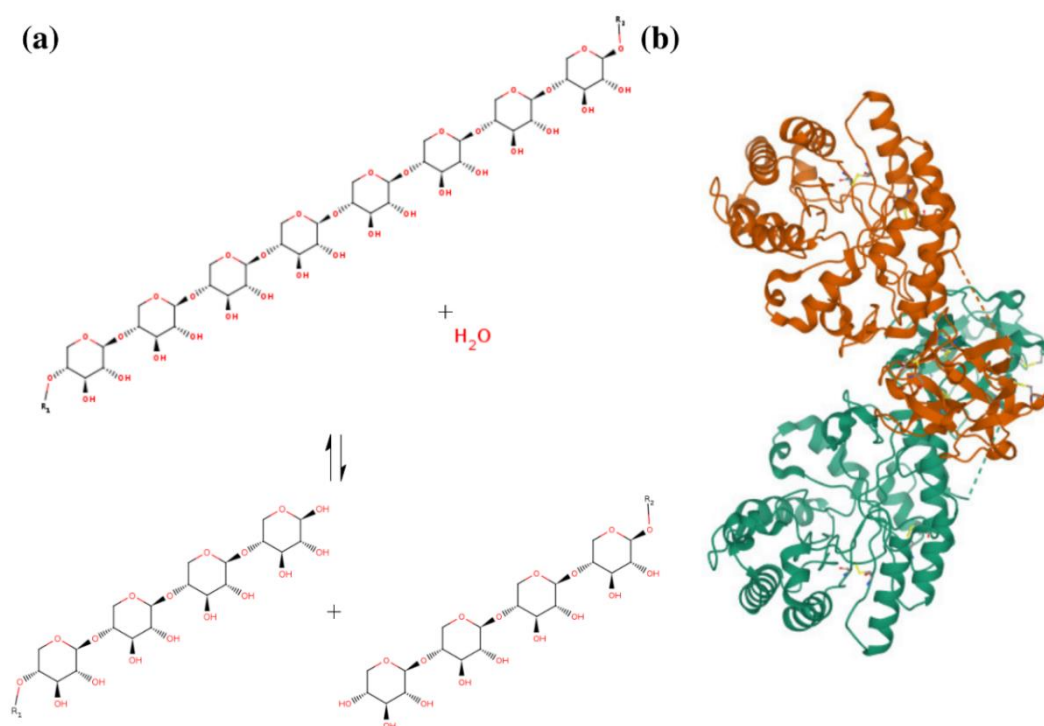
O potencial biotecnológico associado a essas enzimas é muito amplo, uma vez que a xilana é um material de biodisponibilidade alta, podendo ser utilizadas para a produção de biocombustíveis (SHARMA *et al.*, 2020; BIBRA; KUNREDDY; SANI, 2018), na indústria de papel como um agente branqueador de origem biológica (MHIRI *et al.*, 2020), na indústria de alimentos como clarificador de sucos (ADIGUZEL *et al.*, 2019), como suplemento alimentar de aves (SINGH *et al.*, 2021), na indústria de pães e trigo (BOTH *et al.*, 2021) e muitas outras.

2.2.7 Lacases

As lacases [EC-1.10.3.2], diferentemente de todas as outras classes enzimáticas anteriormente citadas, não fazem parte do grupo das hidrolases, mas sim das oxirredutases,

enzimas que catalisam reação de oxirredução em seus substratos. No geral, o grupo das lacases engloba proteínas líticas portadoras de íons de cobre em sua estrutura, sendo membros de uma família enzimática denominadas oxidases de multicobre ou *Multicopper oxidases* (MCOs), capazes de oxidar uma ampla faixa de substratos usando de moléculas de gás oxigênio (O_2) comoceptor final de elétrons, reduzindo-o a H_2O sem que haja a liberação de subprodutos parcialmente reduzidos chamados de espécies reativas de oxigênio (ROS). Estas enzimas são aptas a efetivar reações de natureza tanto catabólica quanto anabólica, sendo capazes de atuar na degradação de húmus e lignina, na síntese de pigmentos poliméricos, no processo de lignificação, na síntese de poliflavonóides e na umidificação de matéria orgânica do solo (JANUSZ *et al.*, 2020).

Figura 6 - (a) Esquema de reação da hidrólise de xilana mediada por endoxilanase (BRENDA) (b) Estrutura tridimensional de endoxilanase isolada de *Streptomyces olivaceoviridis* (código de acesso RCSB: 1XYF).



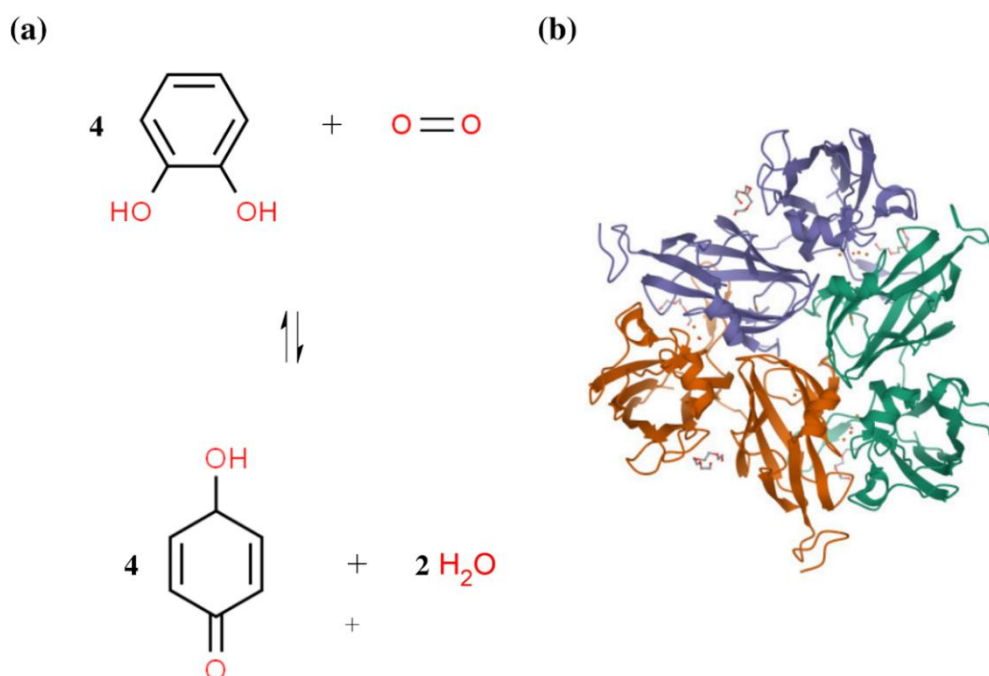
Fonte: Autor, 2022

Embora as enzimas que compõem esse grupo enzimático possuam certa similaridade estrutural entre si, elas quanto ao seu potencial redox. Lacases de alto potencial redox possuem um maior espectro de ação e são, portanto, mais atrativas de um ponto de vista biotecnológico (SUN *et al.*, 2021). É possível observar que boa parte de lacases de baixo potencial redox

podem ser encontradas em plantas, animais e bactérias, enquanto enzimas dessa mesma família com alto potencial redox são encontradas majoritariamente em fungos (MUNK *et al.*, 2015), mas também podem ser encontradas em outros organismos, como actinobactérias (TRUBTSINA *et al.*, 2021).

A alta capacidade de biorremediação que estas enzimas possuem, sobretudo na degradação de azocorantes da indústria têxtil, faz com que a esta seja um dos principais enfoques de estudos envolvendo aplicações biotecnológicas de lacases (GOUD *et al.*, 2020; TRUBTSINA *et al.*, 2021; ADESANYA; ADESANYA, 2022). Contudo, isso não exclui outras aplicabilidades: como na humidificação e compostagem (LI *et al.*, 2022), como na produção de drogas anticâncer, drogas hormonais antioxidantes, biosensores e estabilizantes de produtos alimentícios (SENTHIVELAN; KANAGARAJ; PANDA, 2016; KAUR; SALWAN; SHARMA, 2022). Exemplos de esquema de reação catalisado por uma lacase e de um modelo tridimensional desta enzima podem ser encontrados na Figura 7.

Figura 7 – (a) Esquema de reação da oxirredução de benzenediol a benzosemiquinona mediada por lacase (BRENDA) (b) Estrutura tridimensional de endoxilanase isolada de *Streptomyces coelicor* (código de acesso RCSB: 3CG8).



Fonte: Autor, 2022.

2.3 Actinobactérias

Actinobactérias ou actinomicetos, como eram previamente conhecidos, são microrganismos procarióticos filamentosos Gram-positivos que possuem alta proporção ($\geq 55\%$) de guanina (G) e citosina (C) em seu material genético (SEGARAN *et al.*, 2017). Esses microrganismos compõem o maior e mais taxonomicamente diverso filo do reino *Eubacteria*: o filo *Actinobacteria*, que é composto por um total 23 ordens e, até dezembro de 2015, 342 gêneros (EL OTHMANY *et al.*, 2021). Sendo capazes de habitar diversos ambientes, são conhecidos por possuir distribuição ecológica diversa, sendo majoritariamente encontrados em solos, mas podendo ser encontrados também em ambientes aquáticos ou até mesmo como endófitos de plantas e animais, sendo capaz de deter relações simbióticas ou parasíticas com seus hospedeiros (WANG *et al.*, 2018; THILAGAM; HEMALATHA, 2019; AMARESAN *et al.*, 2020; GONZÁLEZ *et al.*, 2020; JAYANTHI; MARTIN PAUL; SEBASTIAN, 2022).

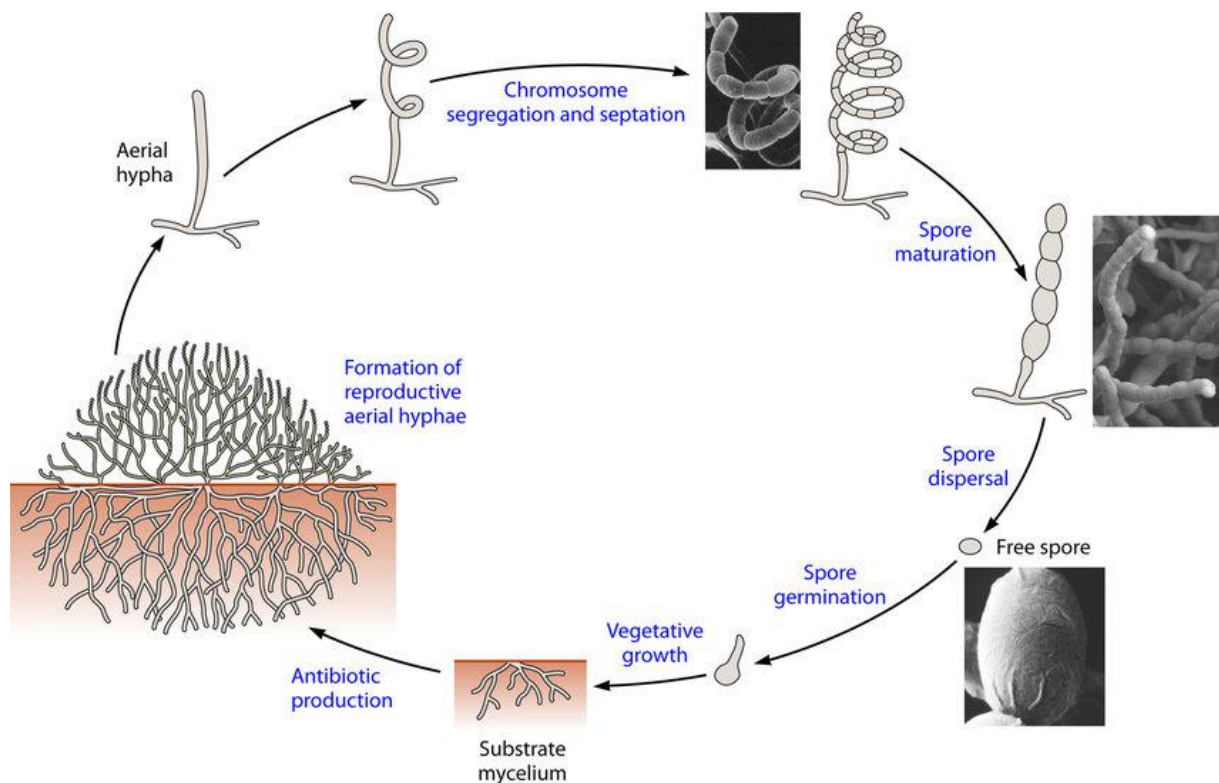
De um modo geral, os membros deste filo possuem aspectos estruturais e reprodutivos únicos dentro do domínio *Bacteria* (Figura 8), como a disposição da colônia em hifas ramificadas, que integram um micélio radial, e a reprodução via esporulação. Tais características são similares às de fungos filamentosos, apesar disso as células que compõem estas hifas demonstram aspectos típicos de organismos procarióticos Gram-positivos: ausência de núcleo verdadeiro, presença de cromossomo organizado em nucleóide bacteriano, regiões de DNA citoplasmático e presença de parede celular de peptidoglicano, neste último caso há a exceção dos membros da ordem *Corynebacteriales*, onde há o desenvolvimento de uma membrana externa à parede celular bacteriana (LI *et al.*, 2016; RAHLWES; SPARKS; MORITA, 2019).

Dadas as características estruturais das actinobactérias, o micélio gerado pelo agrupamento de hifas actinobacterianas geralmente pode ser subdividido em três tipos principais: micélio vegetativo ou substrato, micélio aéreo e micélio reprodutivo ou micélio portador de esporos (LI *et al.*, 2016). Apesar dessas definições generalistas, é importante salientar que nem todos os gêneros e espécies se adequam plenamente às características descritas, tendo em vista que apenas alguns desses são capazes de formar efetivamente todas as estruturas retratadas.

O micélio vegetativo é esguio, transparente e altamente ramificado, sendo a primeira estrutura formada a partir da germinação da forma dispersas dos esporos reprodutivo de uma outra colônia, responsável pela secreção de enzimas extracelulares, absorção de nutrientes presentes no meio e fixação da colônia ao substrato (AMARESAN *et al.*, 2020). Em determinado ponto do ciclo de vida da colônia actinobacteriana, o micélio vegetativo tende a emergir para fora do ambiente e formar o chamado micélio aéreo. Mecanismo este

majoritariamente acionado pela diminuição da disponibilidade de nutrientes no ambiente e caracterizado por modificações bruscas nas características gerais das hifas, com destaque nas características físico-químicas de hidrofobicidade. No gênero *Streptomyces*, o maior e mais difuso gênero de actinobactérias, as mudanças de características dos micélios se dá mediante liberação de peptídeos de ação surfactante que diminuem a tensão superficial dos ambientes aquosos e permitem que haja o crescimento das hifas no meio aéreo (WÖSTEN; RICHTER; WILLEY, 1999), esses peptídeos anfipáticos também se mostram envolvidos no desenvolvimento de uma matriz extracelular de natureza anfipática, a camada de *rodlet*, estruturada com sua porção hidrofílica covalentemente ligada à parede celular bacteriana via celulose enquanto a porção hidrofóbica é orientada ao exterior celular. Essa camada proteica é formada principalmente sob estresse osmótico e é responsável por conferir rigidez ao micélio aéreo (CLAESSEN *et al.*, 2002; DI BERARDO *et al.*, 2008; EL OTHMANY *et al.*, 2021). O micélio aéreo é mais aparente em superfícies sólidas e possui características menos ramificadas e mais grosseiras se comparadas com o micélio substrato (LI *et al.*, 2016).

Figura 8 – Representação esquemática do ciclo de vida de actinobactérias.



Fonte: BARKA *et al.*, 2016.

Por fim, o micélio reprodutivo é formado na grande maioria dos gêneros de actinobactéria. Desenvolvido a partir da diferenciação das células das extremidades das hifas, usualmente do micélio aéreo, essas estruturas conferem maior resistência a estresses bióticos e abióticos e são capazes de retomar o ciclo de vida de actinobactérias através da dispersão e germinação dos esporos que compõem o micélio reprodutivo (AMARESAN *et al.*, 2020). As características gerais do micélio portador de esporos como quantidade, forma, estrutura e coloração de esporos são informações significativas à classificação taxonômica e identificação de gêneros dentro do filo *actinobacteria* (BARKA *et al.*, 2016).

Organismos actinobacterianos estão intimamente relacionados a funções ecológicas chave, atuando majoritariamente como saprófagos: degradantes de matéria orgânica depositada no meio que permitem a reentrada do carbono no seu ciclo biogeoquímico (NALINI; PRAKASH, 2020). Além disso, actinobactérias podem atuar como reguladores de outras populações microbianas através da produção de metabólitos secundários que podem desempenhar funções antagônicas ou simbióticas com determinadas classes de microrganismos (RIBEIRO *et al.*, 2022), ou até mesmo exercer associações de simbiose com plantas através da produção de reguladores de crescimento ou outros tipos de hormônios vegetais (BOUKHATEM; METABET; TSAKI, 2022).

A robustez metabólica que esses microrganismos possuem para efetivamente realizarem tantas funções e possuírem difusão dentre tantos meios, incluindo ambientes extremos com alta salinidade, altas temperaturas, alta taxa de radiação solar, baixa disponibilidade de nutrientes e de água (SIVAKALA *et al.*, 2021) é justificada pelo aparato enzimático amplo e pelo vasto número de moléculas bioativas produzidas por estes organismos. Em vista de sua difusão, abundância e adaptabilidade, os membros deste filo são amplamente explorados do ponto de vista biotecnológico, sendo responsáveis pela produção de dois terços dos antibióticos de origem biótica (KALTENP, 2009) e amplamente estudados para a produção de metabólitos secundários (HASSAN; BHAT; SHAH, 2019; SALWAN; SHARMA, 2020), inibidores enzimáticos (SIDDHART *et al.*, 2019), e enzimas (ALVES *et al.*, 2016; ROMEU *et al.*, 2021; BANDEIRA *et al.*, 2022a; BANDEIRA *et al.*, 2022b; ELFRAMAWY *et al.*, 2022).

Apesar do estudo envolvendo aplicações biotecnológicas de compostos actinobacterianos não ser novidade, apenas uma pequena parcela de seu potencial completo foi explorada, parte disso dada a dificuldade na identificação de novas cepas e biomoléculas em consequência de obstáculos enfrentados no processo de isolamento e *screening*, que geram dados redundantes ao se “redescobrir” cepas já estudadas e bem estabelecidas no mercado (CLARDY; FISCHBACH; WALSH, 2006). Portanto, o foco de estudo vem mudando nas

últimas décadas, onde ambientes não convencionais vêm sendo estudados na tentativa de se isolar novas cepas ao se estudar zonas inabitadas ou pouco habitadas (HASSAN; BHAT; SHAH, 2019). É o caso do estudo de actinobactérias advindas de unidades de conservação ou estações ecológicas em zonas semiáridas do nordeste brasileiro (ROMEU *et al.*, 2021; RIBEIRO *et al.*, 2022; BANDEIRA *et al.*, 2022a; BANDEIRA *et al.*, 2022b).

2.4 Semiárido Nordestino

Zonas áridas são tidas como áreas secas, com baixa umidade, altas temperaturas e solos altamente salinos. Esses trechos compõem aproximadamente 30% da superfície terrestre e são responsáveis por diversos processos de manutenção ecológica, destacando-se o sequestro de Dióxido de Carbono (CO₂) atmosférico a partir de interações hidro-ecológicas que correlacionam a escassez de água com mecanismos desenvolvidos pelas comunidades de seres vivos que habitam tais locais (LAL, 2004; NAYLOR; COLEMAN-DERR *et al.*, 2018; LACERDA-JUNIOR *et al.*, 2019; BOTANELLI *et al.*, 2021).

A faixa semiárida do nordeste brasileiro é uma área de aproximadamente 980.000 km² que abrange um total de 1133 municípios, entre os estados de Alagoas, Bahia, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte e Sergipe, englobando um total aproximado de 89.5% de toda a região (IBGE, 2018). Conhecida por ser domínio morfoclimático do bioma Caatinga e possuir clima tropical semiárido, essa área é caracterizada por seus extremos no que diz respeito a estresses abióticos, além de possuir um padrão de precipitação irregular e escasso. Nestas regiões a temperatura média anual varia entre 23 e 27°C, a média anual de precipitação é inferior a 800mm, a insolação anual média é superior a 2800h.ano⁻¹ e a média anual da umidade relativa do ar é próxima a 50% (CUNHA; SA; SILVA, 2010).

Na região semiárida nordestina é encontrada a maior floresta seca neotropical do mundo, a Caatinga, um bioma exclusivamente brasileiro, conhecido por abrigar espécies resistente às condições adversas apresentadas nessas regiões. Seus microrganismos, principalmente, são conhecidos por apresentarem diversas adaptações químicas e estruturais que os permitem sobreviver sobre essas condições não favoráveis (DA SILVA BOLZANI *et al.*, 2012).

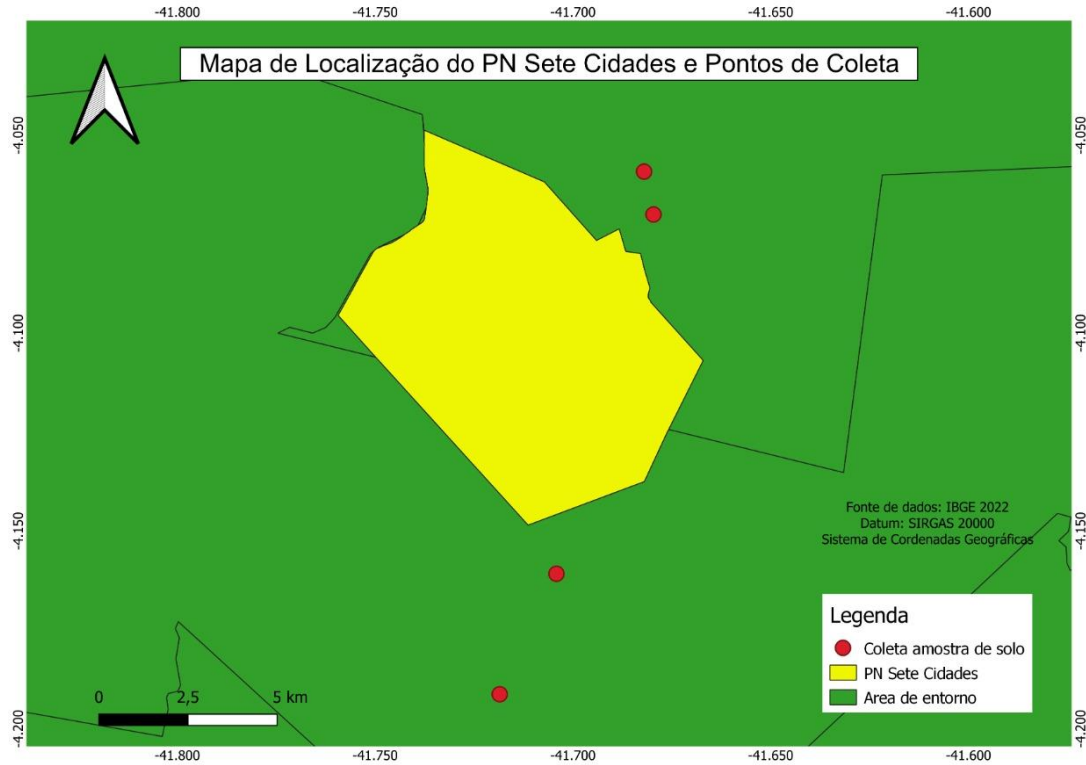
2.4.1 Unidades de Conservação no Semiárido Brasileiro

2.4.1.1 Parque Nacional de Sete Cidades - PNSC

Criado pelo Decreto Federal nº 50.744 de oito de junho de 1961, o Parque Nacional de Sete Cidades (PNSC) fica localizado na região Nordeste, no estado Piauí no intermédio dos municípios de Piracuruca, Piripiri e Brasileira, entre as coordenadas 04°02'08" S e 41°40'45"

W (Figura 9). Tendo como principais vias de acesso a BR-343 no trecho Teresina/Parnaíba e a BR-222 no trecho Piriri/Fortaleza.

Figura 9 – Localização do Parque Nacional de Sete Cidades.



Fonte: Autor, 2022.

A vegetação local é marcada pela presença de ilhas vegetacionais da caatinga em meio na vegetação de cerrado, sobretudo cerradão. Sendo uma formação de caráter florestal típica do bioma cerrado, o cerradão corresponde a uma floresta mesófila esclerófila (RIZZINI, 1979), onde há a presença de sub-bosques com formações arbustivas e herbáceas, com uma baixa concentração de gramíneas. Já a caatinga é uma espécie de vegetação típica do semiárido brasileiro, caracterizada pela presença de cactáceas e vegetação, sobretudo arbustiva, que reverdece em períodos de chuva (AB’SABER, 2003).

Como descrito acima, o parque encontra-se inserido na faixa climática do semiárido nordestino, possuindo precipitação média anual relativamente alta para esse tipo de clima. Normalmente regiões semiáridas apresentam precipitação acumulada anual inferior a 800mm (CUNHA; SA; SILVA, 2010), mas os postos das estações meteorológicas das cidades de Brasileira e Piripiri apresentaram em média, nos últimos 30 anos, em 1560mm e 1410mm, respectivamente. A insolação anual média medida pela estação meteorológica de Piripiri, foi de 2938 horas por ano, com maior valor de insolação entre os meses de agosto e outubro. Já a

temperatura média anual da área do parque é de 26,5°C, com média mínima de 25,5°C nos meses de junho e média máxima de 28,1°C nos meses de outubro (INMET, 2020).

Encontrando-se a uma altitude variando entre 100 e 300m, o relevo da região é composto por superfícies estruturais de pediplanos em sequência, esculpidos em arenitos da Formação Cabeças, correspondendo a relevos similares a ruínas, denominado ruiforme, com testemunhos isolados em formas tabulares e cônicas (IBDF 1979). Dentre as feições geomorfológicas ocorrentes na área, destacam-se as formações arenosas predominantes e os afloramentos rochosos ao norte do parque (JACOMINE *et al.*, 1986). Os principais solos presentes na região são os solos litólicos, as areias quartzozas, o solonetz-solodizado, o podzólico vermelho-amarelo e o latossolo amarelo.

O extrativismo vegetal e, principalmente, a pecuária são as duas atividades econômicas basais realizadas na região. O gado é criado livre em pastagens naturais não cercadas e no período de estiagem, a área de domínio do cerrado onde a vegetação é resistente aos períodos de seca é reservada à alimentação dos rebanhos. Já a atividade extrativista é voltada às manchas de carnaúbas presentes na região, que ocupam as áreas mais baixas do parque, e aos babaçuais, dispostos nas zonas úmidas junto a riachos. Por fim, a agricultura presente na região é direcionada a culturas de subsistência (QUEIROZ, 2006).

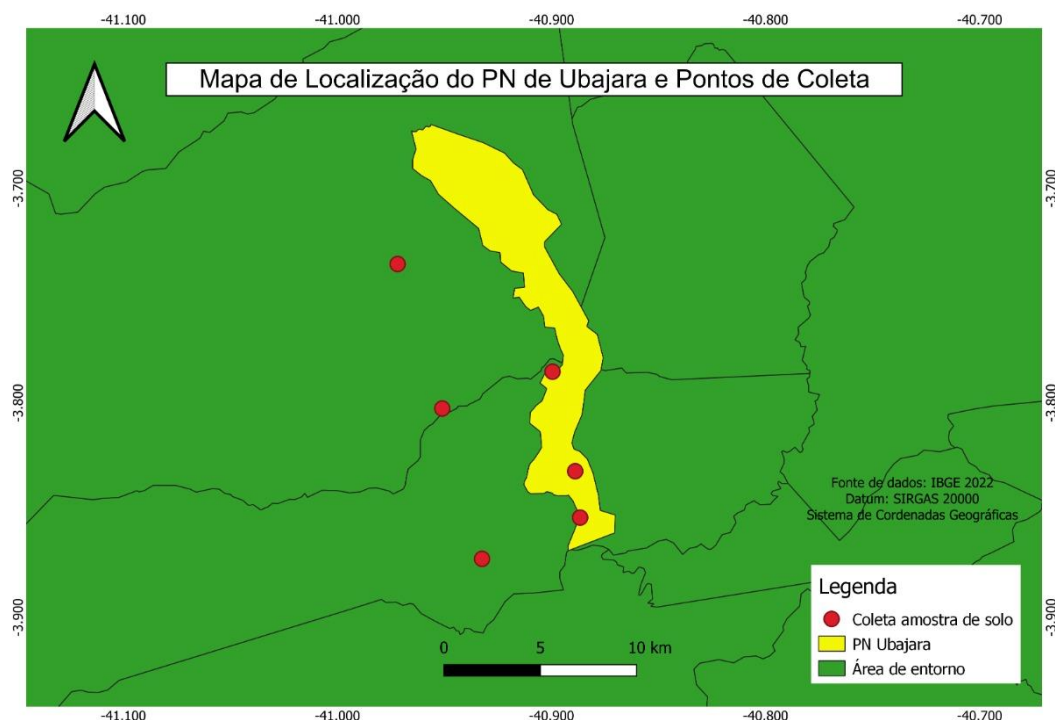
2.4.1.2 Parque Nacional de Ubajara – PARNA UBAJARA

Considerada uma Unidade de Conservação de Proteção Integral (UC), o Parque Nacional de Ubajara (PARNA Ubajara) foi criado pelo Decreto Federal nº45.954 de trinta de abril de 1959, na porção nordeste do estado do Ceará, ao norte da Chapada da Ibiapina, entre as coordenadas 3°40'30" S -40°57'0" W e 3°49'30" S -40°52'30" W (Figura 10). O parque encontra-se localizado entre os municípios de Tianguá, Frecheirinha e Ubajara, a cerca de 320km de Fortaleza e possui uma área de aproximadamente de 6269 hectares, caracterizando-o como o menor parque nacional do Brasil. O acesso ao parque se dá principalmente pela Rodovia da Confiança CE-187, onde se passa pelos municípios de São Benedito e Ibiapina até chegar ao município de Ubajara.

Embora a da região do PARNA esteja inserido na Região Nordeste, com clima predominantemente semiárido e domínio morfoclimático da Caatinga, o parque é conhecido por manter resquícios de Mata Atlântica nas regiões com altitude mais elevadas, onde o clima é mais brando que as regiões semiáridas periféricas (COIMBRA FILHO, 1996). O parque possui variações de altitude entre 400 e 900m acima do nível do mar, onde as áreas com altitudes menores que 500m apresentam temperatura média e precipitação média anual de 28,2°C e

943mm, respectivamente. Enquanto isso, áreas com altitude superior a 800m apresentam esses mesmos valores iguais a 27°C e 1487mm (FLORES; ZANETTE; ARAUJO, 2018).

Figura 10 – Localização do Parque Nacional de Ubajara, no noroeste do Estado do Ceará.



Fonte: Autor, 2022.

O PARNA Ubajara mantém aproximadamente 88,7% de sua vegetação preservada e apenas 1,9% de vegetação secundária. Devido à heterogeneidade descrita anteriormente, o gradiente de umidade e o mosaico de Mata Atlântica e Caatinga, a forma com que cada área é utilizada pela população também influencia diretamente em seu grau de conservação. Nas regiões de maior altitude, onde há maior umidade e uma maior predominância da Mata Atlântica, grande parte das atividades humanas do entorno se resumem a práticas agropecuárias. Em decorrência desse fato, essa área apresenta um maior nível de degradação se comparadas às regiões de menores altitudes, que apresentam predominância da Caatinga, onde prepondera o cultivo de culturas temporárias como feijão, milho e banana em conjunto com extrativismo da madeira (MANTOVANI *et al.*, 2017).

Em relação à classificação de solos da região, são encontrados um total de três solos predominantes na região do Parque Nacional e entornos: Neossolos nas regiões de menor altitude, que são definidos como solos arenosos e com baixa capacidade de adsorção de nutrientes. Latossolo vermelho-amarelo distrófico nas regiões mais úmidas do Planalto da

Ibiapaba e o Argissolo vermelho-amarelo (ICMBIO, 2002).

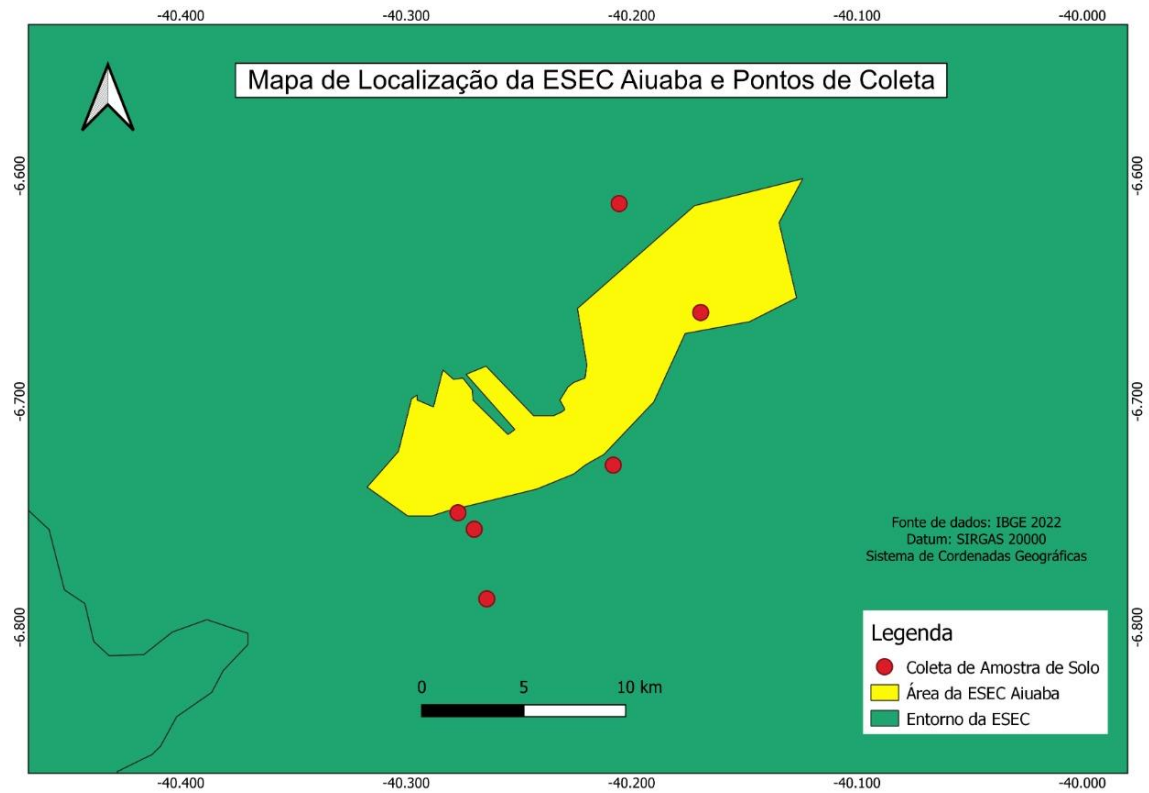
2.4.1.3 Estação Ecológica de Aiuaba - ESECA

Unidade Nacional de Conservação localizada a sudoeste do Estado do Ceará, entre as coordenadas 6°36'01" S 40°07'15" W e 6°44'35" S 40°19'19" W, a Estação Ecológica de Aiuaba – ESECA (Figura 11) foi reconhecida no dia 06 de fevereiro de 2001 por meio de um Decreto Federal sem Nº, possuindo área e perímetro aproximados de 11.798,14 hectares e 72,77 km, respectivamente. A UC, localizada na região do Sertão dos Inhamuns, possui a totalidade de seu território inserido dentro do município de Aiuaba e foi criada no intuito de preservar a biodiversidade florística e faunística da Caatinga. Justificada pela alta taxa de preservação da região, uma vez que é uma das áreas com maior grau de conservação do Estado do Ceará, onde 81% da sua área total apresenta vegetação conservada, 10% vegetação secundária e apenas 5% apresenta plantações, pastos e solo exposto (MANTOVANI *et al.*, 2017).

A ESECA está plenamente inserida no domínio morfoclimático da Caatinga, com clima semiárido e vegetação savana estépica. Contudo, a presença de chapadas de 400 a 700m de altitude na região favorecem as chamadas chuvas orográficas, causadas pela condensação de nuvens ao encontrarem regiões de altitude elevada, dessa forma há o favorecimento do desenvolvimento de uma caatinga de caráter arbóreo, formando uma floresta densa nesses locais. Ainda assim, há uma disparidade vegetacional, variando desde o estrato arbóreo a formações arbustivas, com alto espaçamento entre as plantas. A temperatura média anual do parque é elevada, mantendo-se na faixa de 25,3 e 25,9 °C, enquanto a pluviometria média anual indica valores entre 590 e 684mm (IBAMA, 2006).

Em relação a geomorfologia da área, boa parte dos seus terrenos possuem rochas metamórficas e embasamento cristalino. Com a predominância de quatro categorias de relevo na área, sendo elas: formas estruturais, formas erosivas, formas dissecadas e formas de acumulação (CORREIA FILHO *et al.*, 1988). Já no que diz respeito as características do solo da região, são identificados um total de nove classes de solo: Latossolo Vermelho-amarelo, Latossolo Vermelho-escuro Podzólico, Podzólico Vermelho-Amarelo, Bruno Não Cálcico, Planossolo, Vertissolo, Solos Litólicos, Areias Quartzosas e Aluviões. Com a predominância de Latossolo Vermelho-Amarelo, Planossolo Nátrico e Luvissole Crômico (MANTOVANI *et al.*, 2017).

Figura 11 – Localização da Estação Ecológica de Aiuaba, a sudoeste do Estado do Ceará.



Fonte: Autor, 2022.

3 OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS

3.1 Geral

Identificar enzimas de interesse biotecnológico a partir de cepas de actinobactérias sob diferentes tipos vegetacionais em unidades de conservação pouco estudadas no semiárido nordestino.

3.2 Específicos

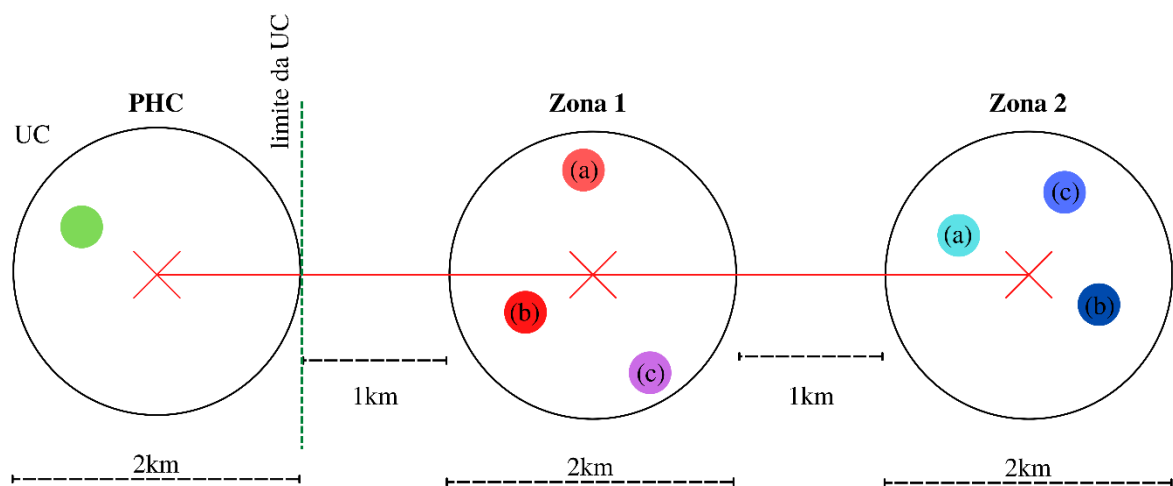
- Caracterizar culturas das cepas de actinobactérias;
- Caracterizar micromorfológicamente as cepas de actinobactérias;
- Traçar perfil enzimático de:
 - Amilase
 - Celulase
 - Lacase
 - Lipase
 - Pectinase
 - Protease
 - Xilanase
- Identificar cepas capazes de apresentar produções enzimáticas múltiplas e proeminentes.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Amostragem e coleta

As coletas foram realizadas em três unidades de conservação: PNSC, PARNA UBAJARA e ESECA, pelos doutorandos Leonardo Bandeira e Fernando Cavalcante do Programa de Ecologia e Recursos Naturais da Universidade Federal do Ceará em 2018, autorizadas conforme o projeto de pesquisa do CNPQ da Chamada CNPq/ICMBio/ FAPs nº18/2017⁽¹⁾. Foram sorteados transectos aleatórios em cada unidade de conservação, nos quais a distância entre o centro e a área externa era igual a 1km da extremidade de cada UC, com uma distância mínima de 3km entre os transectos. No percurso do transectos, foram delimitadas áreas circulares demarcadas de acordo com o uso de solo de cada região, denominadas como: Área Preservada Homogênea (PHC) dentro da UC, utilizada como zona de controle e outras duas áreas mais externas com diferentes características fisionômicas, identificadas como Zona 1 e Zona 2, podendo ser classificadas como áreas conservadas, secundárias ou de agricultura (Quadro 1). Dentro de cada zona: PHC, Zona 1 ou Zona 2, um grid foi formado e aleatorizado para definir os pontos de coleta de solo de cada setor. A elucidação do modelo de amostragem pode ser encontrada na Figura 12.

Figura 12 – Padrão de coleta de solo, consistindo de área preservada homogênea (PHC) e áreas identificadas como Zona 1 e Zona 2. Além dos pontos de coletas aleatórios a, b e c.



Fonte: Autor, 2022.

Cinco sub-amostras de solos rizosféricos foram então coletadas a uma profundidade variando entre 0 e 20cm em cada ponto selecionado e nomeadas de acordo com o uso da terra do local e com o pixel aleatorizado da grid formada (Tabela 1). Por fim, as amostras foram

asépticamente homogêneas, acondicionadas em sacos plásticos, conservadas em caixotes de isopor e encaminhadas para o Laboratório de Microbiologia Ambiental (LAMAB) do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará (BANDEIRA, 2020).

Quadro 1 – Especificações de critérios utilizados para os diferentes usos da terra

USO DA TERRA	
Agricultura	Áreas de coleta nas quais são realizadas atividades agrícolas pelas comunidades locais.
Conservada	Áreas de coleta fora da unidade de conservação, mas com as mesmas características das áreas preservadas.
Preservada	Áreas de coleta localizadas no interior da unidade de conservação (PHC).
Secundária	Áreas de coleta que já foram previamente ocupadas por outras comunidades ecológicas e que se encontram em estágio de sucessão intermediário.

Fonte: Adaptado de Projeto ICMBio, 2017.

Tabela 1 – Relação da localização dos pontos amostrais de coleta em Aiuaba (AIU), Ubajara (UBJ) e Sete Cidades (7CI).

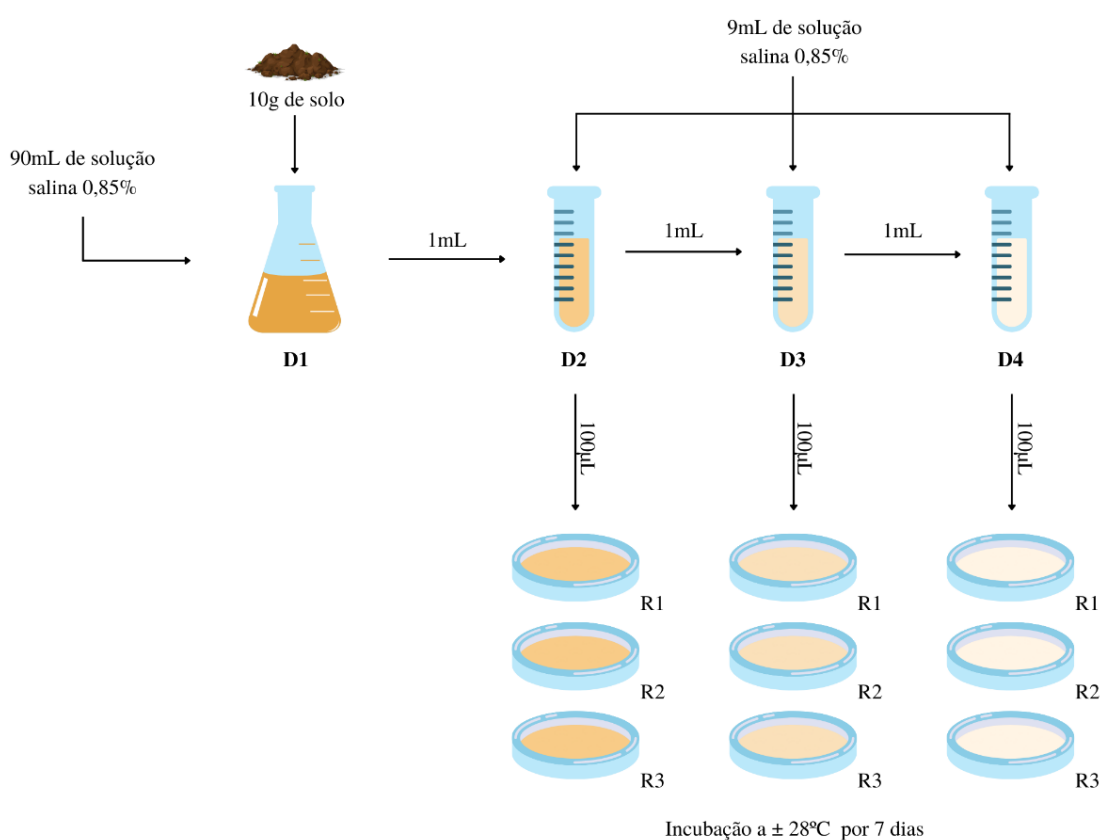
Localização	Ponto	Latitude	Longitude	Uso da Terra
AIU	C49	-6,74924	-40,277	Conservada
AIU	PRE156	-6,66051	-40,1693	Preservada
AIU	S52	-6,75653	-40,2698	Secundária
AIU	S69	-6,78738	-40,2642	Secundária
AIU	S121	-6,72813	-40,2081	Secundária
AIU	S94	-3,786967	-40,923075	Secundária
UBJ	A85	-3,735174	-40,97187	Agricultura (Banana)
UBJ	A95	-3,802534	-40,951015	Agricultura (Pimentão)
UBJ	A105	-3,872628	-40,932441	Agricultura (Mandioca)
UBJ	PRE60	-3,831773	-40,888927	Preservada
UBJ	PRE90	-3,78537	-40,899524	Preservada
UBJ	PRE100	-3,853381	-40,886626	Preservada
7CI	A38	-4,069984	-41,679596	Agricultura (Milho e Feijão)
7CI	C17	-4,191255	-41,718477	Conservada
7CI	S15	-4,160797	-41,704137	Secundária
7CI	S40	-4,059149	-41,681981	Secundária

Fonte: Autor, 2022.

4.2 Isolamento de Actinobactérias

A abordagem utilizada para o isolamento de actinobactérias foi o da diluição seriada unido ao método do *spread plate*. O protocolo utiliza de 10 g de cada amostra de solo, diluída em 90 mL de solução salina 0,85%. Essa solução foi então identificada como D1, com diluição equivalente a 10^{-1} e método foi repetido por três vezes para adquirir as soluções D2 (10^{-2}), D3 (10^{-3}) e D4 (10^{-4}), onde 1 mL da solução de menor diluição foi acrescido de 9mL de solução salina 0,85% para se obter as diluições seguintes. Ao final, 100 μ L das soluções D1, D2, D3 e D4 foram pipetados sobre placas de Petri contendo o meio Caseína-dextrose-ágar (CDA) (Tabela 3) ajustado a pH 6,6, seletivo para o crescimento de actinobactérias (KUSTER; WILLIAMS, 1964; ARIFUZZAMAN *et al.*, 2010), em triplicata e o líquido foi homogeneamente espalhado por toda a placa com o auxílio de uma alça de Drigalski estéril (Figura 13). Então as placas inoculadas foram incubadas por um período de 7 dias a uma temperatura de 28 ± 2 °C.

Figura 13 – Ensaio de contagem e isolamento de actinobactérias.



Fonte: Autor, 2022

Ao final do período de 7 dias de incubação foi realizada a contagem do número de

colônias de actinobactérias para os cálculos de abundância e as colônias isoladas foram inoculadas individualmente em placas de Petri contendo meio de cultivo CDA para a realização de procedimentos posteriores. Foram realizados um total de três ensaios para maior confiabilidade dos cálculos de abundância.

Tabela 2 – Formulação do meio de Cultivo Caseína-dextrose ágar (acrescido de nistatina).

MEIO CDA – pH 6,6	
Caseína	0,2g
Dextrose	2g
K ₂ HPO ₄	0,5g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2g
FeSO ₄	0,01g
Nistatina	2,5mL
Ágar	15g
Água Destilada	~1000mL
*Hidrolisar Caseína em 10mL de NaOH 0,1M antes de pôr no meio	

Fonte: Adaptado de Kuster; William (1964).

4.3 Nomenclatura dos isolados

Um total de 45 colônias foram inoculadas individualmente em placas e incubadas a 28 ± 2 °C por um período de 10 dias. As colônias foram então agrupadas e nomeações individuais foram designadas unindo a sigla SN, referindo-se a Semiárido Nordeste, ao número de cada isolado (Tabela 4).

Quadro 2 - Nomenclatura de colônias de acordo com área e localização

<i>Local</i>	<i>Ponto de Coleta</i>	<i>Isolados</i>
UBJ	PRE100	SN01
UBJ	A105	SN02
UBJ	A95	SN03,SN04,SN05,SN06,SN07,SN08
UBJ	A85	SN09,SN10,SN12,SN13,SN20,SN32,SN33,SN34
UBJ	PRE90	SN11,SN39
7CI	A38	SN12
7CI	S15	SN14
7CI	S40	SN15
7CI	C17	SN16
AIU	PRE156	SN17, SN18, SN19
AIU	C49	SN21, SN22
AIU	S121	SN23,SN24,SN25
AIU	S52	SN26,SN27,SN28,SN29
AIU	S69	SN30,SN31
AIU	S94	SN35,SN36,SN37,SN38
UBJ	PRE60	SN40,SN41,SN42,SN43,SN44,SN45

Fonte: Autor, 2022.

4.4 Coloração de Gram

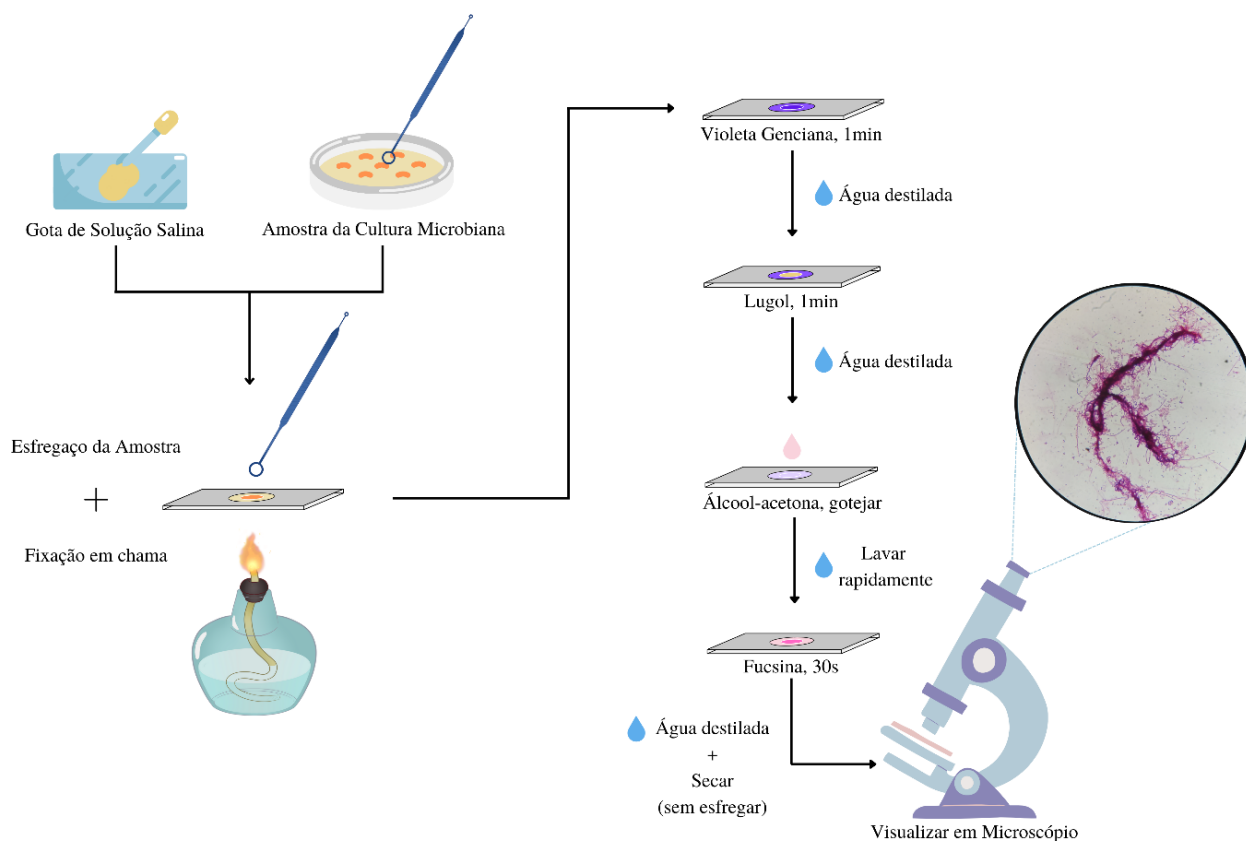
Após a nomeação das cepas foi realizado um teste de caráter avaliativo no intuito de confirmar a natureza dos isolados. Como actinobactérias normalmente são microrganismos Gram (+) filamentosos, foi realizado a coloração de Gram (KERN; BLEVINS, 1999), buscando identificar se os isolados realmente se adequavam a estes dois parâmetros. Uma amostra de cada isolado foi retirada para a realização do esfregaço em lâminas de microscopia estéreis, nas quais uma gota de solução salina 0,85% foi previamente pipetada. Após a realização do esfregaço as lâminas foram rapidamente passadas sobre a chama de uma lamparina para que houvesse a secagem completa da gota de solução salina, processo conhecido como fixação em chama.

Com o esfregaço fixado em mãos, deu-se início ao processo da coloração de Gram propriamente dito, no qual cada lâmina foi coberta em solução fenicada de cristal violeta por um minuto e lavadas com água destilada após esse período. As lâminas foram então cobertas pela solução de lugol 1% (mordente) por outro minuto e lavadas em água destilada novamente. Uma solução descolorante de álcool-acetona (descolorante) foi gotejada sobre os esfregaços de cada lâmina e rapidamente lavadas em água corrente e, por fim, foi aplicada uma solução de fucsina fenicada (contra corante) por 30 segundos e a lâmina foi novamente lavada e seca sem que o esfregaço fosse comprometido. As lâminas secas foram encaminhadas para a visualização e avaliação em microscópio óptico Zeiss Axioplan[®] até a lente objetiva de imersão (1000x) (Figura 14).

4.5 Caracterização Cultural

Para a caracterização cultural (macromorfológica) das actinobactérias foram realizadas duas etapas: a primeira delas consistiu em cada uma dos 45 isolados sendo inoculados em meio de cultura CDA, utilizando o método de esgotamento em placa, com posterior incubação em BOD (*Biochemical Oxygen Demand*) a uma temperatura de $28 \pm 2^\circ\text{C}$ por um período de 10 dias. Ao fim desse período as características dos micélios aéreos e vegetativos das colônias foram descritas conforme Wink (2012), baseando-se na cartilha de cores *RAL color charts*. As colônias foram caracterizadas, também, de acordo com a presença ou ausência de pigmentos difusivos no meio. Por fim, os micélios aéreo e vegetativo de cada placa foram fotografados. A segunda etapa diz respeito à observação das colônias isoladas. Similarmente à primeira etapa, os 45 isolados foram inoculadas utilizando a técnica de *spots* em meio de cultura CDA e incubados em BOD por 10 dias. Após esse período as colônias isoladas foram observadas utilizando o Microscópio Binocular Estereoscópico Q740SZ e fotografadas.

Figura 14 – Esquema metodológico da coloração de Gram



Fonte: Autor, 2022.

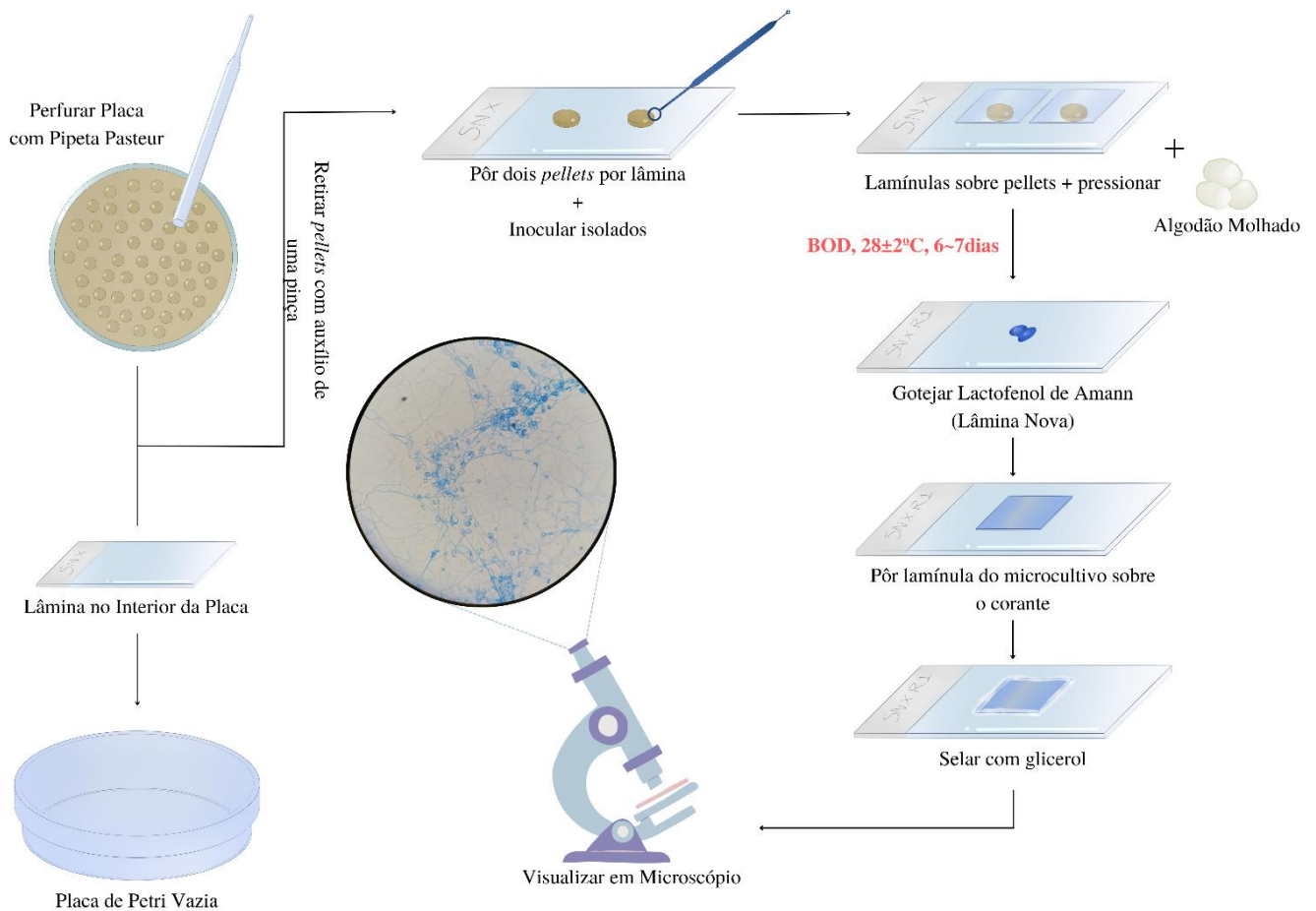
4.6 Caracterização Micromorfológica

Esta análise indicativa de gênero das actinobactérias se deu pela metodologia adaptada de Kern e Blewins (1999). Na qual, em condições assépticas, uma placa de Petri contendo meio de cultura Caseína-dextrose-ágar foi completamente perfurada utilizando-se da extremidade de maior diâmetro de uma pipeta Pasteur de vidro para que se pudesse obter pequenos discos de meio (*pellets*). Para cada isolado, dois *pellets* foram retirados da placa com o auxílio de uma pinça estéril e colocados sobre uma lâmina de microscopia que havia sido previamente flambada, identificada e posta no interior de uma placa de Petri vazia. Então, com uma alça estéril, uma pequena parcela das colônias foram inoculadas ao redor dos *pellets* e, por fim, uma lamínula estéril foi posta sobre cada um dos discos e levemente pressionada com o auxílio da pinça. Para a manutenção da umidade do microambiente, com o objetivo de retardar a secagem do disco de meio, dois algodões úmidos estéreis foram colocados dentro de cada placa antes de fechá-las e leva-las à BOD, onde foram incubadas a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ por um período de 6 a 7 dias (Figura 15).

Ao final do período de incubação, cada uma das lamínulas foi transferida para lâminas

de microscopia estereis, previamente identificadas, contendo uma gota do corante Lactofenol de Amann. A lâmina montada foi então vedada com o auxílio de glicerol e após a secagem as lâminas foram visualizadas em microscópio óptico Zeiss Axioplan[®] até a lente objetiva de imersão (100x), fotografado e os gêneros de cada cepa foram identificados de acordo com análise comparativa com as imagens do *Atlas of Actinomycetes*, publicado pela Sociedade Japonesa de Actinomicetos (1997), com o *Digital Atlas of Actinomycetes 2*, publicado pela Sociedade Japonesa para Actinomicetos (2022), e com as imagens contidas no livro *Beneficial Microbes in Agroecology: Bacteria and Fungi*, no capítulo sobre actinobactérias (AMARESAN *et al.*, 2020). A partir desta etapa, cada isolado, passa a ser chamado de cepa.

Figura 15 – Esquema metodológico de microcultivo



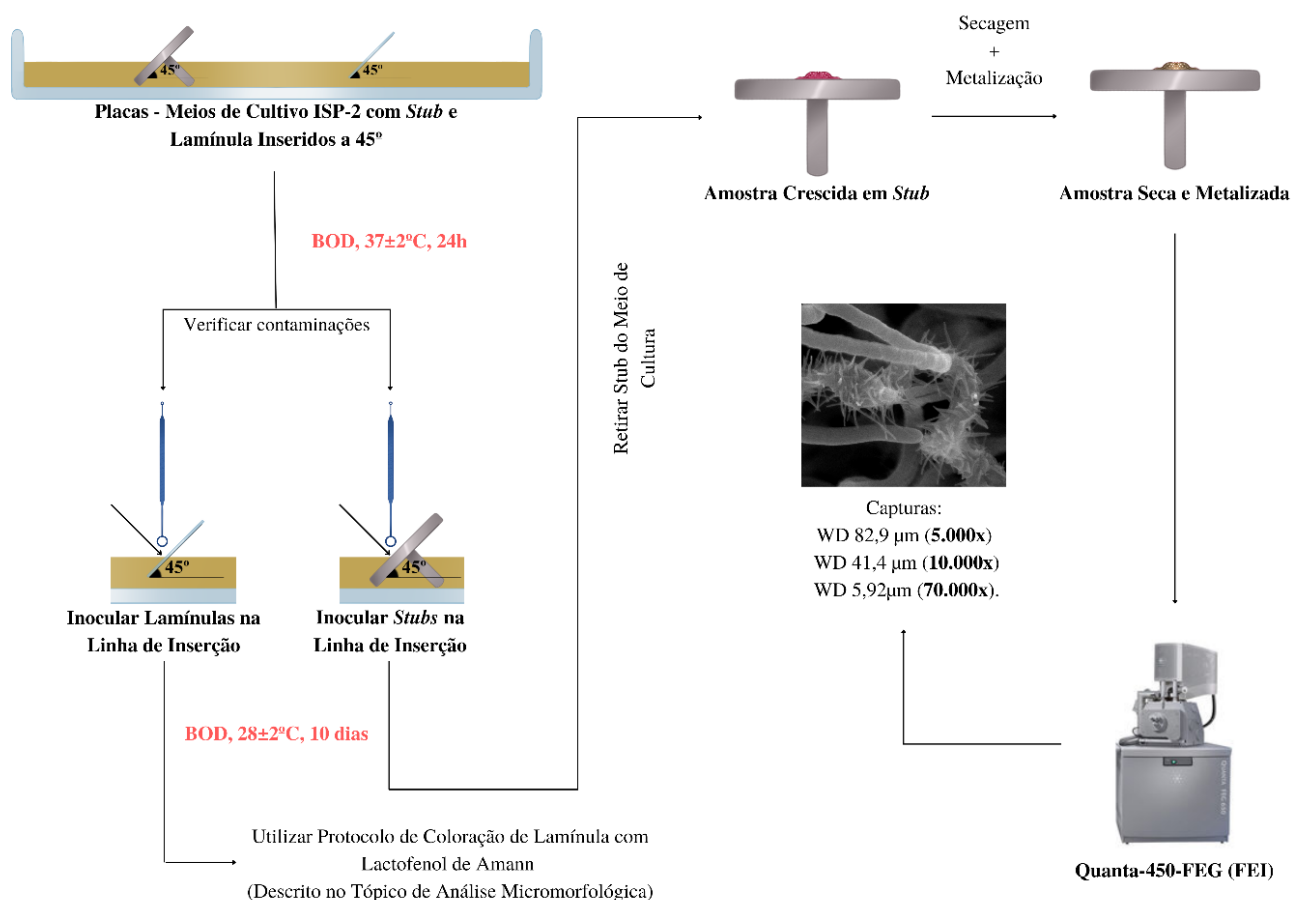
Fonte: Autor, 2022.

4.7 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) das Cepas

Para a visualização das cepas de actinobactérias sob microscopia eletrônica de varredura foi utilizado o método descrito por Balagurunathan (2020). Esse protocolo utilizou de *Stubs* de

alumínio estéreis e lamínulas de vidro inseridos a 45°C em meio ISP-2 (Tabela 4), que foram incubados a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 horas para a identificação de contaminações microbianas. No caso de não haver contaminantes após essa primeira incubação a inoculação das cepas era realizada ao longo das linhas de inserção das lamínulas e *stubs* no meio de cultura. As placas foram inoculadas a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ por 10 dias e as lamínulas eram montadas conforme protocolo de coloração descrito no Tópico 4.8 e utilizadas como padrão para a avaliação do desenvolvimento dos esporos. Passado o período de incubação, os *stubs* eram cuidadosamente retirados do meio de cultura, identificados e encaminhados à Central Analítica da Universidade Federal do Ceará, onde passariam pelos processos de secagem em dessecador e metalização. A visualização e três capturas de imagem por amostra foram realizadas sob Microscopia Eletrônica de Varredura em Quanta-450-FEG (FEI) a 20kV, 14.4 de *Working Distance* e *Horizontal Field Width* de: 82,9 μm (5.000x), 41,4 μm (10.000x) e 5,92 μm (70.000x) (Figura 16).

Figura 16 – Esquema de Preparo de Amostras e Análise de Amostras por Microscopia Eletrônica de Varredura.



Fonte: Autor, 2022.

Tabela 3 – Formulação do meio de *International Streptomyces Program 2* (ISP-2)
MEIO ISP-2 – pH 7,2

Extrato de Malte	10g
Extrato de Levedura	4g
Glucose (Dextrose)	4g
Ágar	15g
Água Destilada	~1000ml

Fonte: Adaptado de TATA *et al.*, 2019.

4.8 Atividades Enzimáticas

Enzimas são proteínas de ação específica responsáveis pela realização de funções metabólicas de natureza diversa, sendo necessárias à sobrevivência e adaptação de qualquer organismo. Por conta disso, a mais diversa gama de enzimas de diferentes classes enzimáticas é encontrada em actinobactérias, sendo passíveis de aplicação nas mais diversas áreas, como indústria, meio ambiente, agricultura e saúde. Geralmente a avaliação da atividade enzimática por enzimas extracelulares de microrganismos é determinada pela inoculação destes em substrato específico utilizando a técnica de *spots*, onde quatro pontos são inoculados por placa e após o período de incubação, variável de acordo com o tipo de ensaio enzimático que está sendo realizado, a produção é avaliada a partir da presença de um halo claro formado naturalmente no meio ou formado após a adição de determinados reagentes que irão colorir compostos específicos presentes no meio (GOPINATH *et al.*, 2017; BALAGURUNATHAN *et al.*, 2020). Com o auxílio de um paquímetro, o diâmetro deste halo de degradação é medido em milímetros (Dh), assim como o diâmetro da colônia (Dc), obtendo-se o índice enzimático (IE) a partir da fórmula abaixo (HANKIN; ANAGNOSTAKIS, 1975).

Equação 1 – Cálculo do Índice Enzimático

$$IE = \frac{Dh}{Dc}$$

IE = Índice enzimático

Dh = Diâmetro do halo de degradação

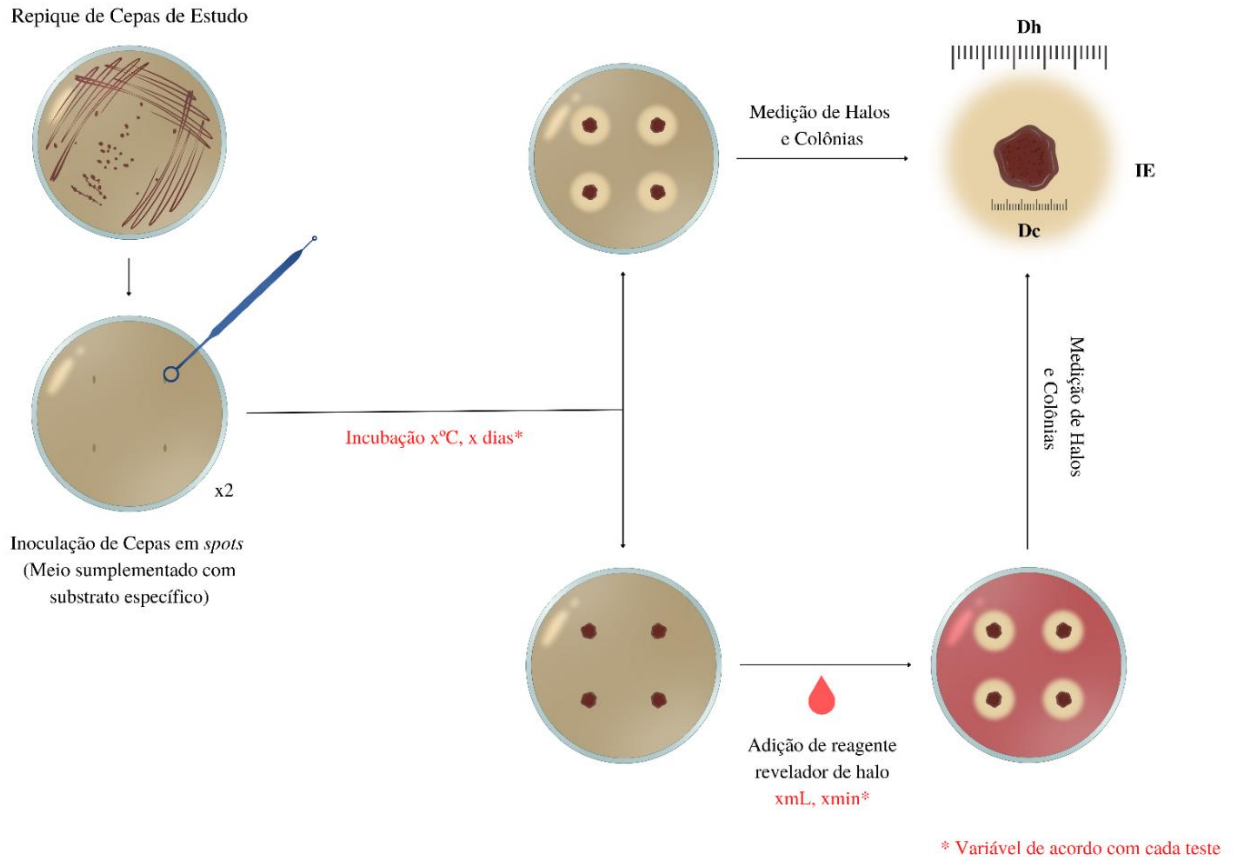
Dc = Diâmetro do halo da colônia

Fonte: Adaptado de Hankin; Anagnostakis (1975).

De acordo com o cálculo do índice enzimático, é possível identificar o potencial de degradação das enzimas extracelulares de cada cepa. Por conta do erro amostral, cada ensaio é

realizado em quadruplicata, e pelo menos dois ensaios são realizados por cepa (Figura 16). Para casos de discrepância ou contaminação, um terceiro ensaio é requisitado.

Figura 17 – Esquema metodológico generalista para teste enzimático



Fonte: Autor, 2022

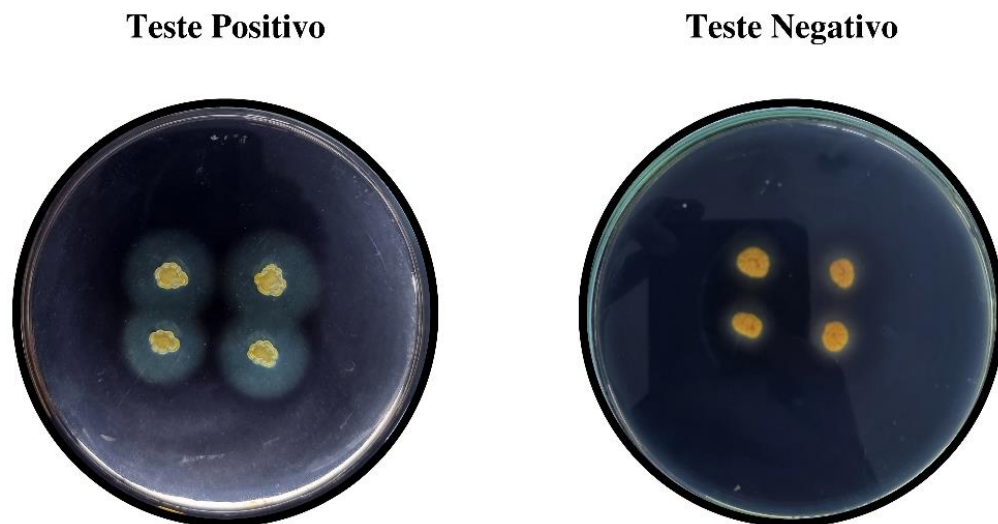
4.8.1 Atividade Amilolítica

Para se avaliar a capacidade de produção de amilases extracelulares pelas cepas, foi realizado o teste adaptado do livro *Protocols in Actinobacteria* (2020). Cada uma das 45 cepas foi inoculada de modo a formar 4 spots (protocolo geral de testeno Meio Amido (Tabela 5) em placa de petri. Após inoculadas, as placas foram incubadas em B.O.D. por um período de 10 dias a uma temperatura de 28 ± 2 °C. Passado o período de incubação, com as placas já abertas foi realizada a pipetagem de 10mL de lugol (iodo 1%) sobre cada placa e passado aproximadamente 60 segundos a solução foi descartada. Com isso, obteve-se a formação, ou não, de um halo de hidrólise visível pela ausência de pigmentação do meio ao redor da colônia (Figura 17). Os diâmetros das colônias e dos halos de degradação foram mensurados com o auxílio de um paquímetro e tabelados para posterior cálculo do índice enzimático.

Tabela 4 – Formulação do Meio Amido

Meio Amido	
Peptona	10g
Extrato de Carne	3g
NaCl	5g
Amido	2g
Ágar	15g
Água Destilada	~1000mL

Fonte: Adaptado de BALAGURUNATHAN *et al.* (2020).

Figura 18 – Testes enzimáticos positivos e negativos para a produção de amilases.

Fonte: Autor, 2022.

4.8.2 Atividade Celulolítica

Para a avaliação da produção de enzimas celulolíticas, foram realizados ensaios com a metodologia geral de testes enzimáticos em meio carboximetilcelulose (CMC), ajustado a pH 6 (Tabela 6). Após a inoculação das cepas, as placas de Petri contendo o meio CMC foram incubadas em B.O.D. a 28 ± 2 °C por um período de 10 dias. Após o período de incubação, as placas foram abertas e foi pipetado um volume de 10mL da solução reveladora de halo (Vermelho Congo 0,5%) em seu interior. Passados 15 minutos, a solução foi descartada, 10mL de uma solução de NaCl 2M foi pipetada em cada placa e, por um período de 30 minutos, foi deixada no interior delas. Passado o período de 30min, a solução salina foi descartada de cada placa e um halo de hidrólise foi observado ao redor das colônias capazes de degradar celulose (Figura 18). Os diâmetros das colônias e dos halos de degradação foram mensurados com o auxílio de um paquímetro e tabelados para posterior cálculo do índice enzimático.

Tabela 5 – Formulação do Meio Carboximetilcelulose

Meio CMC – pH 6,0	
Carboximetilcelulose	5g
MgSO ₄	0,5g
KCl	0,5g
NaNO ₃	0,5g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,01g
K ₂ HPO ₄	1g
Ágar	15g
Água Destilada	~1000mL
* Hidratar carboximetilcelulose e manter sob agitação por 24~48h antes do preparo	

Fonte: COURI; FARIAS, 1995; HANKIN; ANAGNOSTAKIS, 1977.

Figura 19 - Testes enzimáticos positivos e negativos para a produção de celulases.**Teste Positivo****Teste Negativo**

Fonte: Autor, 2022.

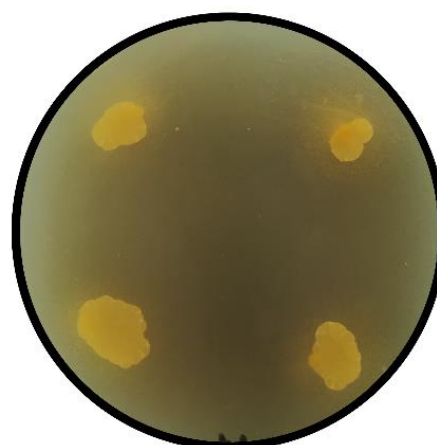
4.8.3 Atividade Lipolítica

Com o intuito de se avaliar a capacidade produtora de triacilglicerol lipases extracelulares a partir das cepas da coleção, foram realizados ensaios segundo a metodologia geral de testes enzimáticos em meio Tween 80, ajustado a pH 6,5 (Tabela 7). As placas de petri contendo o meio em questão foram inoculadas e, após a realização deste procedimento, incubadas por um período de 10 dias em B.O.D a 28 ± 2 °C. Passado esse período, foi possível observar um halo de hidrólise opaco ao redor das colônias capazes de produzir lipases (Figura 19) (BALAGURUNATHAN *et al.*, 2020). Os diâmetros das colônias e dos halos de degradação foram mensurados com o auxílio de um paquímetro e tabelados para posterior cálculo do índice enzimático.

Tabela 6 - Formulação do Meio Tween 80

Meio Tween 80 – pH 6,5	
Peptona	5g
NaCl	5g
CaCl	0,1g
Ágar	15g
Água Destilada	~1000mL
Tween 80	10mL
* Adicionar Tween 80 estéril após a autoclavagem do meio	

Fonte: Adaptado de BALAGURUNATHAN *et al.*, 2020.

Figura 20 - Testes enzimáticos positivos e negativos para a produção de lipases.**Teste Positivo****Teste Negativo**

Fonte: Autor, 2022.

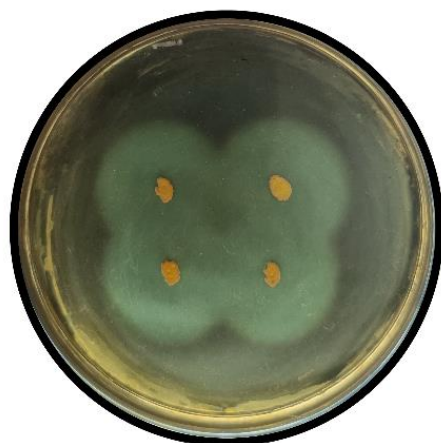
4.8.4 Atividade Pectinolítica

Para se avaliar a capacidade produtora de enzimas pectinolíticas extracelulares pelas cepas da coleção, foram realizados ensaios segundo a metodologia geral de testes enzimáticos em meio Pectina, ajustado a pH 7,3 (Tabela 9). Após a inoculação das cepas neste meio, as placas inoculadas foram incubadas por um período de 10 dias em B.O.D a 28 ± 2 °C. Passado esse período, as placas foram abertas e 10mL da solução de reveladora de halo (Lugol 1%) foi pipetada sobre as colônias e deixada agir por um período de 1 minuto. Passado esse período, a solução foi descartada e foi possível observar um halo de hidrólise ao redor das colônias capazes de produzir pectinases (Figura 20) (SILVA *et al.*, 2019). Os diâmetros das colônias e dos halos de degradação foram mensurados com o auxílio de um paquímetro e tabelados para posterior cálculo do índice enzimático.

Tabela 7 – Formulação Meio Pectina

Meio Pectina – pH 7,3	
Triptona	1,5g
Peptona	0,5g
NaCl	1,5g
Pectina Cítrica	1g
Ágar	15g
Água Destilada	~1000mL

Fonte: Adaptado de Silva *et al.*, 2022.

Figura 21 – Testes enzimáticos positivos e negativos para a produção de pectinases.**Teste Positivo****Teste Negativo**

Fonte: Autor, 2022.

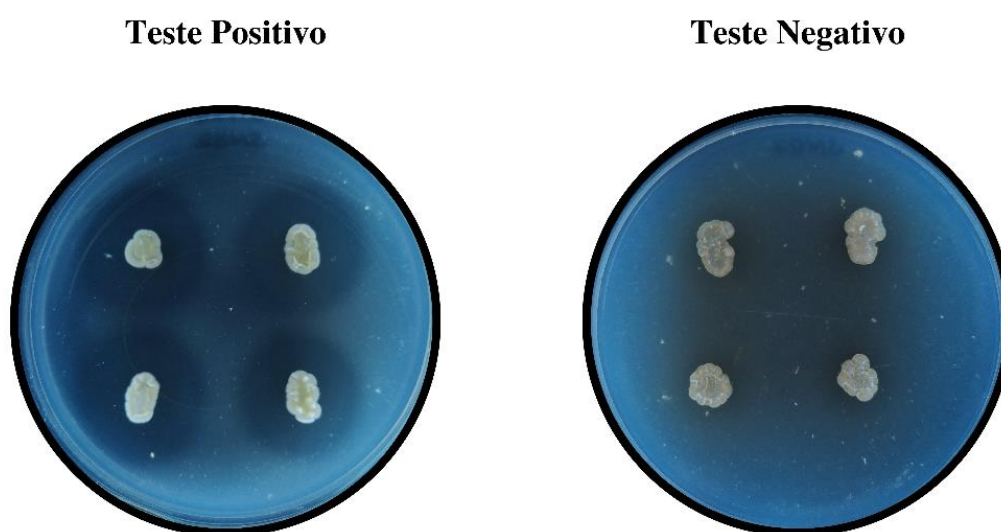
4.8.5 Atividade Proteolítica

A avaliação do potencial produtor de proteases/peptidases extracelulares pelas cepas de actinobactérias foi realizada utilizando a metodologia geral de testes enzimáticos em meio *Skim Milk Agar* (SMA) ajustado a pH 7,0 (Tabela 10), empregando formulação e metodologia adaptadas de Fernandez, Ramachandran & Nallakumar (2018), onde as placas de petri contendo o meio de cultivo em questão foram incubadas em incubadora B.O.D. a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ por um período de 7 dias. Passada a etapa de incubação, um halo de hidrólise cristalino ao redor das colônias foi considerado como positivo para a produção de proteases (Figura 22), halo visualizável por conta da degradação da proteína do leite presente no meio. Os diâmetros das colônias e halos de degradação foram mensurados com o auxílio de um paquímetro e tabelados para posterior cálculo do índice enzimático.

Tabela 8 – Formulação do Meio *Skim Milk Agar* (SMA)

Meio <i>Skim Milk Agar</i> – pH 7,0	
Leite Desnatado	5g
Peptona	3g
NaCl	3g
Ágar	15g
Água Destilada	~1000mL

Fonte: Adaptado de FERNANDEZ; RAMACHANDRAN; NALLAKUMAR, 2018.

Figura 22 – Testes enzimáticos positivos e negativos para a produção de proteases.

Fonte: Autor, 2022.

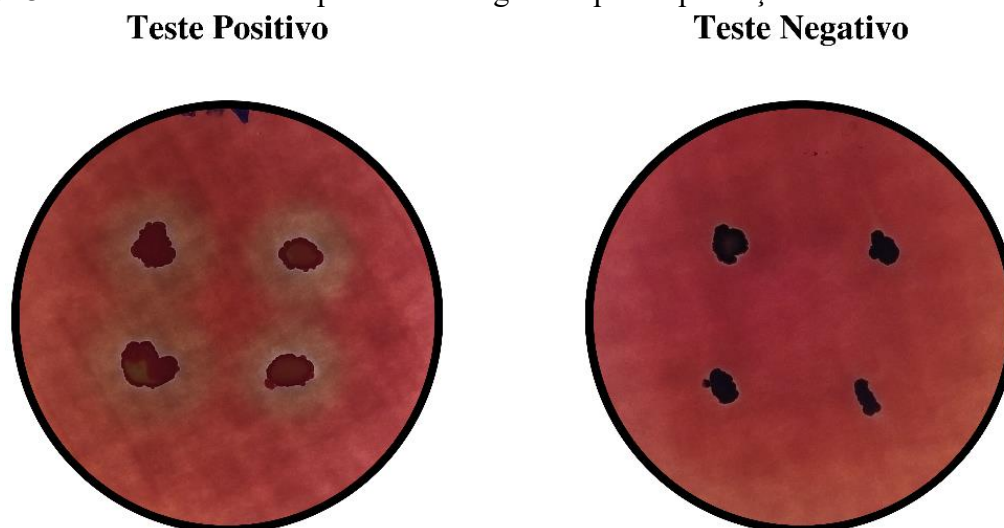
4.8.6 Atividade Xilanolítica

A avaliação da capacidade produtora xilanases foi realizada com as cepas de estudo de acordo com a metodologia geral de testes enzimático em meio Pectina, ajustado a pH 6,0 (Tabela 11). As cepas foram inoculadas nos meios e incubadas a 28 ± 2 °C por um período de 7~10 dias. Após o período de incubação, as placas foram abertas e foi pipetado um volume de 10 mL da solução reveladora de halo (Vermelho Congo 0,5%) sobre as colônias e assim foi mantido por um período de 15 minutos. Após isso o excesso de solução foi descartado e 10 mL de uma solução de NaCl 2M foi pipetada no interior de cada placa. Passado o período de 30 minutos, a solução salina foi descartada de cada placa e um halo de hidrólise foi observado ao redor das colônias capazes de degradar xilose (Figura 21) (KUMAR *et al.*, 2012). Os diâmetros das colônias e dos halos de degradação foram mensurados com o auxílio de um paquímetro e tabelados para posterior cálculo do índice enzimático.

Tabela 9 – Formulação do Meio Xilana

Meio Xilana – pH 6,0	
Xilana	1g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5g
Extrato de Levedura	0,1g
NaNO ₃	0,5g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,01g
K ₂ HPO ₄	1g
Ágar	15g
Água Destilada	~1000mL

Fonte: Adaptado de KUMAR *et al.*, 2012.

Figura 23 - Testes enzimáticos positivos e negativos para a produção de xilanases.

Fonte: Autor, 2022.

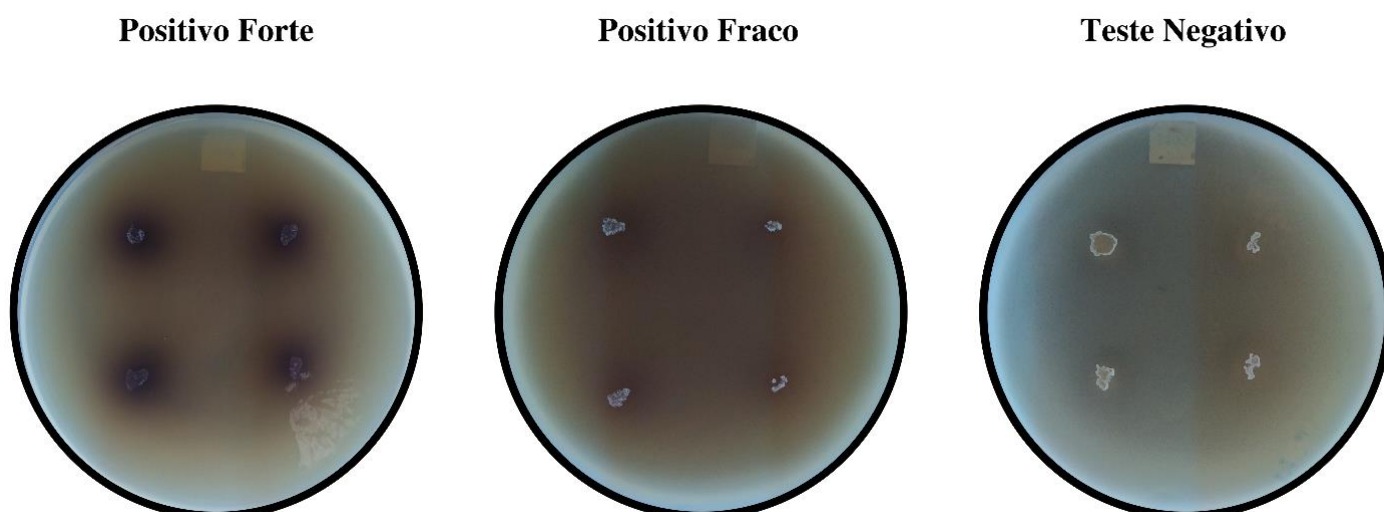
4.8.7 Atividade de Lacases

Para que houvesse a análise da capacidade das bactérias deste estudo produzirem lacases foi realizado uma metodologia puramente qualitativa adaptada de (LU *et al.*, 2013) na qual as cepas foram inoculadas em *spots* em Meio Guaiacol ajustado a pH 7,0 (Tabela 11) e as placas foram incubadas em B.O.D. a 28±2°C por 5~7 dias. Passado o período de incubação foi possível observar a formação de uma pigmentação laranja-amarronzada ao redor das colônias produtoras de lacases, sendo que as cepas foram classificadas como produtoras fortes, produtoras fracas e não produtoras (Figura 23). Cada cepa foi avaliada em quadruplicata por ensaio e pelo menos dois ensaios foram realizados por cepa, onde ensaios adicionais eram realizados quando eram obtidos dados discrepantes ou incompletos.

Tabela 10 – Formulação do Meio Guaiacol (Luria-Bertani + Guaiacol)

Meio Guaiacol – pH 7,0	
NaCl	5g
Extrato de Levedura	5g
Peptona	10g
Guaiacol 99+%	~200µL
Ágar	15g
Água Destilada	~1000mL

Fonte: LU *et al.*, 2013.

Figura 24 – Testes enzimáticos positivo forte, positivo fraco e negativo para a produção de lacases.

Fonte: Autor, 2022.

4.9 Ensaio Proteolítico Quantitativo

4.9.1 Cultivo em Meio Líquido

Após a realização do *screening* semiquantitativo de enzimas com potencial proteolítico descrito anteriormente, foram selecionadas as dez cepas com maior potencial produtor, de acordo com seus respectivos índices enzimáticos, para a realização do ensaio proteolítico quantitativo. As dez cepas foram inoculadas em tubos rosqueados contendo caldo SM + 2% de Frutose, conforme descrito por Fernandez, Ramachandran & Nallakumar (2018) e foram incubados por um período de 5 dias a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ sob agitação constante de 150rpm.

4.9.2 Preparo de Amostras

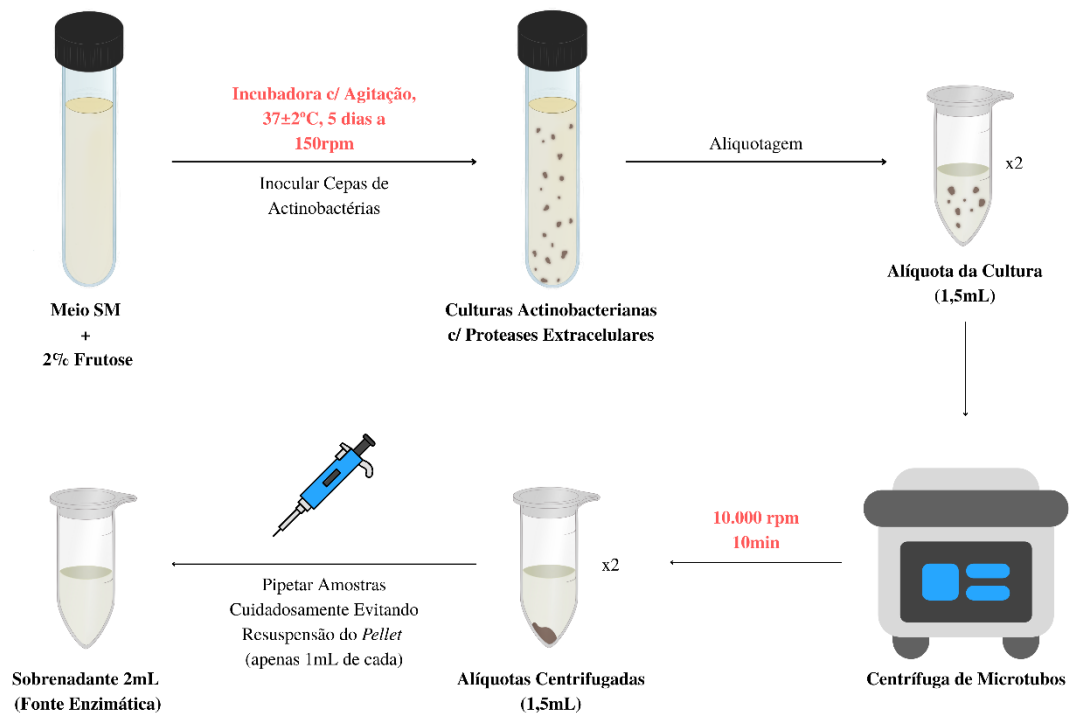
Passado o período de incubação, os caldos foram homogeneizados em Agitador de Tubos Vortex e duas alíquotas de 1,5mL do meio de cultivo de cada cepa foram postos em

microtubos. Os microtubos foram centrifugados a 10.000rpm por 10 minutos e 1mL dos sobrenadantes das alíquotas de cada cepa foram unidos em um terceiro microtubo, cujo material foi utilizado para os ensaios seguintes (Figura 25).

4.9.3 Quantificação Proteica

Para a determinação da concentração proteica nos sobrenadantes foi utilizado o método de Bradford (GREENFIELD, 2018), que utilizou albumina sérica bovina para o preparo da curva padrão. Em tubos de ensaio foram adicionados 100 μ L de sobrenadante, em duplicata, 2,5mL do Reagente de Bradford e essa solução foi levemente agitada e deixada agir por 10 minutos. Passado esse período, as soluções foram analisadas em espectrofotômetro a 595nm (Figura 26), zerado com água, e suas respectivas absorbâncias foram registradas e suas concentrações proteicas foram calculadas de acordo com a curva padrão.

Figura 25 – Esquema de preparo de amostras para o ensaio proteolítico



Fonte: Autor, 2022.

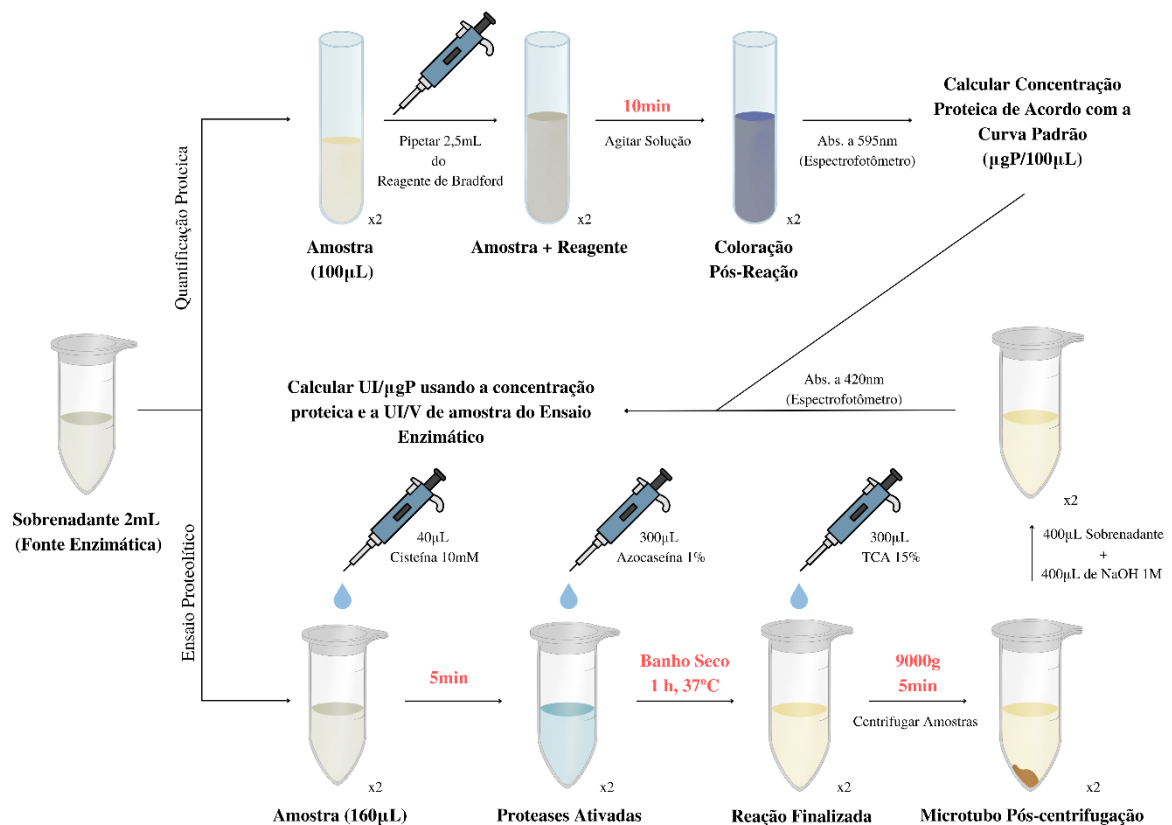
4.9.4 Ensaio Proteolítico com Azocaseína

O ensaio proteolítico foi adaptado de Oliveira *et al.* (2023). Primeiramente, o substrato

para a reação (Azocaseína 1% em Tris-HCL 50mM pH7,0) e um ativador enzimático (L-Cisteína 10mM) foram preparados. Para o ensaio, microtubos *ependorf* foram acrescidos 160 μ L de cada amostra e 40 μ L da solução de L-Cisteína 10mM (em duplicata), essas soluções foram levemente homogeneizadas e deixadas agir por 5min. Passado o período de ativação foram adicionados 300 μ L da solução de Azocaseína 1%, rapidamente e ordenadamente, e os microtubos foram transferidos para um banho seco a 37°C, onde a reação foi cronometrada por um período de 1 hora. Terminado este período, a reação foi finalizada utilizando 200 μ L de TCA 15% (Ácido Tricloroacético). Os microtubos foram centrifugados a 5000g por 5min e uma solução utilizando 400 μ L de sobrenadante e 400 μ L de NaOH 1M foi preparada. Essa solução foi utilizada para a leitura em espectrofotômetro a 420nm (Figura 26), previamente zerado com água e o branco (meio não inoculado que passou pelos mesmos processos que as amostras).

O cálculo da atividade enzimática foi dado conforme Oliveira *et al.* (2023), um aumento de 0,01 na absorbância indica 1 UI (Unidade de Atividade Enzimática) para o volume utilizado na amostra (160 μ L). Os dados de UI/Volume da Amostra foram então cruzados com os dados das concentrações protéicas e dados de UI/ μ gP foram obtidos.

Figura 26 – Esquema metodológico de quantificação proteica e ensaio proteolítico.



Fonte: Autor, 2022.

4.10 Análises Estatísticas

Os resultados obtidos foram analisados por meio de Teste de ANOVA a partir do programa Graphpad Prism 9 para avaliação da diferenciação entre os resultados e médias dos resultados, e testes de Brown-Forsythe para avaliação da diferenciação dos desvios padrões dos resultados. Além disso foi realizado uma análise de agrupamento multivariado a partir do programa Past 4.03 utilizando escala euclidiana.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Isolados Actinobacterianos

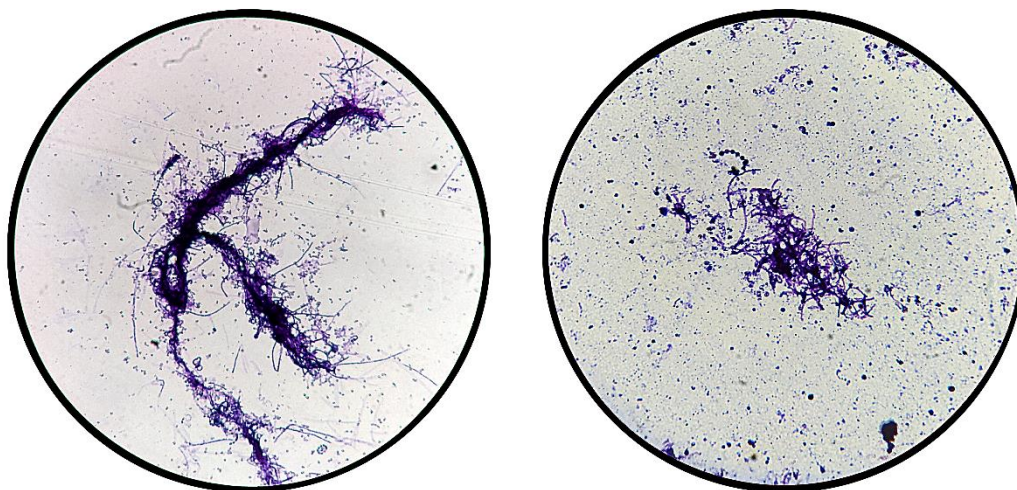
Um total de 45 isolados de 347 foram selecionados para a realização dos experimentos seguintes. Destes isolados, 15 eram provenientes de cada tipo de uso da terra: Agricultura, Secundária e Preservada/Conservada.

5.2 Coloração de Gram

Embora actinobactérias sejam microrganismos Gram-positivos filamentosos, existe uma certa dificuldade na diferenciação dos resultados da coloração de Gram por essas cepas. Grande parte disso devido a uma camada monodérmica externa à parede celular que está presente na maior parte das classes de actinobactérias e é rica em peptidoglicano, o que faz a coloração de Gram não ser um método totalmente confiável para esse filo de bactérias (RAHLWES; SPARKS; MORITA, 2019).

Alguns exemplos de resultados obtidos através da técnica de coloração de Gram para resultados Gram-positivos podem ser observados na Figura 27.

Figura 27 – Exemplos de resultados positivos para a Coloração de Gram.



Fonte: Autor, 2022.

5.3 Caracterização Cultural

A coloração presente nas culturas de actinobactérias muitas vezes é resultado da produção, ou não produção, de determinados compostos químicos de natureza pigmentada que podem fixar mais facilmente em componentes celulares actinobacterianos (pigmentos hidrofóbicos) ou se dispersarem no meio (pigmentos hidrofílicos) (LI *et al.*, 2016), acarretando

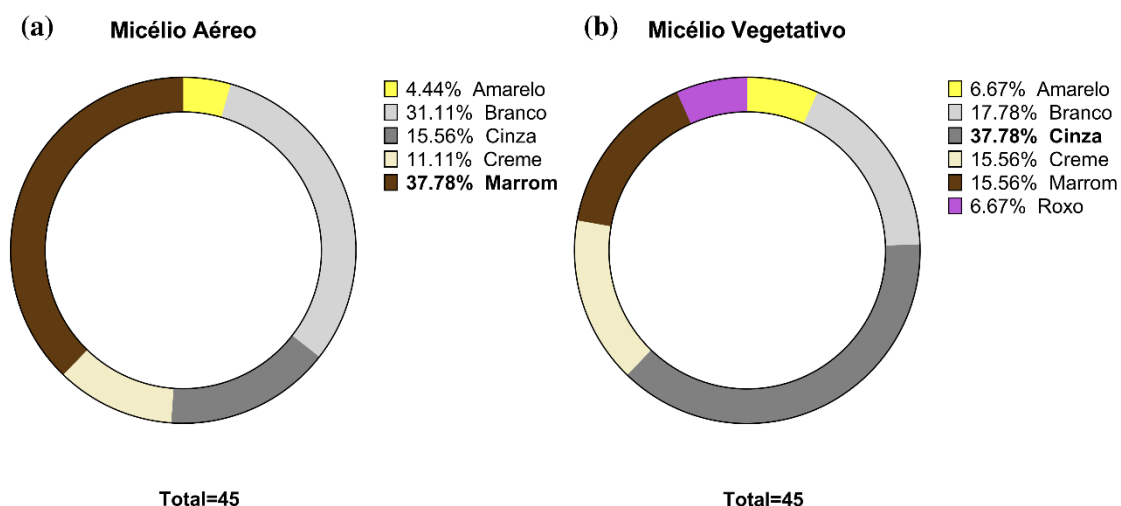
no desenvolvimento das características coloniais observadas. Segundo Shouches e Bhati (2019), as colorações de micélios podem variar entre grupos de cor branca, calcário, cinza, creme, marrom, rosa, violeta, amarelo e laranja, além de outras.

Uma das principais formas de agrupar diferentes isolados de actinobactérias se dá pela formação de grupos de acordo com o tipo de pigmentação apresentada em seus micélios, conforme recomendado pelo *International Streptomyces Project* (Oskay, 2009; Fitri *et al.*, 2021), sendo um dos muitos métodos de classificações utilizados em estudos de caracterização morfológica de actinobactérias. Contudo, esses dados não devem utilizados como determinísticos na classificação de tipos actinobacterianos (BARKA *et al.*, 2016).

A coloração dos micélios foi avaliada conforme RAL *Color Charts* e os resultados podem ser encontrados na Tabela do Anexo A, enquanto as fotografias individuais de ambos micélios de cada cepa podem ser encontradas, respectivamente, nos Anexo B e Anexo C.

Para a avaliação da diversidade das cepas de actinobactérias de maneira conjunta foi realizado uma simplificação do sistema RAL em cores básicas onde se encontraram as proporções cromogênicas por tipo de micélio das cepas, descritas no Gráfico 1.

Gráfico 1 – Diversidade cromogênica das cepas de estudo em relação a seus micélios aéreo (a) e vegetativo (b)



Fonte: Autor, 2022.

Nos micélios aéreos a coloração marrom mostrou-se dominante, com uma proporção de 37,78% do total e a coloração branca com uma proporção muito próxima: 31,11% do total. Já o micélio vegetativo apresentou a cor cinza como dominante, também com 37,78% do total de cepas. Esses dados são condizentes com outros estudos de caracterização cromogênica já

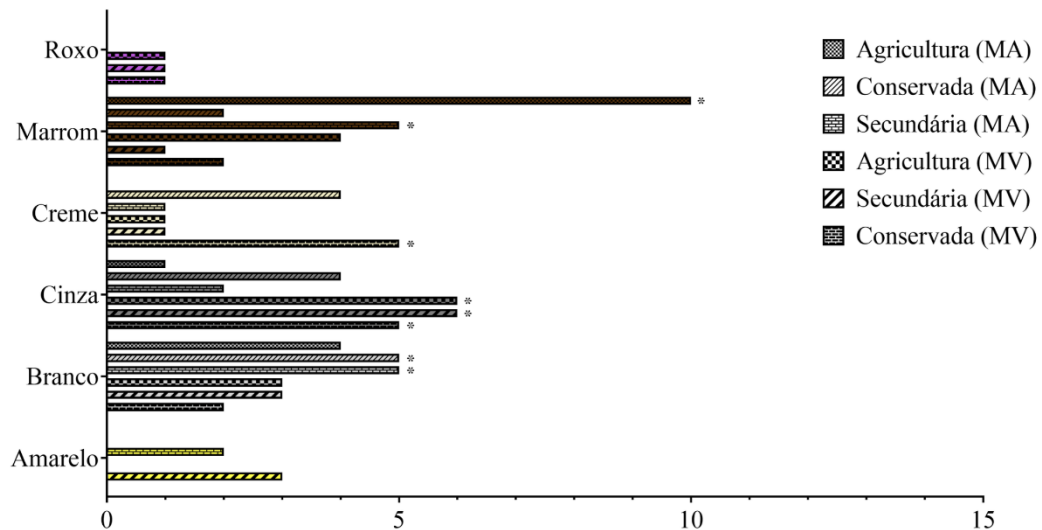
realizados em cepas de actinobactérias de regiões semiáridas, que indicam o predomínio das colorações branco, cinza e marrom tanto nos micélios aéreos quanto vegetativos (LIMA *et al.*, 2017; SANTOS *et al.*, 2019; SILVA *et al.*, 2019).

5.4 Características Micromorfológicas

A metodologia utilizada no presente estudo, denominada microcultivo, já foi previamente utilizada em outras pesquisas para avaliação morfológica de actinobactérias de zonas semiáridas (LIMA *et al.*, 2017; SANTOS *et al.*, 2019) e segundo esses autores os dados obtidos através dessa técnica são condizentes com os dados de sequenciamento genômico.

As características microscópicas apresentadas por actinobactérias, sobretudo de seus micélios reprodutivos, ou micélios portadores de esporos, são capazes de nos trazer dados relevantes à classificação taxonômica a nível de gênero (BARKA *et al.*, 2016). Essas características são: número de esporos por cadeia, comprimento e posição da cadeia de esporos, forma, estruturas e coloração dos esporos (AMARESAN *et al.*, 2020).

Gráfico 2 – Distribuição da coloração de micélios aéreos (MA) e micélios vegetativos (MV) de acordo com o uso de terra do local de coleta dos isolados.



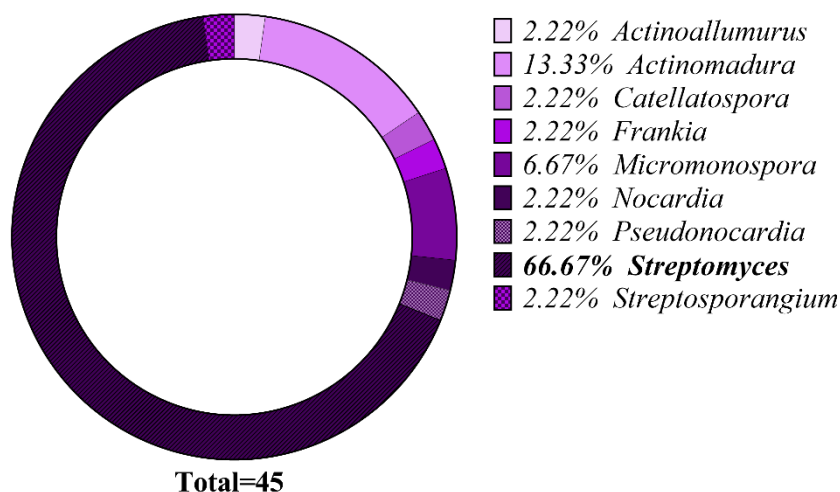
(*) Valores de abundância mais altos por uso da terra.

Fonte: Autor, 2022.

Após a análise das características acima citadas e o cruzamento dos dados obtidos (Anexo E) com os esquemas disponíveis nos livros *Atlas of Actinomycetes* (1997) e *Beneficial Microbes in Agroecology: Bacteria and Fungi* (2020) e com os registros fotográficos de microscopia óptica e eletrônica disponíveis no *Digital Atlas of Actinomycetes 2*, foi possível

chegar aos resultados descritos no Gráfico 3. Onde é possível observar um total de 9 prováveis gêneros, com maior predominância do gênero *Streptomyces* em detrimento dos demais (66,67%).

Gráfico 3 – Proporção de prováveis gêneros de cepas de actinobactérias

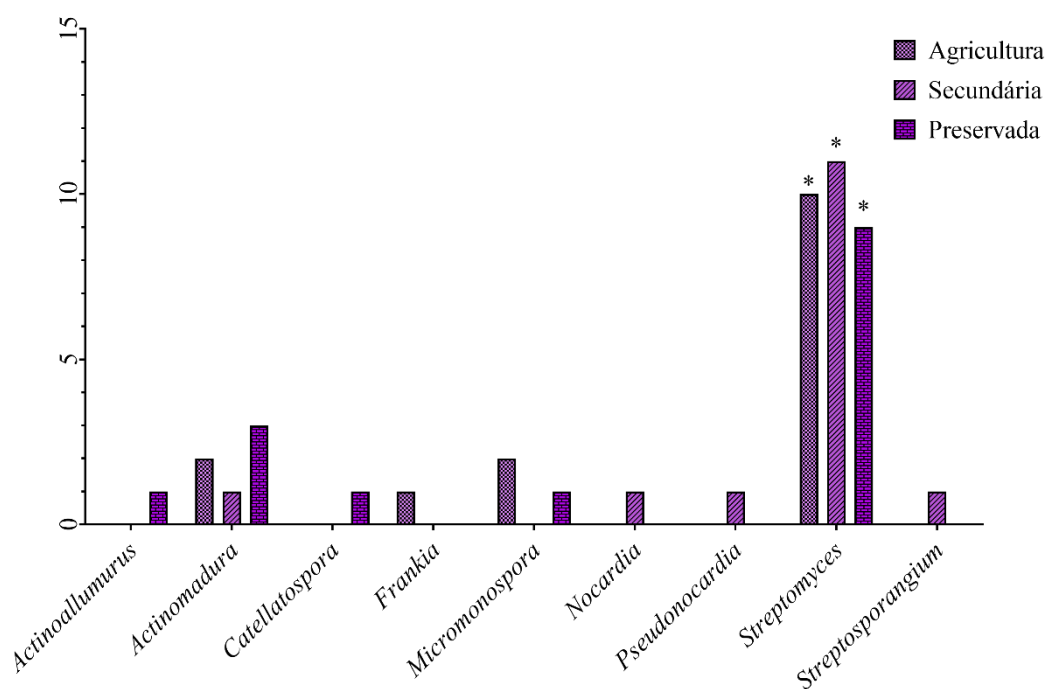


Fonte: Autor, 2022.

Esse resultado coincide com muitos outros estudos que indicam a distribuição abrangente do gênero *Streptomyces* em diversos habitats: como mangues (LI *et al.*, 2019), regiões florestais (SHARMA; THAKUR, 2020) e regiões semiáridas (GASMI *et al.*, 2019; PARIHAR *et al.*, 2022). Esse fator pode ser justificada pelo seu padrão de esporulação abundante e altamente dispersivo (DHARMARAJ *et al.*, 2010) além de seu genoma robusto com inúmeros *clusters* biossintéticos capazes de codificar enzimas de natureza diversa e multifuncional (LI *et al.*, 2019), tornando-os capaz de competir e sobreviver até mesmo em ambientes com baixa disponibilidades de nutrientes e numerosos estresses abióticos, o que justifica a importância desse táxon como colonizadores primários em ambientes extremos (ARAUJO *et al.*, 2020), conforme o caso da região semiárida brasileira.

No Gráfico 4 podem ser observados os valores absolutos da quantidade de cepas por prováveis gêneros de acordo com os respectivos usos das terras dos seus locais de isolamento. É notável como a abundância do gênero *Streptomyces* é majoritariamente superior em todos os três casos, o que fortifica e reitera a afirmações de ampla distribuição desse gênero nos mais diversos habitats.

Gráfico 4 – Distribuição dos prováveis gêneros de actinobactérias de acordo com o uso da terra dos seus locais de coleta



(*) Valores de abundância mais altos por uso da terra.

Fonte: Autor, 2022.

5.5 Microscopia Eletrônica de Varredura

Os resultados obtidos corroboram com o encontrado nos dados de microscopia óptica e podem ser encontrados abaixo, nas Figura 28, referente às imagens de microscopia eletrônica de varredura das cepas: SN34 (28.a; 28.b; 28.c), SN 35 (28.d; 28.e; 28.f) e SN44 (28.g; 28.h; 28.i). Há um enrugamento das paredes celulares bacterianas das cepas, o que aponta para a necessidade e protocolos de fixação nas próximas avaliações.

5.6 Atividade Enzimática

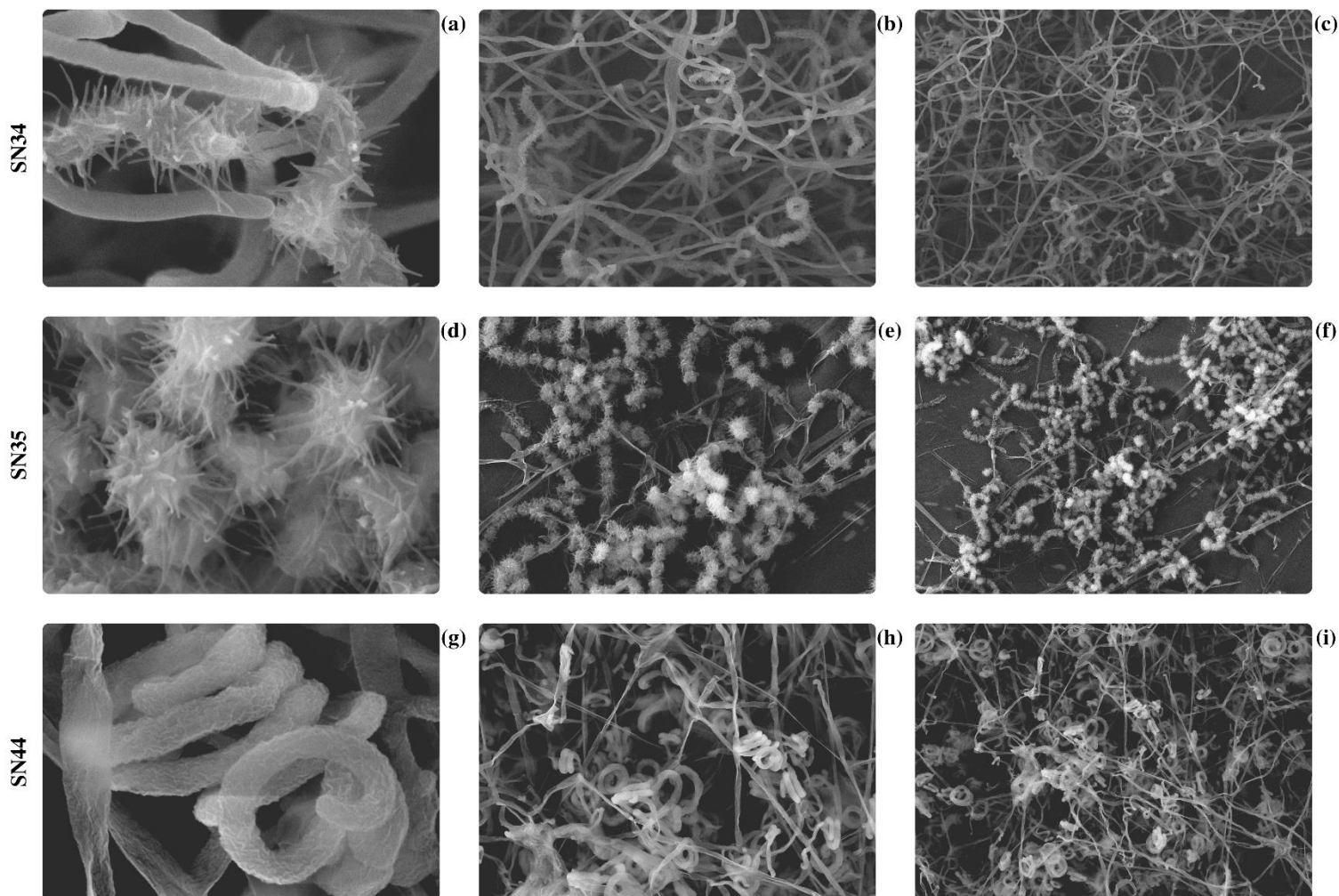
5.6.1 Atividade Amilolítica

A produção de enzimas amilolíticas extracelulares por actinobactérias do solo está intimamente ligada com a capacidade que esses procariotos possuem em metabolizar matéria orgânica complexa depositada em ambientes diversos (ETHICA *et al.*, 2018), como é o caso deste heteropolissacarídeo de glicose.

A avaliação da atividade amilolítica das cepas foi realizada por meio da visualização do halo de hidrólise apresentado no meio de cultivo integrado do substrato desta enzima (Meio Amido) após a adição da solução de lugol, conforme descrito na Figura 18. O cálculo do índice

enzimático levou em consideração os diâmetros da colônia e halo de hidrólise em cada uma das oito replicatas e os dados foram plotados no programa *Graphpad Prism 9*. A representação gráfica dos resultados obtidos a partir das cepas produtoras de amilases pode ser observada no Gráfico 5.

Figura 28 – Capturas das imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) para as cepas SN34, SN35 e SN44 sob *Working Distance* e *Horizontal Field Width* de: 5,92 μ m (70.000x),



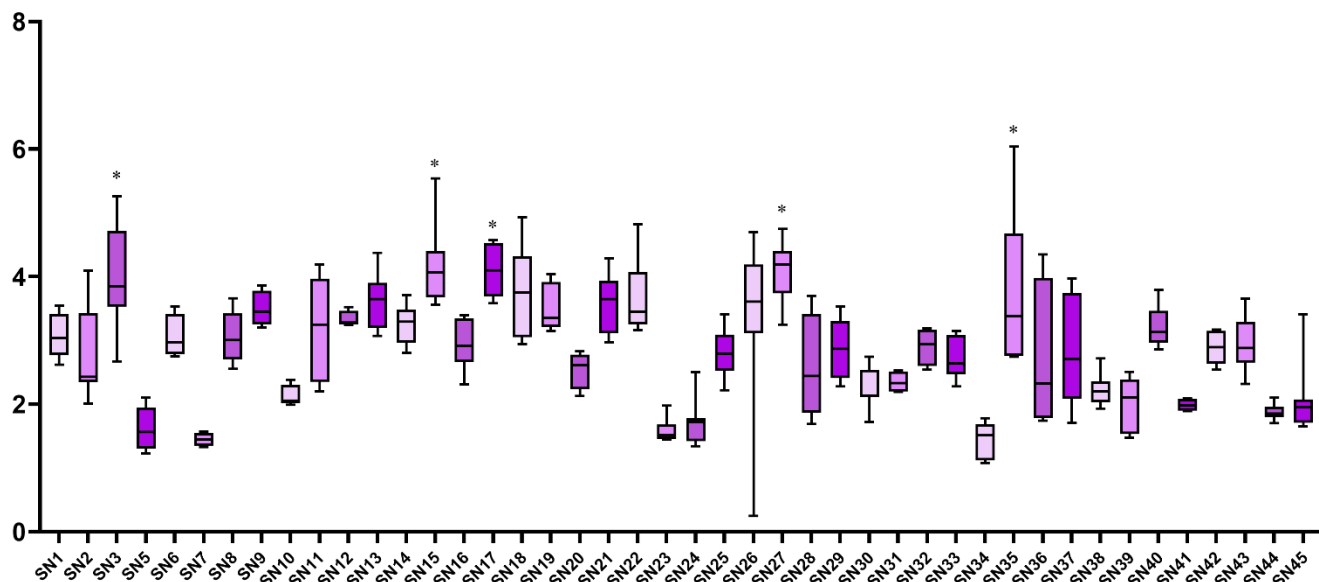
41,4 μ m (10.000x) e 82,9 μ m (5.000x).

Fonte: Autor, 2022.

Das 45 cepas avaliadas, 97,78% foram capazes de efetivamente produzir enzimas amilolíticas extracelulares. Nas 44 cepas avaliadas positivamente para a produção de amilases foi possível avaliar por meio do teste de ANOVA que houve variações significativas em seus índices enzimáticos médios (IEMs) com $p < 0,05$, onde o menor valor de IEM encontrado foi

igual a 1,433(SN34) e os cinco maiores: 3,771 (SN35), 3,984 (SN3), 4,095 (SN17) 4,104 (SN27) e 4,171 (SN15).

Gráfico 5 – Box plot com os resultados dos cálculos de índices enzimáticos (IEs) de cepas produtoras de amilase



(*) Cepas com maiores médias de IE

Fonte: Autor, 2022.

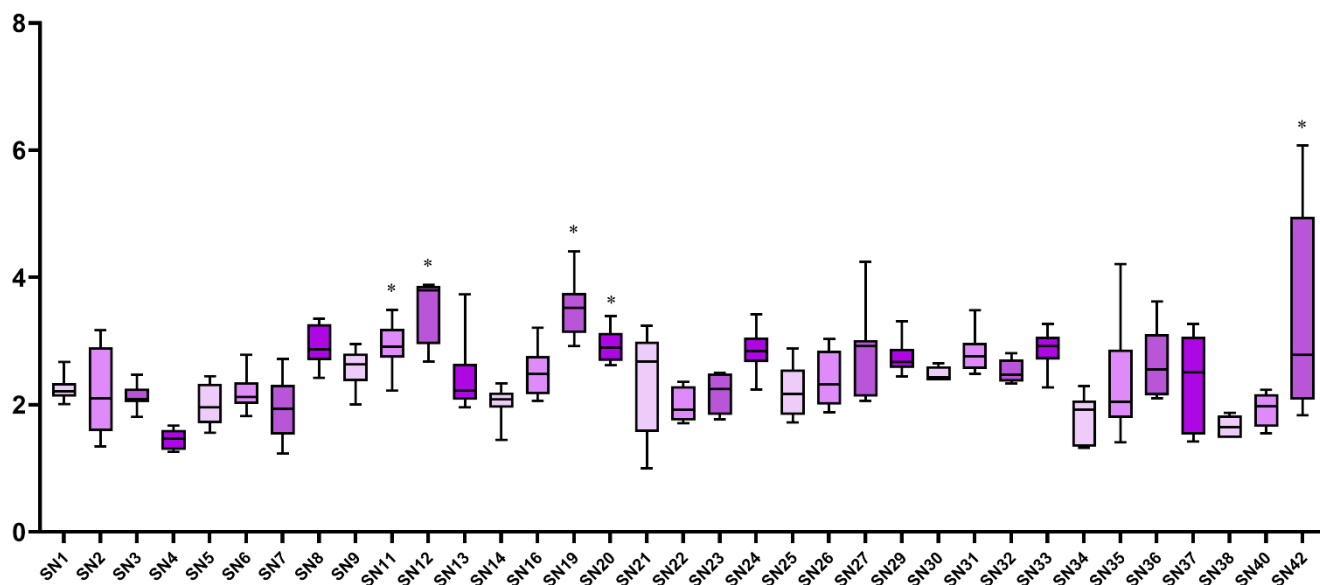
Esses resultados obtidos são condizentes com outros estudos envolvendo o *screening* de amilases actinobacterianas, que encontraram altas proporções de cepas produtoras dentro da amostra de pesquisa, como Hamedi, Kafshnouchi & Ranjbaran (2019) que determinaram que uma proporção de 90,78% de actinobactérias isoladas de cavernas do Irã eram capazes produzir amilases extracelulares, ou Alves *et al.* (2016) que avaliaram a capacidade produtora de 39 isolados actinobacterianos oriundas do solo da Caatinga e determinaram que 36 destes (92,3%) eram capazes de produzir essas enzimas. Outros estudos demonstram a aplicabilidade de actinobactérias de zonas semiáridas brasileiras para produção de amilases com utilização de resíduos agroindustriais como fonte de carbono suplementes (SANTOS *et al.*, 2012).

5.6.2 Atividade Celulolítica

A avaliação da atividade celulolítica das cepas foi realizada por meio da visualização do halo de hidrólise apresentado no meio de cultivo integrado do substrato desta enzima (Meio CMC), após a adição das soluções de Vermelho Congo 0,5% por 15 minutos e NaCl 2M por 5 minutos, conforme descrito na Figura 19. O cálculo do índice enzimático levou em

consideração os diâmetros da colônia e halo de hidrólise em cada uma das oito replicatas e os dados foram plotados no programa *Graphpad Prism 9*. A representação gráfica dos resultados obtidos a partir das cepas produtoras de amilases pode ser observada no Gráfico 6.

Gráfico 6 – Box plot com os resultados dos cálculos de índices enzimáticos (IEs) de cepas produtoras de celulase



(*) Cepas com maiores médias de IE

Fonte: Autor, 2022.

Das 45 cepas avaliadas, 77,78% foram capazes de efetivamente produzir enzimas celulolíticas extracelulares. Nas 35 cepas avaliadas positivamente para a produção de celulases foi possível avaliar por meio do teste de ANOVA que houve variações significativas em seus índices enzimáticos médios (IEMs) com $p < 0,05$, onde o menor valor de IEM encontrado foi igual a 1,459 (SN4) e os cinco maiores: 2,926 (SN11), 2,938 (SN20), 3,383 (SN42) 3,511 (SN19) e 3,541 (SN12).

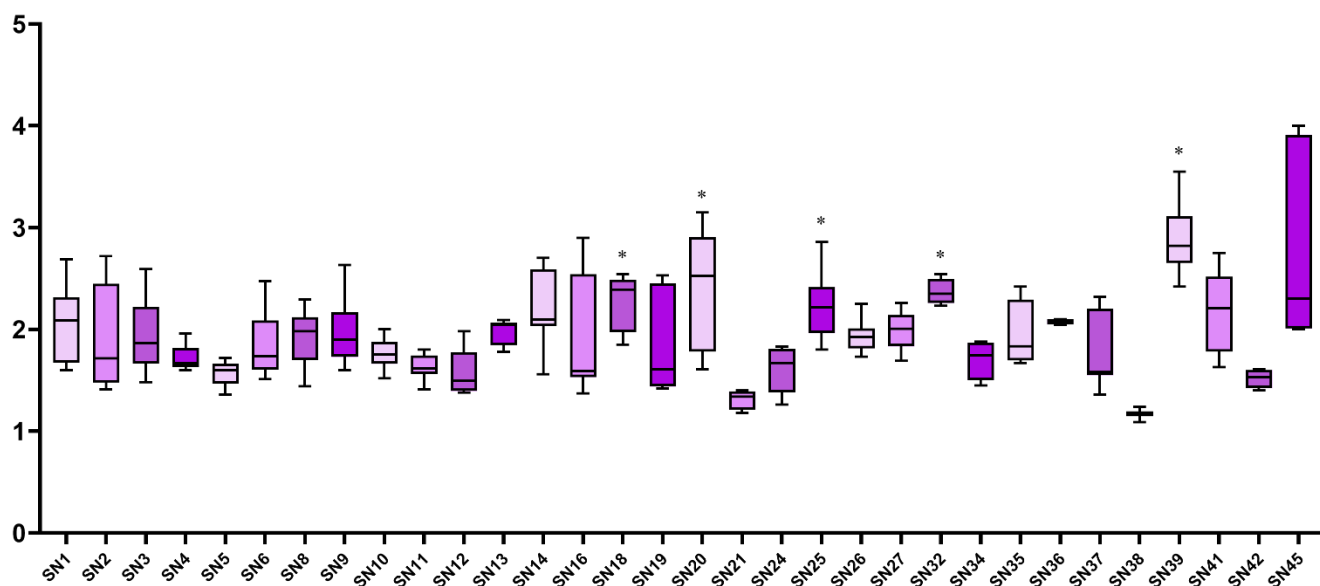
Os resultados obtidos neste estudo encontram similaridades e divergências em relação a outras pesquisas envolvendo o *screening* de actinobactérias celulolíticas de ambientes diversos. Daquiaoag & Penuliare (2021) denominaram que um percentual inferior a 50% das actinobactérias isoladas de um fragmento de área verde em zona verde urbana nas Filipinas foi capaz de produzir celulases, enquanto Castañeda-Cisneros *et al.* (2020) afirmaram que 100% das cepas isoladas a partir de solos de áreas de agricultura de uma faixa semiárida do México foram capazes de produzir celulases e Silva *et al.* (2015) reportaram uma proporção de 75%

das cepas isoladas no estudo a partir de solos do Parque Nacional de Ubajara foram capazes de produzir essas enzimas. Esses resultados discrepantes podem ser um indicativo da maior capacidade produtora de enzimas celulolíticas de actinobactérias advindas de regiões semiáridas como resposta à menor disponibilidade de fontes de carbono no solo e necessidade de competição.

5.6.3 Atividade Lipolítica

A avaliação da atividade lipolítica das cepas foi realizada por meio da visualização do halo de hidrólise apresentado no meio de cultivo integrado do substrato desta enzima (Meio Tween80), conforme descrito na Figura 20. O cálculo do índice enzimático levou em consideração os diâmetros da colônia e halo de hidrólise em cada uma das oito replicatas e os dados foram plotados no programa *Graphpad Prism 9*. A representação gráfica dos resultados obtidos a partir das cepas produtoras de amilases pode ser observada no Gráfico 7.

Gráfico 7 – Box plot com os resultados dos cálculos de índices enzimáticos (IEs) de cepas produtoras de lipase



(*) Cepas com maiores médias de IE

Fonte: Autor, 2022.

Das 45 cepas avaliadas, 71,11% foram capazes de efetivamente produzir enzimas lipolíticas extracelulares. Nas 32 cepas avaliadas positivamente para a produção de lipases foi possível avaliar por meio do teste de ANOVA que houve variações significativas em seus

índices enzimáticos médios (IEMs) com $p < 0,05$, onde o menor valor de IEM encontrado foi igual a 1,167 (SN38) e os cinco maiores: 2,232 (SN25), 2,259 (SN18), 2,368 (SN32) 2,418 (SN20) e 2,889 (SN39).

Romeu *et al.* (2021) concluíram que aproximadamente 73% das cepas de actinobactérias, também isoladas do PARNA Ubajara, eram capazes de produzir lipases e avaliou o efeito de gradiente de pH, salinidade e temperatura, reforçando a capacidade que essas enzimas actinobacterianas possuem em suportar fatores abióticos diversos, sobretudo salino. Resultados similares a estes também foram obtidos por González *et al.* (2020), onde uma cerca de 80% das cepas isoladas a partir de sedimentos marinhos da costa chilena foram capazes de produzir enzimas lipolíticas, e por Jeffrey (2008) que isolou um total de 62 cepas do solo de áreas de agricultura da Malásia, identificando que cerca de 75% destas actinobactérias possuíam potencial para a produção de lipases. Essa homogeneidade de múltiplos estudos aponta para a necessidade da utilização de fontes de carbono de natureza lipídica por esses microrganismos nos mais diversos habitats devido à alta proporção de produção e onipresença dessa enzima.

5.6.4 Atividade Pectinolítica

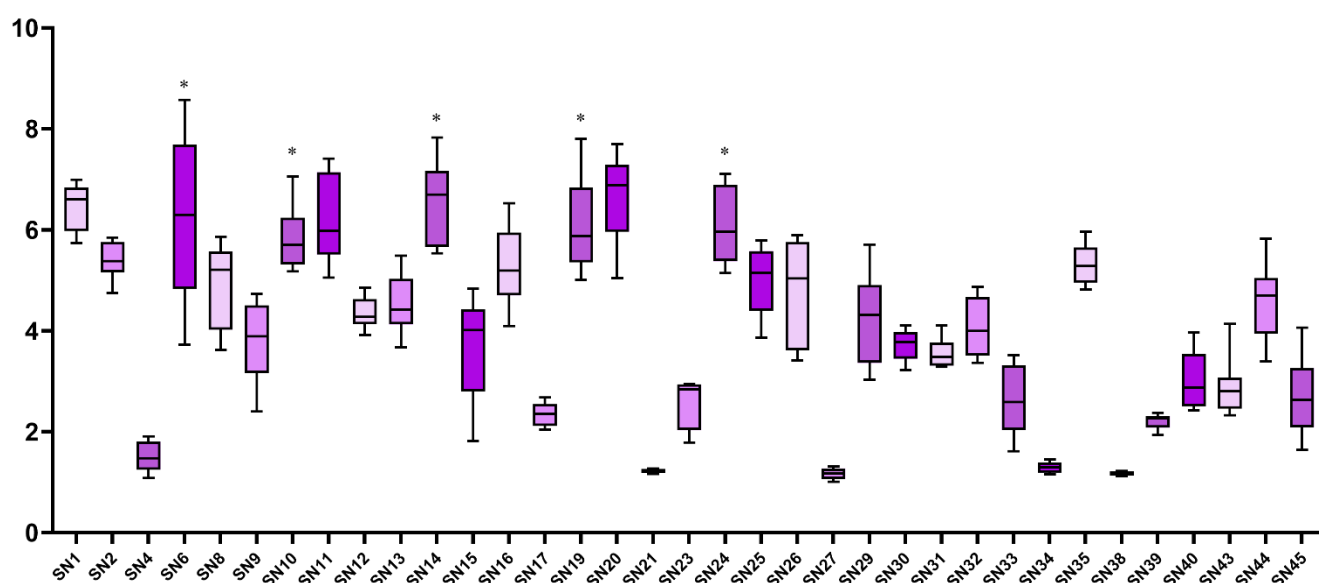
A avaliação da atividade pectinolítica das cepas foi realizada por meio da visualização do halo de hidrólise apresentado no meio de cultivo integrado do substrato desta enzima (Meio Pectina), após a adição da solução de lugol, conforme descrito na Figura 21. O cálculo do índice enzimático levou em consideração os diâmetros da colônia e halo de hidrólise em cada uma das oito replicatas e os dados foram plotados no programa *Graphpad Prism 9*. A representação gráfica dos resultados obtidos a partir das cepas produtoras de amilases pode ser observada no Gráfico 8.

Das 45 cepas avaliadas, 77,78% foram capazes de efetivamente produzir enzimas pectinolíticas extracelulares. Nas 35 cepas avaliadas positivamente para a produção de pectinases foi possível avaliar por meio do teste de ANOVA que houve variações significativas em seus índices enzimáticos médios (IEMs) com $p < 0,05$, onde o menor valor de IEM encontrado foi igual a 1,116 (SN27) e os cinco maiores: 5,812 (SN10), 6,071 (SN24), 6,107 (SN39) 6,247 (SN6) e 6,551 (SN14).

A habilidade de metabolização do ácido poligalacturônico (pectina) mostra-se muito diverso a depender do habitat. Estudos envolvendo 55 actinobactérias endofíticas isoladas de sementes de plantas de trigo apontaram nenhuma delas era capaz de produzir essas enzimas (SHARMA, 2022), um outro envolvendo 230 actinobactérias isoladas a partir do solo de áreas de cultivo de café encontrou que apenas 33,3% destas eram capazes de produzir pectinases

(SAMEERA; PRAKASH; NALINI, 2018) e, um último exemplo, traz o caso de actinobactérias isoladas a partir de solos de ecossistemas hipersalinos, onde todas as 31 cepas eram capazes de efetivamente produzir enzimas pectinolíticas (MENASRIA, 2022). Isso aponta uma proporção de produção de pectinases acima da média para o atual estudo e destaca o potencial singular de ambientes extremos para a bioprospecção dessa enzima tão importante do ponto de vista biotecnológico.

Gráfico 8 – Box plot com os resultados dos cálculos de índices enzimáticos (IEs) de cepas produtoras de pectinase



(*) Cepas com maiores médias de IE

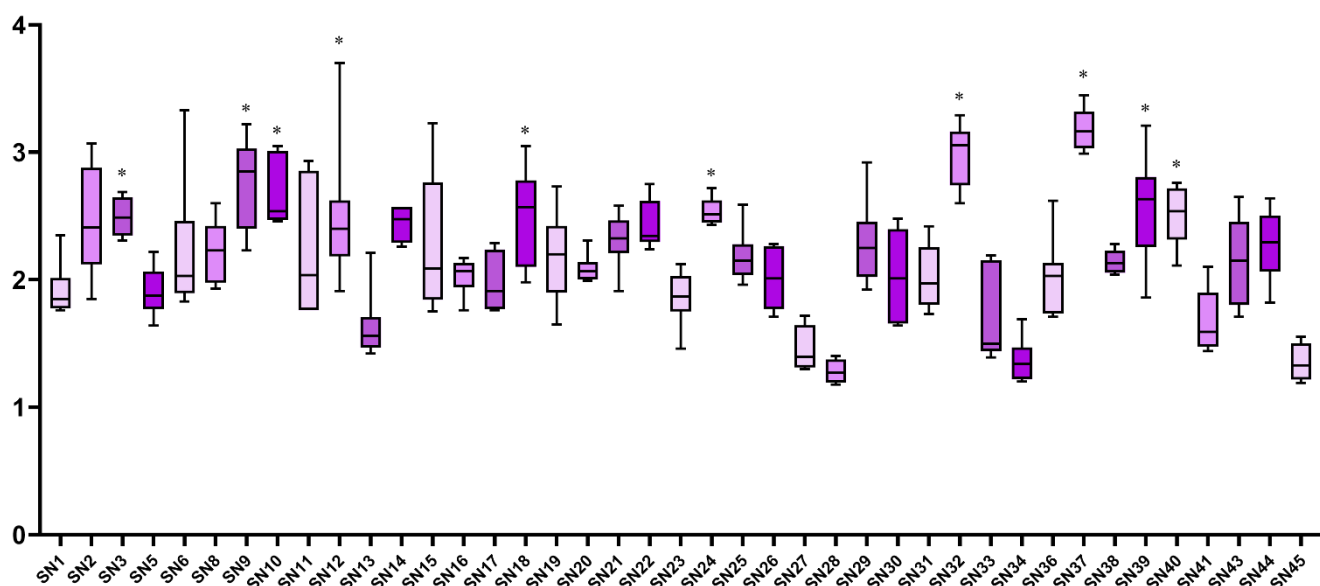
Fonte: Autor, 2022.

5.6.5 Atividade Proteolítica

5.6.5.1 Atividade Proteolítica Semiquantitativa

A avaliação da atividade proteolítica das cepas foi realizada por meio da visualização do halo de hidrólise apresentado no meio de cultivo integrado do substrato desta enzima (Meio SMA), conforme descrito na Figura 22. O cálculo do índice enzimático levou em consideração os diâmetros da colônia e halo de hidrólise em cada uma das oito replicatas e os dados foram plotados no programa *Graphpad Prism 9*. A representação gráfica dos resultados obtidos a partir das cepas produtoras de amilases pode ser observada no Gráfico 9.

Gráfico 9 – Box plot com os resultados dos cálculos de índices enzimáticos (IEs) de cepas produtoras de protease



(*) Cepas com maiores médias de IE

Fonte: Autor, 2022.

Das 45 cepas avaliadas, 91,11% foram capazes de efetivamente produzir enzimas proteolíticas extracelulares. Nas 41 cepas avaliadas positivamente para a produção de amilases foi possível avaliar por meio do teste de ANOVA que houveram variações significativas em seus índices enzimáticos médios (IEMs) com $p < 0,05$, onde o menor valor de IEM encontrado foi igual a 1,279 (SN28) e os dez maiores: 2,494 (SN3), 2,501 (SN12), 2,505 (SN18), 2,510 (SN40), 2,537 (SN24), 2,573 (SN39), 2,692 (SN10), 2,758 (SN9) 2,982 (SN32) e 3,185 (SN37).

Esses resultados apontam proporções levemente superiores a outros estudos envolvendo o isolamento de actinobactérias com potencial produtor de enzimas proteolíticas. Sameera, Prakash & Nalini (2018) demonstraram que 79,2% de suas cepas foram capazes de produzir proteases, enquanto Mensaria *et al.* (2022) evidenciam um total de 87,1% de suas bactérias filamentosas foram capazes de produzir enzimas proteolíticas e Sharma *et al.* (2022) demonstram que 80% de suas cepas também foram capazes de produzir essas enzimas. Estes dados, somados a estudos anteriores apontam para o potencial de actinobactérias isoladas de zonas semiáridas e de Mata Atlântica como fonte de peptidases de interesse industrial (SILVEIRA *et al.*, 2021; MATOS NETO *et al.*, 2022), apontam para a importância da exploração contínua de novas fontes de biomoléculas de interesse biotecnológico em regiões extremas.

Essas enzimas possuem importância sem igual dentro da biotecnologia branca, sendo o maior grupo de enzimas industriais, possuindo aproximadamente 60% do rendimento mundial do mercado de enzimas (MAMO; ASSEFA, 2018), portanto, foram realizadas avaliações adicionais de modo a qualificar o potencial das proteases das actinobactérias deste estudo.

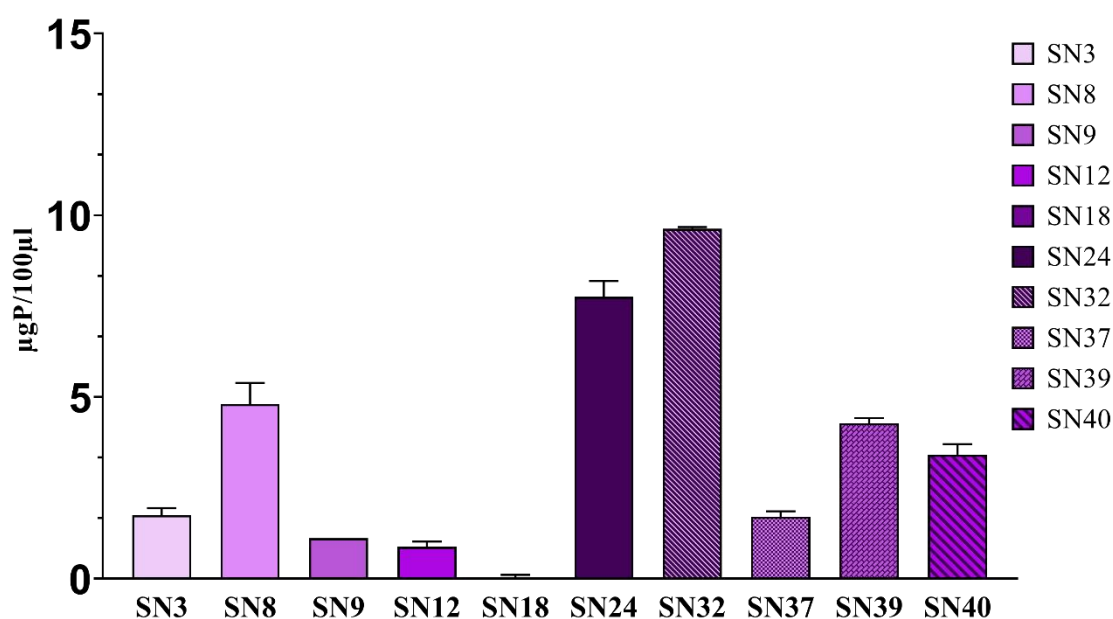
5.6.5.2 Atividade Proteolítica Quantitativa

Para o ensaio quantitativo, as 10 cepas com maiores IEM para proteases foram selecionadas para o cultivo em meio líquido para as etapas posteriores.

5.4.5.2.1 Quantificação Proteica

O método de Bradford (1976) para a quantificação proteica foi utilizado nesse estudo e as leituras foram realizadas em duplicata, contudo é importante ressaltar que o meio de cultura utilizado para o estímulo da produção de proteases pelas cepas para a realização do ensaio proteolítico quantitativo já possuía proteínas e era difícil de se calcular em qual grau as proteínas estavam sendo formadas pelas actinobactérias e em que grau as proteínas do meio de cultura estavam sendo degradadas. Esses percalços só poderão ser ultrapassados em estudos futuros envolvendo a purificação, mesmo que parcial, dessas enzimas. Os resultados para o método de Bradford podem ser encontrados no Gráfico 10.

Gráfico 10 – Concentração proteica do sobrenadante do meio de cultivo SMA, centrifugado 10000 rpm por 10min, após 5 dias de crescimento a 37°C

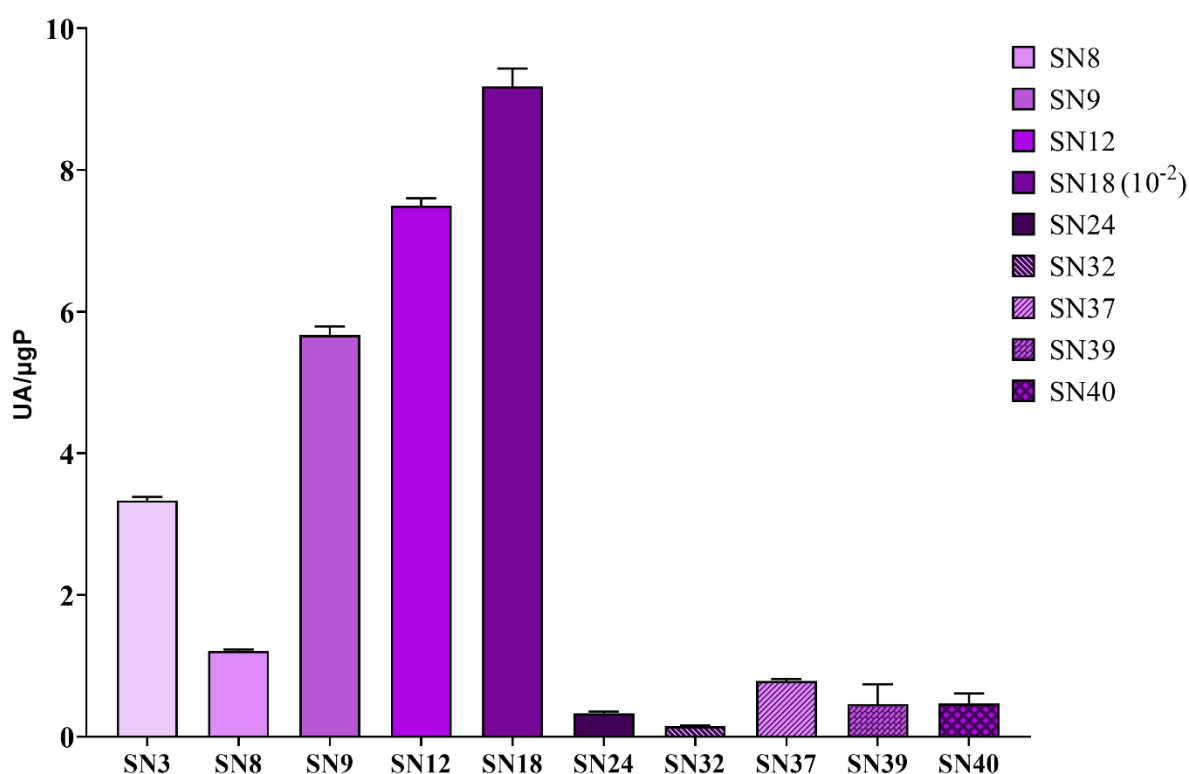


Fonte: Autor, 2022.

5.6.5.2.2 Ensaio Proteolítico

O método de quantificação da atividade proteolítica utilizado foi o da azocazeína, um substrato generalista para proteases de todas as classes de peptidases. A partir dos dados de absorbância ao final do ensaio, em duplicata, e cruzamento com os dados de concentração proteica foi possível observar os valores de atividade específica (UI/ μ gP) por cepa, que foram plotados no programa *Graphpad Prism 9* e o resultado pode ser encontrado no Gráfico 11.

Gráfico 11 – Resultado do cálculo da atividade específica das proteases em UI/ μ gP das 10 cepas utilizadas



* SN18: valor apresentado na diluição de 10^{-2} para se adequar à faixa do gráfico

Fonte: Autor, 2022.

Por meio do teste de ANOVA foi possível constatar variação significativa ($p < 0.05$) entre as médias do ensaio proteolítico quantitativo, com notável diferença entre a cepa SN18 e as demais, apresentando $918 \pm 25,2$ UI/mL, ao descartarmos a diluição (10^{-2}) apresentada no gráfico, uma atividade aproximadamente 100x maior atividade que o segundo maior produtor do ensaio e apresentando capacidade cerca de 50x maior que enzimas utilizadas em outros estudos (AL-DHABI, 2020). A alta atividade enzimática apresentada pelo conteúdo enzimático

não tratado secretado pela cepa SN18 denota um alto potencial aplicacional de um ponto de vista biotecnológico. Embora a elegibilidade dessa enzima para estudos posteriores seja inegável, é importante ressaltar que o cálculo de UI/ μgP leva em conta os valores de μg de proteína /mL obtidos através do método de quantificação proteica de Bradford, que só consegue detectar precisamente valores proteicos acima de $10\mu\text{g/mL}$, portanto, o valor de atividade enzimática obtidos para as cepas SN12 e SN18 pode conter um alto erro associado, uma vez que os cálculos apontaram concentrações de $8,7510\mu\text{g/mL}$ e $0,69\mu\text{g/mL}$, respectivamente, urgindo por testes mais sensíveis à baixas concentrações proteicas, como BCA, ou utilização de técnicas de concentração da amostra, como precipitação por $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Sulfato de Amônio), para que seja possível determinar corretamente o percentual de atividade enzimática do extrato enzimático.

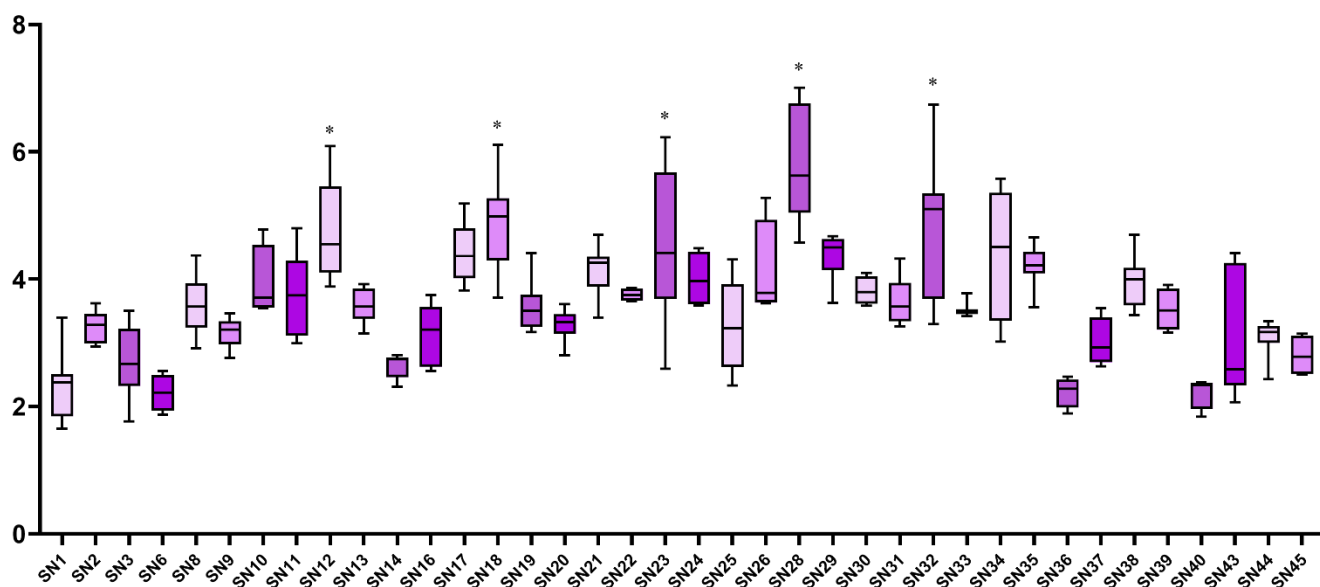
Os resultados de UI/ μgP obtidos no ensaio quantitativo se comportam de maneira diferente do analisado nos IEM do ensaio semiquantitativo. Este ocorrido pode ser resultado da discrepância de temperatura nos testes, uma vez que o *screening* inicial (semiquantitativo) levou em consideração o crescimento microbiano em temperaturas mais brandas (28°C) enquanto o protocolo de atividade enzimática da azocazeína era realizado a 37°C .

5.6.6 Atividade Xilanolítica

A avaliação da atividade xilanolítica das cepas foi realizada por meio da visualização do halo de hidrólise apresentado no meio de cultivo integrado do substrato desta enzima (Meio Pectina após a adição das soluções de Vermelho Congo 0,5% por 15 minutos e NaCl 2M por 5 minutos, conforme descrito na Figura 22). O cálculo do índice enzimático levou em consideração os diâmetros da colônia e halo de hidrólise em cada uma das oito replicatas e os dados foram plotados no programa *Graphpad Prism 9*. A representação gráfica dos resultados obtidos a partir das cepas produtoras de amilases pode ser observada no Gráfico 12.

Das 45 cepas avaliadas, 84,44% foram capazes de efetivamente produzir enzimas xilanolíticas extracelulares. Nas 38 cepas avaliadas positivamente para a produção de xilanases foi possível avaliar por meio do teste de ANOVA que houve variações significativas em seus índices enzimáticos médios (IEMs) com $p < 0,05$, onde o menor valor de IEM encontrado foi igual a 1,109 (SN38) e os cinco maiores: 4,494 (SN23), 4,738 (SN12), 4,808 (SN32) 4,905 (SN18) e 5,802 (SN28).

Gráfico 12 – Box plot com os resultados dos cálculos de índices enzimáticos (IEs) de cepas produtoras de xilanase



(*) Cepas com maiores médias de IE

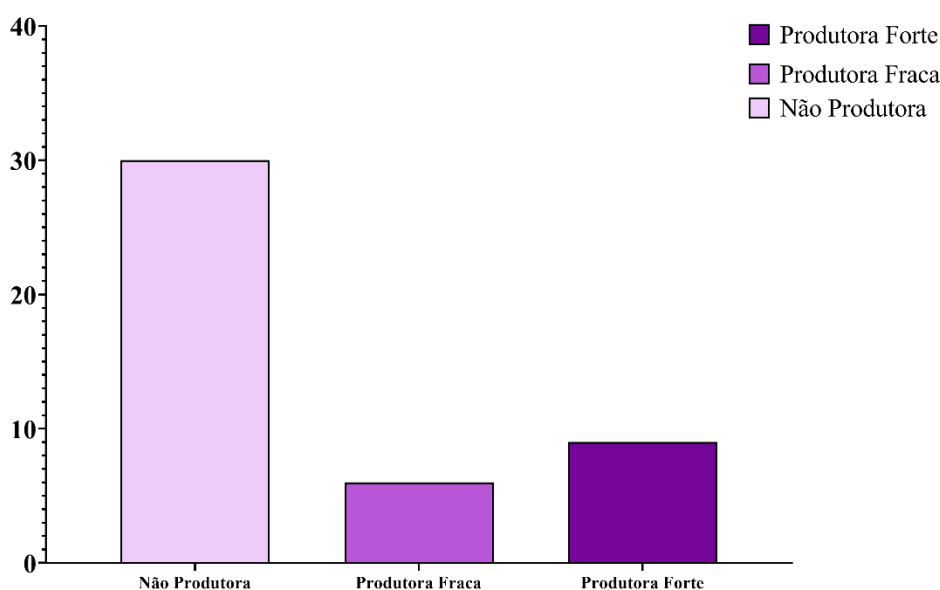
Fonte: Autor, 2022.

Os resultados apresentados no presente estudo corroboram com outros envolvendo o isolamento de actinobactérias com potencial xilanolítico a partir de áreas sob condições adversas. Castañeda-Cisneros *et al.* (2020) apontaram para uma proporção de 93,15% de uma amostra de 73 isolados de solos semiáridos sendo capazes de metabolizar xilanases nos seus estudos *in vitro*, enquanto Mensaria *et al.* (2022) indicaram que 100% de suas 31 cepas halófitas isoladas de ambientes hipersalinos eram capazes de produzir xilanases. Ao aliarmos esses resultados aos obtidos no atual estudo e comparamos com o perfil enzimático de actinobactérias provenientes de ambientes úmidos tropicais, como é o caso de Kumar *et al.* (2018), que conseguiram identificar apenas 21,5% de seus 28 isolados actinobacterianos, provenientes de amostras do solo de uma floresta na Índia, sendo capazes de produzir enzimas xilanolíticas, ou Putri & Setiawan (2019) que foram capazes de apontar uma proporção ainda menor, apenas de 14% de sua amostra de 57 cepas isoladas de uma área florestal da Indonésia sendo capazes de efetivamente produzir essas enzimas. Estes dados podem ser, mais uma vez, indicativo da necessidade de um aparato enzimático diverso e robusto para se poder competir e prosperar sob condições adversas, como é o caso do semiárido nordestino, e sustenta o discurso de necessidade de estudos para a bioprospecção de biomoléculas de interesse biotecnológico nessas áreas.

5.6.7 Atividade de Lacases

A avaliação da ação dessas oxirredutases foi observado através da visualização da mudança da coloração meio de cultura contendo guaiacol, um composto aromático altamente oxidável e que ao passar por esse processo apresenta uma coloração vermelho-amarronzado (GOTOTYA, 2021). O processo de graduação da intensidade da pigmentação formada ao redor das colônias bacterianas em meio suplementado com guaiacol (Figura 23) foi o único método de análise utilizado, sendo de natureza puramente qualitativa, mas que gera dados para futuros estudos envolvendo o estudo de lacases actinobacterianas a partir de solos da Caatinga. Os resultados obtidos foram agrupados e podem ser encontrados no Gráfico 13.

Gráfico 13 – Proporção de cepas não produtoras, produtoras fracas e produtoras fortes de lacases



Fonte: Autor, 2022.

Das 45 cepas avaliadas no estudo, apenas 33,3% foram capazes de efetivamente produzir lacases, também conhecidas como multicobre oxidases. Como foram utilizados apenas dados qualitativos para a avaliação, nenhum método estatístico foi realizado para o tratamento dos dados além da análise de agrupamento que será posteriormente apresentada.

A produção de lacases, mostra-se bem inferior proporcionalmente em relação às outras enzimas do estudo. Esse resultado pode ser devido a esta enzima conferir vantagem na competição interespecífica, mas não ser imprescindível à sobrevivência dessas cepas. Outros

estudos, contudo, mostram proporção de actinobactérias produtoras dessa enzima ainda menor, como é o caso de Medouni-haroune *et al.* (2017), que estudaram um total de 90 isolados actinobacterianos, e apenas 3 desses (3,3%) foram capazes de produzir essas oxirredutases.

O enfoque de produção lacases a partir de fontes microbianas atualmente tem maior direcionamento ao estudo dessas enzimas provenientes de fungos, uma vez que essas oxirredutases fúngicas tendem a um alto potencial redox (E^0), sendo altamente inespecíficas e, portanto, altamente aplicáveis de um ponto de vista biotecnológico (ARREGUI *et al.*, 2019). Contudo, é necessário salientar a necessidade de estudo de novas fontes de lacases, uma vez que as de origem fúngica possuem tendências exclusivamente mesofílicas (HAMOUDI *et al.*, 2021), o que pode ser problemático num contexto de aplicabilidade em geral. Actinobactérias mostram uma alternativa a essa tendência, uma vez que já foram isoladas lacases termostáveis de alto E^0 a partir desse filo (GOGOTYA *et al.*, 2021).

5.7 Potencial Biotecnológico das Cepas

Para a avaliação do potencial dessas cepas num contexto geral foi realizada uma análise de agrupamento em escala euclidiana utilizando o programa Past 4.03, onde todos os IEM de todos os ensaios e a presença de lacases, que foi ranqueada de 0 a 2 de acordo com o nível de presença destas encontrado no ensaio, foram plotados. Em paralelo, os dados foram categorizados da seguinte forma: a amplitude dos dados de IEM de cada ensaio enzimático foi calculada individualmente e dividida em tercís, o primeiro tercil foi classificado como Produtora Forte, o segundo tercil como Produtora Intermediária e o último tercil como Produtora Fraca. Nenhuma cepa produtora de lacase foi categorizada como fortemente produtora pela incapacidade de afirmação disso num contexto generalizado. Com os resultados da categorização de dados, os valores foram plotados de acordo com a categorização e um heatmap foi criado e unido ao dendrograma obtido por meio da análise de agrupamento previamente descrita (Gráfico 13).

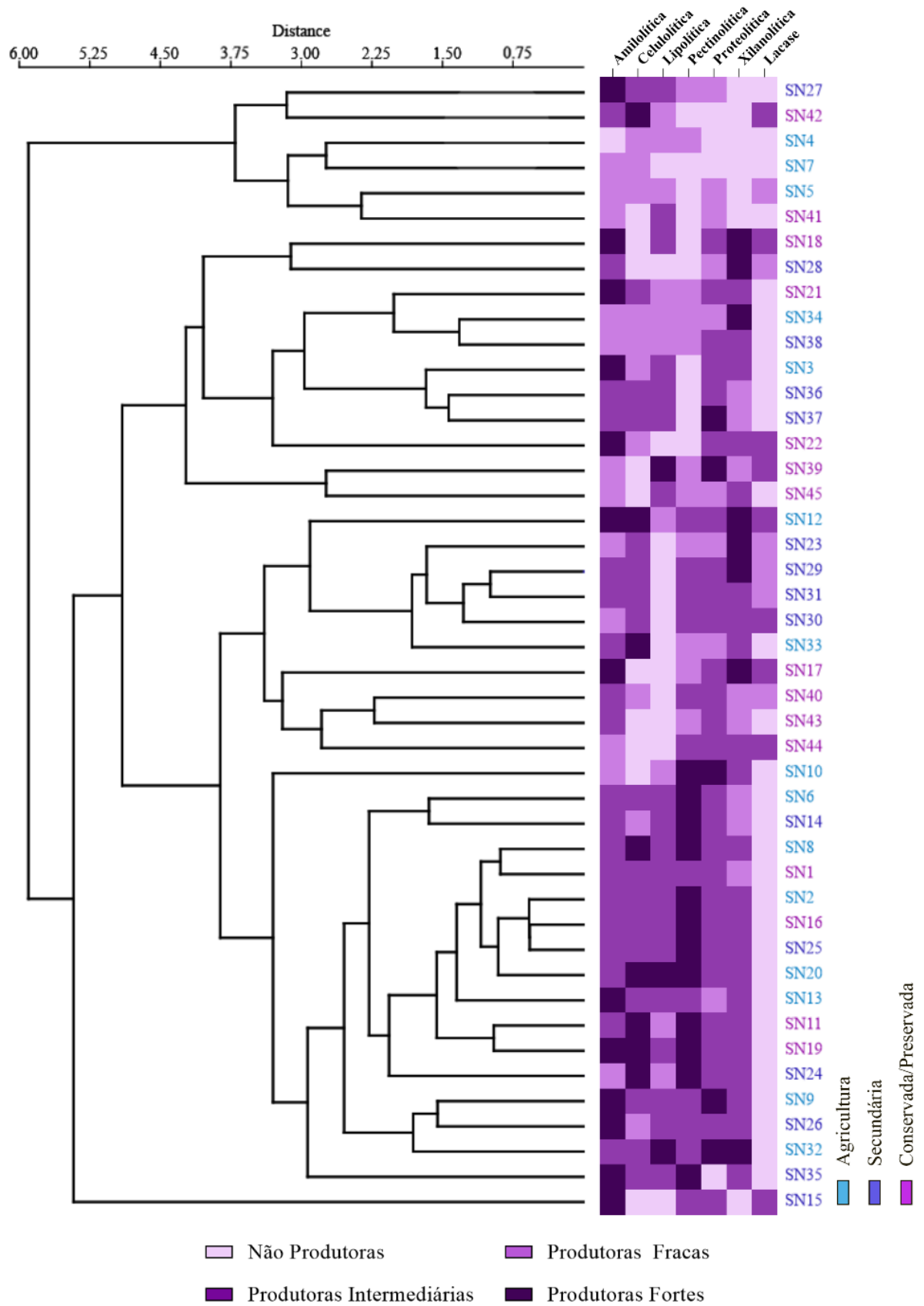
É notável a capacidade que cepas advindas de solos que passaram pelos mesmos processos de uso da terra possuem em se agrupar no gráfico. Isso denota, mesmo que sutilmente, um padrão de perfis enzimáticos por áreas com mesmos usos da terra.

Conforme é observável no Gráfico, as cepas SN12, SN19, SN20 e SN32 possuem o maior número de atividades enzimáticas fortes dentre todas as outras, totalizando três altas atividades dentre todos os ensaios realizados, logo em seguida temos as cepas SN08, SN09, SN10, SN11, SN17, SN18, SN24, SN35 e SN39 com duas altas atividades dentre todos os ensaios realizados. Isso aponta não apenas o intenso e amplo potencial biotecnológico de cepas

de actinobactérias isoladas destas áreas, mas também nos traz dados acerca do potencial de cepas sob diferentes condições de usos da terra. Uma vez que aproximadamente 46% das cepas com maior potencial produtor foram isoladas a partir de solos de agricultura, apontado para a necessidade ainda maior de metabolização sob tais condições, que reduzem a disponibilidade de carbono orgânico e nutrientes no solo (MCLAUHLAN, 2006). Contudo as cepas SN4 e SN7, também advindas de regiões de agricultura, apresentaram o perfil de produção enzimático mais escasso da amostra, denotando que esses dados podem ser heterogêneos mesmo dentro de uma mesma área.

Dentre todos as cepas de actinobactérias, a grande maioria apresenta alto e/ou múltiplo potencial de aplicação nas mais diversas áreas da biotecnologia. Cepas como a SN20, que possuem alta capacidade de metabolização de celulases, xilanases (hemicelulases) e pectinases possuem alta possibilidade de atuarem como agentes facilitadores da colonização de raízes de plantas por rizóbios, sendo potenciais candidatos à produção de bioinoculantes (MESQUITA *et al.*, 2022). Enquanto cepas como a SN12 que possui um amplo espectro de atividade enzimática, majoritariamente intermediário e alto, possuem capacidade de serem aplicados na remediação de zonas poluídas com diferentes tipos de poluentes ou no tratamento de efluentes industriais.

Gráfico 14 – Heatmap unido ao dendrograma para todas as atividades enzimáticas



Fonte: Autor, 2022.

6 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS

Dentre as 45 cepas de estudo, todas foram capazes de produzir, mesmo que a baixos níveis, ao menos uma enzima de interesse biotecnológico prospectadas. Das cepas com maior capacidade produtora, destacam-se as cepas SN12, SN19, SN20 e SN32. Destas, a cepa SN12 possui um alto potencial de aplicação na indústria, no tratamento de efluentes complexos e na biorremediação de áreas poluídas por conta do seu perfil enzimático diverso e proeminente, uma vez que foi capaz de efetivamente sintetizar todos os tipos enzimáticos prospectados no estudo, com alta produtividade de amilases, celulases, e xilanases; razoável de pectinases, proteases e lacases; e baixo de lipases. As cepas SN19, SN20 e SN32 possuem uma alta aplicabilidade na indústria de papel e na agroindústria como facilitadores da colonização de raízes de leguminosas por rizobactérias no desenvolvimento de inoculantes de origem biótica, em decorrência do seu perfil de produção enzimática alta no que diz respeito a celulases, pectinases e xilanases, requeridas em ambos os processos descritos. Além disso, as cepas SN08, SN09, SN10, SN11, SN17, SN18, SN24, SN35 e SN39, embora não tenham apresentado um perfil equiparável às cepas previamente citadas, não podem ser diminuídas em relação ao seu potencial biotecnológico, sobretudo em estudos individualizados para cada tipo enzimático, como foi o caso da cepa SN18 que apresentou uma alta atividade enzimática específica nos ensaios proteolíticos quantitativos. E, apesar dos resultados menos robustos numa perspectiva geral, as demais cepas que apresentaram índice de produção elevado em ao menos uma única atividade enzimática, como é o caso da cepa SN34, ainda assim apresentam um potencial elevado no que diz respeito à descoberta de biocatalisadores aplicáveis. Tendo estes dados em mente, portanto, é notável o alto potencial biotecnológico da amostra de estudo, implicando num alto potencial inerente à microbiota do semiárido nordestino.

A capacidade de produção de múltiplas enzimas de interesse biotecnológico foi confirmada e os dados aqui obtidos abrem portas para novos estudos envolvendo pesquisas de isolamento e caracterização enzimática, cinética de crescimento microbiano e escalonamento de produção de alguma das enzimas de interesse, remediação de habitats contaminados com poluentes diversos ou tratamento de águas residuárias, assim como inúmeros outros. As possibilidades são substancialmente altas, o direcionamento depende do que será feito com a base de conhecimento fornecida nessa pesquisa.

REFERÊNCIAS

- Ab'Sáber, A. N. **Os domínios de natureza no Brasil: potencialidades paisagísticas**. Ateliê editorial, 2003.
- Adesanya, A., & Adesanya, V. A Laboratory-Scale Study: Biodegradation of Bisphenol A (BPA) by Different Actinobacterial Consortium. 2022.
- Adiguzel, G., Faiz, O., Sisecioglu, M., Sari, B., Baltaci, O., Akbulut, S., ... & Adiguzel, A. A novel endo- β -1, 4-xylanase from *Pediococcus acidilactici* GC25; purification, characterization and application in clarification of fruit juices. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 129, p. 571-578, 2019.
- Ahmed S, Shah P, Ahmed O. Biochemistry, Lipids. **National Center for Biotechnology**, 2022. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK525952/> . Acesso em: 13 de novembro de 2022.
- Alavi, F., & Momen, S. Aspartic proteases from thistle flowers: Traditional coagulants used in the modern cheese industry. **International Dairy Journal**, v. 107, p. 104709, 2020.
- Al-Dhabi, N. A., Esmail, G. A., Ghilan, A. K. M., & Arasu, M. V. Isolation and *screening* of *Streptomyces* sp. Al-Dhabi-49 from the environment of Saudi Arabia with concomitant production of lipase and protease in submerged fermentation. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 27, n. 1, p. 474-479, 2020.
- Alves, D., Silva, V. M., Garcia, F., Martins, S. C., & Martins, C. Produção de celulase e amilase por actinobactérias do semiárido brasileiro. **Enciclopédia Biosfera**, v. 13, n. 24, 2016.
- Amaresan, N., Kumar, M. S., Annapurna, K., Kumar, K., & Sankaranarayanan, A. (Eds.). **Beneficial microbes in agro-ecology: bacteria and fungi**. Academic Press, 2020.
- Anand, G., Yadav, S., Gupta, R., & Yadav, D. Pectinases: from microbes to industries. In: **Microorganisms for Sustainable Environment and Health**. Elsevier, 2020. p. 287-313.
- Araujo, R., Gupta, V. V., Reith, F., Bissett, A., Mele, P., & Franco, C. M. Biogeography and emerging significance of Actinobacteria in Australia and Northern Antarctica soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 146, p. 107805, 2020.
- Arregui, L., Ayala, M., Gómez-Gil, X., Gutiérrez-Soto, G., Hernández-Luna, C. E., Herrera de Los Santos, M., ... & Valdez-Cruz, N. A. Laccases: structure, function, and potential application in water bioremediation. **Microbial Cell Factories**, v. 18, n. 1, p. 1-33, 2019.
- Arifuzzaman, M., Khatun, M. R., & Rahman, H. Isolation and *screening* of actinomycetes from Sundarbans soil for antibacterial activity. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 29, p. 4615-4619, 2010.
- Bandeira, L. L., de Castro Viana, L., de Figueiredo, A., Mesquita, N., de Matos Neto, J. M., Miranda, C., & Martins, S. C. S. M. Production of Extracellular Pectinase from Cultivable Soil Bacteria Strains. **World Wide Journal of Multidisciplinary Research and Development**, v. 8, n. 11, p. 128-132, 2022.

Bandeira, L. L., Marques, J. S., Mesquita, A. F. N., Cavalcante, F. G., Martins, S. C. S., & Martins, C. M. Production of Enzymes by Actinobacteria from Agricultural Areas of the Brazilian Semi-Arid Region. **World Wide Journal of Multidisciplinary Research and Development**, v. 8, n. 11, p. 95-99, 2022.

Bajpai, P. Chapter 2-Xylan: occurrence and structure. **Xylanolytic enzymes**, v. 16, p. 9-18, 2014.

Balagurunathan, R., Radhakrishnan, M., Shanmugasundaram, T., Gopikrishnan, V., & Jerrine, J. **Protocols in actinobacterial research**. New York: Springer US, 2020.

Barka, E. A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Klenk, H. P., ... & van Wezel, G. P. Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 80, n. 1, p. 1-43, 2016.

Behera, S. S., & Ray, R. C. Solid state fermentation for production of microbial cellulases: recent advances and improvement strategies. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 86, p. 656-669, 2016.

Bibra, M., Kunreddy, V. R., & Sani, R. K. Thermostable xylanase production by *Geobacillus* sp. strain DUSELR13, and its application in ethanol production with lignocellulosic biomass. **Microorganisms**, v. 6, n. 3, p. 93, 2018.

Bonatelli, M. L., Lacerda-Júnior, G. V., dos Reis Junior, F. B., Fernandes-Júnior, P. I., Melo, I. S., & Quecine, M. C. Beneficial plant-associated microorganisms from semiarid regions and seasonally dry environments: a review. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 553223, 2021.

Both, J., Biduski, B., Gómez, M., Bertolin, T. E., Friedrich, M. T., & Gutkoski, L. C. Micronized whole wheat flour and xylanase application: dough properties and bread quality. **Journal of Food Science and Technology**, v. 58, n. 10, p. 3902-3912, 2021.

Boukhatem, Z. F., Merabet, C., & Tsaki, H. Plant growth promoting actinobacteria, the most promising candidates as bioinoculants?. **Frontiers in Agronomy**, p. 14, 2022.

Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

Castañeda-Cisneros, Y. E., Mercado-Flores, Y., Anducho-Reyes, M. A., Álvarez-Cervantes, J., Ponce-Lira, B., Evangelista-Martínez, Z., & Téllez-Jurado, A. Isolation and selection of *Streptomyces* species from semi-arid agricultural soils and their potential as producers of xylanases and cellulases. **Current Microbiology**, v. 77, n. 11, p. 3460-3472, 2020.

Choi, Y., Lim, T., He, Y., & Hwang, K. T. Chemical characteristics and antioxidant properties of wheat gluten hydrolysates produced by single and sequential enzymatic hydrolyses using commercial proteases and their application in beverage system. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v. 13, n. 1, p. 745-754, 2019.

Claessen, D., Wösten, H. A., Keulen, G. V., Faber, O. G., Alves, A. M., Meijer, W. G., & Dijkhuizen, L. Two novel homologous proteins of *Streptomyces coelicolor* and *Streptomyces lividans* are involved in the formation of the rodlet layer and mediate attachment to a hydrophobic surface. **Molecular Microbiology**, v. 44, n. 6, p. 1483-1492, 2002.

Chinni, S. V. Biotechnological processes in microbial amylase production. **BioMed Research International**, v. 2017, 2017.

Clardy, J., Fischbach, M. A., & Walsh, C. T. New antibiotics from bacterial natural products. **Nature Biotechnology**, v. 24, n. 12, p. 1541-1550, 2006.

Coimbra Filho, A. F. **Os limites originais do bioma Mata Atlântica na região Nordeste do Brasil**. FBCN, 1996.

Correia Filho, E. P., Farias, M. T. B., Souza, J. V. de & Arthaud, M. H. Geologia da Estação Ecológica de Aiuaba – CE. **Revista de Geologia**. v.1, n.1, p. 111-115, jun. 1988.

Costantini, A., & Califano, V. Lipase immobilization in mesoporous silica nanoparticles for biofuel production. **Catalysts**, v. 11, n. 5, p. 629, 2021.

Couri, S., & Farias, A. X. Genetic manipulation of *Aspergillus niger* for increased synthesis of pectinolytic enzymes. **Revista de Microbiologia**, p. 314-7, 1995.

Cunha, T. J. F., Sa, I. B., Silva, P. C. G. Semiárido brasileiro: pesquisa, desenvolvimento e inovação. **Principais solos do Semiárido tropical brasileiro: caracterização, potencialidades, limitações, fertilidade e manejo**. Embrapa Semiárido, p. 38, 2010.

Da Silva Bolzani, V., Valli, M., Pivatto, M., & Viegas, C. Natural products from Brazilian biodiversity as a source of new models for medicinal chemistry. **Pure and Applied Chemistry**, v. 84, n. 9, p. 1837-1846, 2012.

Daquioag, J. E. L., & Penuliar, G. M. Isolation of actinomycetes with cellulolytic and antimicrobial activities from soils collected from an Urban Green Space in the Philippines. **International Journal of Microbiology**, v. 2021, p. 1-14, 2021.

Matos Neto, J., Bandeira, L., Carvalho, J., Mesquita, A., Martins, S., & Martins, C. Bioprospecting Proteolytic Enzymes from Soil Actinobacteria of Brazilian Semiarid Zones. **World Wide Journal of Multidisciplinary Research and Development**, v.8, n. 11, p. 100-104, 2022.

Dharmaraj, S. Marine Streptomyces as a novel source of bioactive substances. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 12, p. 2123-2139, 2010.

Di Berardo, C., Capstick, D. S., Bibb, M. J., Findlay, K. C., Buttner, M. J., & Elliot, M. A. Function and redundancy of the chaplin cell surface proteins in aerial hypha formation, rodlet assembly, and viability in *Streptomyces coelicolor*. **Journal of Bacteriology**, v. 190, n. 17, p. 5879-5889, 2008.

Doe, J., Smith, J., & Bloggs F. Digital Atlas of Actinomycetes 2, 2022. **Society for Actinomycetes Japan**. Disponível em: <https://atlas.actino.jp> . Acesso em: 14 de novembro de

2022.

Dos Santos Ferreira, J., de Oliveira, D., Maldonado, R. R., Kamimura, E. S., & Furigo, A. Enzymatic pretreatment and anaerobic co-digestion as a new technology to high-methane production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, n. 10, p. 4235-4246, 2020.

El Menoufy, H. A., Gomaa, S. K., Haroun, A. A., Farag, A. N., Shafei, M. S., Shetaia, Y. M., & Abd El Aal, R. A. Comparative studies of free and immobilized partially purified lipase from *Aspergillus niger* NRRL-599 produced from solid-state fermentation using gelatin-coated titanium nanoparticles and its application in textile industry. **Egyptian Pharmaceutical Journal**, v. 21, n. 2, p. 143, 2022.

El Othmany, R., Zahir, H., Ellouali, M., & Latrache, H. Current Understanding on Adhesion and Biofilm Development in Actinobacteria. **International Journal of Microbiology**, v. 2021, 2021.

Elframawy, A., El-Hanafy, A., Sharamant, M., & Ghozlan, H. Molecular identification of native Egyptian Actinobacteria: *Screening* for lignin utilization and degradation of lignin model compounds. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 40, p. 102289, 2022.

Ethica, S. N., Saptaningtyas, R., Muchlissin, S. I., & Sabdono, A. The development method of bioremediation of hospital biomedical waste using hydrolytic bacteria. **Health and Technology**, v. 8, n. 4, p. 239-254, 2018.

Farooq, M. A., Ali, S., Hassan, A., Tahir, H. M., Mumtaz, S., & Mumtaz, S. Biosynthesis and industrial applications of α -amylase: A review. **Archives of Microbiology**, v. 203, n. 4, p. 1281-1292, 2021

Fernandez, R., Ramachandran, R., & Nallakumar, K. *Screening* and characterization of protease producing marine actinobacteria *Streptomyces pactum* RA71 isolated from Pulicat Lake, Chennai, Tamil Nadu, India. **Asian Journal of Microbiology, Biotechnology, and Environmental Sciences**20, p. 618-625, 2018.

Flores, L., Zanette, L. R., & Araujo, F. S. Effects of habitat simplification on assemblages of cavity nesting bees and wasps in a semiarid neotropical conservation area. **Biodiversity and Conservation**, v. 27, n. 2, p. 311-328, 2018.

Gagaoua, M., Dib, A. L., Lakhdara, N., Lamri, M., Botineştean, C., & Lorenzo, J. M. Artificial meat tenderization using plant cysteine proteases. **Current Opinion in Food Science**, v. 38, p. 177-188, 2021.

Gasmi, M., Kitouni, M., Carro, L., Pujic, P., Normand, P., & Boubakri, H. Chitinolytic actinobacteria isolated from an Algerian semi-arid soil: development of an antifungal chitinase-dependent assay and GH18 chitinase gene identification. **Annals of Microbiology**, v. 69, n. 4, p. 395-405, 2019.

Girelli, A. M., Astolfi, M. L., & Scuto, F. R. Agro-industrial wastes as potential carriers for enzyme immobilization: A review. **Chemosphere**, v. 244, p. 125368, 2020.

Gogotya, A., Nnolim, N. E., Digban, T. O., Okoh, A. I., & Nwodo, U. U. Characterization of a thermostable and solvent-tolerant laccase produced by *Streptomyces* sp. LAO. **Biotechnology Letters**, v. 43, n. 7, p. 1429-1442, 2021.

Gohain, A., Manpoong, C., Saikia, R., & De Mandal, S. Actinobacteria: diversity and biotechnological applications. **Recent advancements in microbial diversity**, p. 217-231, 2020.

González, V., Vargas-Straube, M. J., Beys-da-Silva, W. O., Santi, L., Valencia, P., Beltrametti, F., & Cámara, B. Enzyme bioprospection of marine-derived Actinobacteria from the Chilean Coast and new insight in the mechanism of keratin degradation in *Streptomyces* sp. G11C. **Marine Drugs**, v. 18, n. 11, p. 537, 2020.

Gopinath, S. C., Anbu, P., Arshad, M. M., Lakshmipriya, T., Voon, C. H., Hashim, U., & Goud, B. S., Cha, H. L., Koyyada, G., & Kim, J. H. Augmented biodegradation of textile azo dye effluents by plant endophytes: a sustainable, eco-friendly alternative. **Current Microbiology**, v. 77, n. 11, p. 3240-3255, 2020.

Greenfield, E. A. Protein quantitation. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2018, n. 6, p.480-483, 2018.

Hamedi, J., Kafshnouchi, M., & Ranjbaran, M. A study on actinobacterial diversity of Hampoeil cave and *screening* of their biological activities. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 26, n. 7, p. 1587-1595, 2019.

Hamoudi, H., Giacobbe, S., Strazzulli, A., Pezzella, C., Sannia, G., Moracci, M., ... & Kecha, M. A novel *Streptomyces* strain isolated by functional bioprospecting for laccases. **Process Biochemistry**, v. 111, p. 315-324, 2021.

Hankin, L., & Anagnostakis, S. L. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. **Mycologia**, v. 67, n. 3, p. 597-607, 1975.

Hasanah, U., Sani, N. D. M., Heng, L. Y., Idroes, R., & Safitri, E. Construction of a hydrogel pectin-based triglyceride optical biosensor with immobilized lipase enzymes. **Biosensors**, v. 9, n. 4, p. 135, 2019.

Hassan, Q. P., Bhat, A. M., & Shah, A. M. Bioprospecting actinobacteria for bioactive secondary metabolites from untapped ecoregions of the northwestern himalayas. In: **New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering**. Elsevier, p. 77-85, 2019.

Heck, J. X., Flôres, S. H., Hertz, P. F., & Ayub, M. A. Z. Optimization of cellulase-free xylanase activity produced by *Bacillus coagulans* BL69 in solid-state cultivation. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 1, p. 107-112, 2005.

Hoyos, P., Hernáiz, M. J., & Alcántara, A. R. 3.28-Biocatalyzed production of fine chemicals. In: **Comprehensive Biotechnology**. Pergamon Oxford, 2017. p. 334-373.

IBAMA. Plano Operativo de Prevenção e Combate aos Incêndios Florestais da Estação Ecológica de Aiuaba. **Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis**. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/incendios-florestais/servicos/planos->

[operativos](#) . Acesso em: 13 de novembro de 2022.

IBDF. Plano de Manejo: Parque Nacional de Sete Cidades. 1979.

IBGE. *Brazilian Semi-Arid Region*. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2018. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/en/geosciences/maps/regional-maps/19380-braziliansemi-arid.html?=&t=o-que-e> . Acesso em: 14 de novembro de 2022.

ICMBIO (ED.). **Plano de manejo: Parque Nacional de Ubajara**. Brasília, DF, 2002. Disponível em: <https://www.icmbio.gov.br/parnaubajara/planos-de-manejo> . Acesso em: 13 de novembro de 2022.

Jacomine, P. K. T., Cavalcanti, A. C., Pessoa, S. C. P., Burgos, N., Melo Filho, H. D., Lopes, O. F., & LAR, M. Levantamento exploratório de solos do estado do Piauí (escala 1: 1000). **Boletim de Pesquisa**, v. 36, n. 18, p. 112, 1986.

Janusz, G., Pawlik, A., Świdorska-Burek, U., Polak, J., Sulej, J., Jarosz-Wilkolazka, A., & Paszczyński, A. Laccase properties, physiological functions, and evolution. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 3, p. 966, 2020.

Jayanthi, D., Martin Paul, A., & Sebastian, L. Isolation of endophytic actinobacteria from flowers, fruits, and seeds of higher plants. In: **Methods in Actinobacteriology**. Humana, New York, NY, 2022. p. 97-107.

Jeffrey, L. S. H. Isolation, characterization and identification of actinomycetes from agriculture soils at Semongok, Sarawak. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 20, 2008.

Kafarski, P. Rainbow code of biotechnology. **Chemik**, v. 66, n. 8, p. 811-816, 2012.

Kaltenpoth, M. Actinobacteria as mutualists: general healthcare for insects?. **Trends in Microbiology**, v. 17, n. 12, p. 529-535, 2009.

Kaur, R., Salwan, R., & Sharma, V. Structural properties, genomic distribution of laccases from *Streptomyces* and their potential applications. **Process Biochemistry**, 2022.

Kern, M. E., & Blevins, K. S. *Micologia Médica*. 2 Edição. Editora Premier, São Paulo, v. 256, 1999.

Khoshru, B., Moharramnejad, S., Gharajeh, N. H., Asgari Lajayer, B., & Ghorbanpour, M. Plant microbiome and its important in stressful agriculture. In: **Plant microbiome paradigm**. Springer, Cham, p. 13-48, 2020.

Kumar, L., & Jain, S. K. Role of Proteases in Bioremediation of Temple Protein-Containing Waste with Special Reference to Mangalnath, Ujjain (MP)–India. **Indian Journal of Pure & Applied Biosciences** v. 8, n. 3, p. 602-607, 2020.

Kumar, V., Bharti, A., Negi, Y. K., Gusain, O., Pandey, P., & Bisht, G. S. *Screening of actinomycetes from earthworm castings for their antimicrobial activity and industrial enzymes*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, p. 205-214, 2012.

Kumar, V. S., Karthi, V., Ramkumar, A., Ramesh, R., Stephen, A., & Kumaresan, S. Isolation, *screening*, identification, and optimization of xylanase producing bacteria from forests of Western Ghats, India. **International Journal of Agriculture, Environment and Biotechnology**, v. 11, n. 1, p. 173-179, 2018.

Kumari, S., Sharma, U., Krishna, R., Sinha, K., & Kumar, S. *Screening* and molecular characterization of cellulase producing actinobacteria from Litchi Orchard. **Current Chemical Biology**, v. 13, n. 1, p. 90-101, 2019.

Küster, E., & Williams, S. T. Selection of media for isolation of streptomycetes. **Nature**, v. 202, n. 4935, p. 928-929, 1964.

Lacerda-Júnior, G. V., Noronha, M. F., Cabral, L., Delforno, T. P., De Sousa, S. T. P., Fernandes-Júnior, P. I., ... & Oliveira, V. M. Land use and seasonal effects on the soil microbiome of a Brazilian dry forest. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 648, 2019.

Lal, R. Soil carbon sequestration in India. **Climatic Change**, v. 65, n. 3, p. 277-296, 2004.

Li, D. Q., Li, J., Dong, H. L., Li, X., Zhang, J. Q., Ramaswamy, S., & Xu, F. Pectin in biomedical and drug delivery applications: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 185, p. 49-65, 2021.

Li, F., Liu, S., Lu, Q., Zheng, H., Osterman, I. A., Lukyanov, D. A., ... & Sun, C. Studies on antibacterial activity and diversity of cultivable actinobacteria isolated from mangrove soil in Futian and Maowei Hai of China. **Evidence-based complementary and alternative medicine**, v. 2019, 2019.

Li, Q., Chen, X., Jiang, Y., & Jiang, C. (2016). Morphological identification of actinobacteria. **Actinobacteria-basics and Biotechnological Applications**, p. 59-86, 2016.

Li, S., Sun, K., Latif, A., Si, Y., Gao, Y., & Huang, Q. Insights into the applications of extracellular laccase-aided humification in livestock manure composting. **Environmental Science & Technology**, 2022.

Li, S., Luo, F., Chattha, S. A., Zhang, C., Peng, B., & Mu, C. Surfactant-free beamhouse technology of leather manufacturing: removing constraints for the breakdown of natural fats catalyzed by lipase. **Journal of Cleaner Production**, v. 261, p. 121187, 2020.

Lim, T., He, Y., Park, B., Choi, Y., & Hwang, K. T. Wheat gluten hydrolysates prepared by sequential treatment with different combinations of commercial proteases. **Journal of Food Measurement and Characterization**, p. 1-11, 2022.

Lima, J. V. L., Martins, S. C. M., Siqueira, K. A., Soares, M. A., Martins, C. M. Characterization of actinobacteria from the semiarid region, and their antagonistic effect on strains of rhizobia. **African Journal of Biotechnology**, v. 16, n. 11, p. 499-507, 2017.

Liu, K., McInroy, J. A., Hu, C. H., & Kloepper, J. W. Mixtures of plant-growth-promoting rhizobacteria enhance biological control of multiple plant diseases and plant-growth promotion in the presence of pathogens. **Plant Disease**, v. 102, n. 1, p. 67-72, 2018.

Lochhead, R. Y. The use of polymers in cosmetic products. **Cosmetic Science and Technology: Theoretical Principles and Applications**, p. 171-221, 2017.

Lu, L., Zeng, G., Fan, C., Ren, X., Wang, C., Zhao, Q., ... & Jiang, M. Characterization of a laccase-like multicopper oxidase from newly isolated *Streptomyces* sp. C1 in agricultural waste compost and enzymatic decolorization of azo dyes. **Biochemical Engineering Journal**, v. 72, p. 70-76, 2013.

Nalini, M. S., & Prakash, H. S. Actinobacteria: diversity, plant interactions and biotechnology applications. In: **Plant Microbiomes for Sustainable Agriculture**. Springer, Cham, 2020. p. 199-244.

Mamo, J., & Assefa, F. The role of microbial aspartic protease enzyme in food and beverage industries. **Journal of Food Quality**, v. 2018, 2018.

Mantovani, W., Anjos, L. D., Monteiro, R. F., & Araújo, F. S. D. A conservação da biodiversidade no domínio da Caatinga. **Pesquisas em unidades de conservação no domínio da Caatinga: subsídios à gestão**, 2017.

McLauchlan, K. The nature and longevity of agricultural impacts on soil carbon and nutrients: a review. **Ecosystems**, v. 9, n. 8, p. 1364-1382, 2006.

Menasria, T., Monteoliva-Sánchez, M., Benhadj, M., Benammar, L., Boukoucha, M., & Aguilera, M. Unraveling the enzymatic and antibacterial potential of rare halophilic actinomycetes from Algerian hypersaline wetland ecosystems. **Journal of Basic Microbiology**, v. 62, n. 10, p. 1202-1215, 2022.

Mesquita, A. F. N., Bandeira, L. L., Cavalcante, F. G., De Matos Neto, J. M. M., Martins, S. C. S., & Martins, C. M. Amylase-Producing Actinobacteria Facilitate Rhizobia Growth in a Culture Medium with Starch. **World Wide Journal of Multidisciplinary Research and Development**, v. 8, n. 11, p. 91-94, 2022.

Mhiri, S., Bouanane-Darenfed, A., Jemli, S., Neifar, S., Ameri, R., Mezghani, M., ... & Bejar, S. A thermophilic and thermostable xylanase from *Caldicoprobacter algeriensis*: Recombinant expression, characterization and application in paper biobleaching. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 164, p. 808-817, 2020.

Miyadoh, S. **Atlas of actinomycetes**. Society for Actinomycetes Japan, 1997.

Mojsov, K. Microbial alpha-amylases and their industrial applications: a review. **International Journal of Management, IT and Engineering (IJMIE)**, v. 2, n. 10, p. 583-609, 2012.

Moujehed, E., Zarai, Z., Khemir, H., Miled, N., Bchir, M. S., Gablin, C., ... & Aloulou, A. Cleaner degreasing of sheepskins by the *Yarrowia lipolytica* LIP2 lipase as a chemical-free alternative in the leather industry. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 211, p. 112292, 2022.

MsangoSoko, K., Bhattacharya, R., Ramakrishnan, B., Sharma, K., & Subramanian, S. Cellulolytic activity of gut bacteria isolated from the eri silkworm larvae, *Samia ricini*, (Lepidoptera: Saturniidae). **International Journal of Tropical Insect Science**, v. 41, n. 4, p. 2785-2794, 2021.

Munk, L., Sitarz, A. K., Kalyani, D. C., Mikkelsen, J. D., & Meyer, A. S. Can laccases catalyze bond cleavage in lignin?. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 1, p. 13-24, 2015.

Naylor, D., & Coleman-Derr, D. Drought stress and root-associated bacterial communities. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 2223, 2018.

Oliveira, J. P., Nascimento, Y. A., Amorim, K. P., Gonçalves, L. R., Freitas, L. B., Silva, A. F., ... & Freitas, C. D. Use of *Calotropis procera* cysteine peptidases (CpCPs) immobilized on glyoxyl-agarose for cheesemaking. **Food Chemistry**, v. 403, p. 134319, 2023.

Parihar, K., Gehlot, P., Mathur, M., Tak, A., Pathak, R., & Singh, S. K. Species Composition and Diversity Dynamics of Actinomycetes in Arid and Semi-arid Salt Basins of Rajasthan. **Current Microbiology**, v. 79, n. 6, p. 1-13, 2022.

Peng, M., Jia, H., & Wang, Q. The effect of land use on bacterial communities in saline-alkali soil. **Current Microbiology**, v. 74, n. 3, p. 325-333, 2017.

Pham, J. V., Yilma, M. A., Feliz, A., Majid, M. T., Maffetone, N., Walker, J. R., ... & Yoon, Y. J. A review of the microbial production of bioactive natural products and biologics. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 1404, 2019.

Pinheiro, V. E., Ferreira, J. A., Betini, J. H. A., Kamimura, E. S., & Polizeli, M. L. Utilizing a novel fungal enzymatic cocktail as an eco-friendly alternative for cellulose pulp biobleaching. **BioResources**, v. 16, n. 4, p. 7509-7529, 2021.

Putri, A. L., & Setiawan, R. Isolation and *screening* of actinomycetes producing cellulase and xylanase from Mamasa soil, West Sulawesi. In: **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**. IOP Publishing, p. 012035, 2019.

Queiroz, T. **Economia piauiense da pecuária ao extrativismo**. Editora Gráfica da UFPI, 2006.

Rachmadona, N., Harada, Y., Amoah, J., Quayson, E., Aznury, M., Hama, S., ... & Ogino, C. Integrated bioconversion process for biodiesel production utilizing waste from the palm oil industry. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 10, n. 3, p. 107550, 2022.

Rahlwes, K. C., Sparks, I. L., & Morita, Y. S. Cell walls and membranes of Actinobacteria. **Bacterial Cell Walls and Membranes**, p. 417-469, 2019.

Rajkumar, J., Dilipan, E., Ramachandran, M., Panneerselvam, A., & Thajuddin, N. Bioethanol production from seagrass waste, through fermentation process using cellulase enzyme isolated from marine actinobacteria. **Vegetos**, v. 34, n. 3, p. 581-591, 2021.

Ramakodi, M. P., Santhosh, N., Pragadeesh, T., Mohan, S. V., & Basha, S. Production of protease enzyme from slaughterhouse effluent: an approach to generate value-added products from waste. **Bioresource Technology Reports**, v. 12, p. 100552, 2020.

Rawlings, N. D., & Bateman, A. Origins of peptidases. **Biochimie**, v. 166, p. 4-18, 2019.

Ribeiro, G. A., Mesquita, A., Bandeira, L., Cavalcante, F., Martins, S. C., & Martins, C. *In vitro* antagonism of actinobacteria against rhizobia from the soil. **Enciclopédia Biosfera**, v. 19, n. 41, p. 41-50, 2022.

Rizzini, C. T. **Tratado de fitogeografia do Brasil: aspectos sociológicos e florísticos**. HUCITEC/Ed. da Universidade de São Paulo, 1979.

Romeu, E., Cavalcante, F., Martins, C., & Martins, S. C. Atividade lipolítica *in vitro* de actinobactérias em gradiente de pH, salinidade e temperatura. **Enciclopédia Biosfera**, v. 18, n. 38, p. 114-126, 2021.

Salwan, R., & Sharma, V. Molecular and biotechnological aspects of secondary metabolites in actinobacteria. **Microbiological Research**, v. 231, p. 126374, 2020.

Salwan, R., & Sharma, V. Trends in extracellular serine proteases of bacteria as detergent bioadditive: alternate and environmental friendly tool for detergent industry. **Archives of Microbiology**, v. 201, n. 7, p. 863-877, 2019.

Sameera, B., Prakash, H. S., & Nalini, M. S. Actinomycetes from the coffee plantation soils of Western Ghats: diversity and enzymatic potentials. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 7, n. 8, p. 3599-3611, 2018.

Santos, É. R. D., Teles, Z. N. S., Campos, N. M., Souza, D. A. J. D., Bispo, A. S. D. R., & Nascimento, R. P. D. Production of α -amylase from *Streptomyces* sp. SLBA-08 strain using agro-industrial by-products. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 55, p. 793-800, 2012.

Santos, F., Oliveira, M., Silva, V. M., Martins, S. C., & Martins, C. Diversidade cultural de cepas de actinobactérias oriundas de áreas suscetíveis à desertificação. **Enciclopédia Biosfera**, v. 16, n. 29, p. 1844-1856, 2019.

Santos, F., Oliveira, M., Meneses, A. C., Martins, S. C., & Martins, C. Morfologia de cepas de actinobactérias em áreas suscetíveis à desertificação. **Enciclopédia Biosfera**, v. 16, n. 29, p. 1911-1924, 2019.

Sargent, J. R., Tocher, D. R., & Bell, J. G. The lipids. **Fish nutrition**, p. 181-257, 2003.

Segaran, G., Sundar, R. D. V., Settu, S., Shankar, S., & Sathiavelu, M. A review on endophytic actinomycetes and their applications. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 9, n. 10, p. 152-158, 2017.

Senthivelan, T., Kanagaraj, J., & Panda, R. C. Recent trends in fungal laccase for various industrial applications: an eco-friendly approach-a review. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 21, n. 1, p. 19-38, 2016.

Sharma, D., Chaudhary, R., Kaur, J., & Arya, S. K. Greener approach for pulp and paper industry by xylanase and laccase. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 25, p. 101604, 2020.

Sharma, P., Aswini, K., Sai Prasad, J., Kumar, N., Pathak, D., Gond, S., ... & Suman, A. Characterization of actinobacteria from wheat seeds for plant growth promoting traits and protection against fungal pathogens. **Journal of Basic Microbiology**, 2022.

Sharma, P., & Thakur, D. Antimicrobial biosynthetic potential and diversity of culturable soil actinobacteria from forest ecosystems of Northeast India. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1-18, 2020.

Singh, A. K., Mishra, B., Bedford, M. R., & Jha, R. Effects of supplemental xylanase and xylooligosaccharides on production performance and gut health variables of broiler chickens. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 12, n. 1, p. 1-15, 2021.

Sharma, S., Kumawat, K. C., & Kaur, S. Potential of indigenous ligno-cellulolytic microbial consortium to accelerate degradation of heterogenous crop residues. **Environmental Science and Pollution Research**, p. 1-16, 2022.

Shet, A. R., Desai, S. V., & Achappa, S. Pectinolytic enzymes: classification, production, purification and applications. **Research Journal of Life Sciences, Bioinformatics, Pharmaceutical and Chemical Sciences**, v. 4, p. 337-48, 2018.

Silva, M. J., Sousa, J., Martins, S. C., & Martins, C. Diversidade de cepas de actinobactérias da rppn “Fazenda Não me Deixes”-Quixadá (ce). **Enciclopédia Biosfera**, v. 16, n. 29, p. 1857-1869, 2019.

Silva, V. M. A., Brito, F. A. E. D., Ramos, K. A., Silva, R. M. D., Martins, C. M., & Martins, S. C. S. Atividade enzimática de actinobactérias do semiárido. **Revista Brasileira de Geografia Física**, v. 8, p. 560-572, 2015.

Silva, V. M., Meneses, A. C., Mesquita, S., Martins, C., & Martins, S. C. Atividade pectinolítica de rizóbios de região semiárida. **Enciclopédia Biosfera**, v. 16, n. 29, p. 1764-1771, 2019.

Sivakala, K. K., Gutiérrez-García, K., Jose, P. A., Thinesh, T., Anandham, R., Barona-Gómez, F., & Sivakumar, N. Desert environments facilitate unique evolution of biosynthetic potential in *Streptomyces*. **Molecules**, v. 26, n. 3, p. 588, 2021.

Silveira, M. A. V., Batista dos Santos, S. M., Okamoto, D. N., de Melo, I. S., Juliano, M. A., Ribeiro Chagas, J., & Vasconcellos, S. P. Atlantic Forest's and Caatinga's semiarid soils and their potential as a source for halothermotolerant actinomycetes and proteolytic enzymes. **Environmental Technology**, p. 1-13, 2021.

Sohail, M., Barzkar, N., Michaud, P., Tamadoni Jahromi, S., Babich, O., Sukhikh, S., ... & Nahavandi, R. Cellulolytic and xylanolytic enzymes from yeasts: Properties and industrial applications. **Molecules**, v. 27, n. 12, p. 3783, 2022.

Siddharth, S. Isolation and characterization of bioactive compounds with antibacterial, antioxidant and enzyme inhibitory activities from marine-derived rare actinobacteria, *Nocardioopsis* sp. SCA21. **Microbial Pathogenesis**, v. 137, p. 103775, 2019.

Sun, K., Li, S., Si, Y., & Huang, Q. Advances in laccase-triggered anabolism for biotechnology applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 41, n. 7, p. 969-993, 2021.

Tata, S., Aouiche, A., Bijani, C., Bouras, N., Pont, F., Mathieu, F., & Sabaou, N. Mzabimycins A and B, novel intracellular angucycline antibiotics produced by *Streptomyces* sp. PAL114 in synthetic medium containing L-tryptophan. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 27, n. 7, p. 907-913, 2019.

Thilagam, R., & Hemalatha, N. Plant growth promotion and chilli anthracnose disease suppression ability of rhizosphere soil actinobacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v. 126, n. 6, p. 1835-1849, 2019.

Teixeira, P. C., Donagemma, G. K., Fontana, A., & Teixeira, W. G. **Manual de métodos de análise de solo**, 3. ed. Distrito Federal, Embrapa, p. 573. 2017.

Trubitsina, L. I., Abdullatypov, A. V., Larionova, A. P., Trubitsin, I. V., Alferov, S. V., Ponamoreva, O. N., & Leontievsky, A. A. Expression of thermophilic two-domain laccase from *Catenuloplanes japonicus* in *Escherichia coli* and its activity against triarylmethane and azo dyes. **PeerJ**, v. 9, p. e11646, 2021.

Vanleeuw, E., Winderickx, S., Thevissen, K., Lagrain, B., Dusselier, M., Cammue, B. P., & Sels, B. F. Substrate-specificity of *Candida rugosa* lipase and its industrial application. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 7, n. 19, p. 15828-15844, 2019.

Verma, A. S., Agrahari, S., Rastogi, S., & Singh, A. Biotechnology in the realm of history. **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences**, v. 3, n. 3, p. 321, 2011.

Vidmar, B., & Vodovnik, M. Microbial keratinases: enzymes with promising biotechnological applications. **Food Technology and Biotechnology**, v. 56, n. 3, p. 312-328, 2018.

Vieto, S., Escudero-Leyva, E., Avendaño, R., Rechnitzer, N., Barrantes-Madrigal, M. D., Conejo-Barboza, G., ... & Chavarría, M. Biodeterioration and cellulolytic activity by fungi isolated from a nineteenth-century painting at the National Theatre of Costa Rica. **Fungal Biology**, v. 126, n. 2, p. 101-112, 2022.

Vitolo, M. Brief review on enzyme activity. **World Journal of Pharmaceutical Research**, v. 9, n. 2, p. 60-76, 2020.

Wang, Q. D., Li, S., Zhang, K. Y., Zhang, Y., Bai, S. P., Ding, X. M., ... & Zeng, Q. F. Protease supplementation attenuates the intestinal health damage caused by low-protein diets in Pekin ducks. **Poultry science**, v. 99, n. 12, p. 6630-6642, 2020.

Wang, X., Zhang,* M., Gao, J., Pu, T., Bilal, M., Wang, Y., & Zhang, X. Antifungal activity screening of soil actinobacteria isolated from Inner Mongolia, China. **Biological Control**, v. 127, p. 78-84, 2018.

Whistler, R. L., & Daniel, J. R. Starch. **Kirk-othmer encyclopedia of chemical technology**, 2000.

Wink, J., Mohammadipanah, F., & Kazemi Shariat Panahi, H. Practical aspects of working with actinobacteria. In: **Biology and Biotechnology of Actinobacteria**. Springer, Cham, p. 329-376, 2017.

Wösten, H. A., Richter, M., & Willey, J. M. Structural proteins involved in emergence of microbial aerial hyphae. **Fungal Genetics and Biology**, v. 27, n. 2-3, p. 153-160, 1999.

Zakalyukina, Y. V., Zaytsev, A. R., & Biryukov, M. V. Study of cellulose-destroying activity of actinobacteria associated with ants. **Moscow University Biological Sciences Bulletin**, v. 76, n. 1, p. 20-27, 2021.

**APÊNDICE A – ARTIGO I COMPLETO PUBLICADO EM PERIÓDICO
INDEXADO**

Título do Artigo

Bioprospecting Proteolytic Enzymes from Soil Actinobacteria of Brazilian Semiarid Zones

Periódico

Worldwide Journal of Multidisciplinary Research and Development

ISSN: 2454-6615

Qualis Novo

B1

Qualis Capes Quadriênio 2013-2016

B5

Volume

8

Issue

11

Páginas

104-107

Área

Bioquímica e Biologia Moleculas

Ano de Publicação

2022

DOI

10.5281/zenodo.7406246



WWJMRD 2022; 8(11): 00-00

www.wwjmr.com

International Journal

Peer Reviewed Journal

Refereed Journal

Indexed Journal

Impact Factor SJIF 2017: 5.182

2018: 5.51, (ISI) 2020-2021:

1.361

E-ISSN: 2454-6615

João Matos Neto

Bachelor's Degree in
Biotechnology
(undergraduate), Department
of Biochemistry and Molecular
Biology, Federal University of
Ceará, Fortaleza – CE, Brazil.

Leonardo Bandeira

Graduate Student – Ecology
and Natural Resources,
Department of Biology,
Federal University of Ceará,
Fortaleza - CE, Brazil.

Joyce Carvalho, Ariel Mesquita

Bachelor's Degree in
Biotechnology
(undergraduate), Department
of Biochemistry and Molecular
Biology, Federal University of
Ceará, Fortaleza – CE, Brazil.

Suzana Martins³, Claudia Martins

Microbiology Professor and
Researcher, Biology
Department, Federal
University of Ceará, Fortaleza
- CE, Brazil.

Correspondence:

João Matos Neto

Bachelor's Degree in
Biotechnology
(undergraduate), Department
of Biochemistry and Molecular
Biology, Federal University of
Ceará, Fortaleza – CE, Brazil.

WORLD WIDE JOURNAL OF MULTIDISCIPLINARY RESEARCH AND DEVELOPMENT

Bioprospecting Proteolytic Enzymes from Soil Actinobacteria of Brazilian Semiarid Zones

**João Matos Neto, Leonardo Bandeira, Joyce Carvalho, Ariel Mesquita,
Suzana Martins, Claudia Martins**

Abstract

Actinobacteria from semiarid zones have been poorly studied and act as promising fonts of biotechnologically applicable hydrolytic enzymes. Proteases play a major role in industry, being responsible for the majority of the profit of this segment. Thus, this work focuses on the prospection of proteolytic enzymes from the semi-arid region of northeast Brazil, an understudied zone with buried biotechnological applications. Overall, 91,12% (41 of 45) of the studied strains were able to produce those enzymes, which shows a great initial potential for further studies.

Keywords: Protease, Actinomycetes, Enzymatic Potential.

1. Introduction

Enzymes are lytic proteins responsible for a wide range of metabolic functions that are essential to life maintenance. These biomolecules are specific in action due to two specialized peptidic zones: the binding site and the cleavage site. The binding site is responsible for the substrate attachment to the protein and the cleavage site has the ability to reduce the activation energy of the reaction, being able to effectively convert the substrates in products or the opposite, if possible.^[1]

The aforementioned biocatalysts are grouped according to their catalytic mechanisms in six major classes: Oxirredutases, Transferases, Hydrolases, Lyases, Isomerases and Ligases^[2]. Between these, the hydrolases group [EC-3] is described as enzymes that use water molecules to effectively cleave the substrate into products and deserves prominence in regard to its diffusion and unique importance in nature, once they are involved in the conversion of organic matter to oligomeric or monomeric subunits more easily used by cells^[3].

Among the hydrolases, one of the most important enzymes from a biotechnological perspective are proteases or peptidases, enzymes that hydrolase the peptidic bounds between two aminoacid. Those enzymes are applicable in the beverage^[4], cheese^[5], meat^[6], and cosmetics industries^[7], among others, representing almost two thirds of all of the enzyme market yield^[8], a sector that foresees to achieve \$9.10 million of revenue by 2026^[9]. Therefore, continuous efforts are made to discover more reliable, stable, and profitable enzymes for industrial applications, where microbial enzymes play vital roles, as they fulfill all of the most desired industrial requirements: fast growth, high productivity, and easier downstream processes^[10]. Actinobacteria are filamentous prokaryotic microorganisms that are deeply studied due to their extensive biotechnological applications given their vast number of produced biocompounds, like antibiotics^[11] and enzymes^[12], besides their ability to survive in harsh environments, as the case of northeastern Brazilian semiarid^[13].

Therefore, the current study focuses on bioprospecting of extracellular proteolytic enzymes from actinobacterial sources isolated from soils from conservation units in the semi-arid Brazilian region, in order to identify promising biocatalysts for industry.

2. Materials and Methods

2.1 Actinobacteria

A total of 45 actinobacterial strains were selected from a pool of 347 isolates to perform this study. These strains were isolated from three different regions from the Brazilian semi-arid territory: 24 strains from Ecological Station of Aiuaba – CE (6°36'01" S 40°07'15" W; 6°44'35" S 40°19'19" W), 15 strains from National Park of Ubajara – CE (3°40'30" S 40°5' W; 3°49'30" S -40°52'30" W) and 6 strains from National Park of Sete Cidades – PI (04°02'08" S 41°40'45" W). The strains used in this study are deposited in the cultures collection of the Laboratory of Environmental Microbiology (LAMAB), located at the Biology Department of Federal University of Ceará (UFC).

2.2 Enzymatic Assay

To assess the capacity of each strain to produce proteases, a semi-quantitative method was performed utilizing the spot plate method. In this assay, a quadruplicate of spots of each actinobacteria strain was inoculated on Petri dishes containing the culture medium Skim Milk Agar (SMA): Skim Milk 5g, NaCl 3g, Peptone 3g and Agar 15g [14]. The dishes were incubated in the Biochemical Oxygen Demand Incubator (BOD) at 28±2°C for 7 days. After the incubation stage, the plates were evaluated and a clear halo of hydrolysis around the colonies was considered as a positive test [14].

2.3 Enzymatic Index

The enzymatic index (EI) of protease production was individually calculated for each strain following the Eq. 1. Where Cd refers to the colony diameter in millimeters (mm) and Hd refers to the halo diameter also in mm [15]. For each strain, at least two assays were performed in order to increase the statistical reliability. At the end of the

evaluation, the FEI (Final Enzymatic Index) was adopted as the mean between all of the individual EIs as well as the standard deviation (σ) of all EIs.

$$EI = Hd / Cd \quad (1)$$

2.4 Statistical analysis

The enzymatic indexes were then submitted to multivariate analysis in PAST v4.03.

3. Results & Discussion

Actinobacteria were already described as producers of a plethora of extracellular organic matter degrading hydrolytic proteins. These mainly saprophytes organisms are tasked to take care of the carbon recovery from biomass present in the environment [16], and their enzymatic apparatus is territorial dependent [17]. Although many efforts were already done in order to provide information about actinobacterial enzymatic production on Caatinga soils [12], only few data are available from protease producer actinobacteria and even less from Brazilian semiarid sources [18].

On account of that, the hydrolysis capacity of proteins from Brazilian northeastern semiarid actinobacteria was evaluated by using their enzymatic indices as the main parameter for analysis. In Figure 1 we can see both cases: a proteolytic enzyme producer strain (1.a) and a nonproducer (2.a), besides the Hd and Cd indicators to generate our IE measurement. All of the FEI and their respective standard deviations are described on Table 1 and a dendrogram coupled to a heatmap with clustering of the similar indices producers can be found on Figure 2.

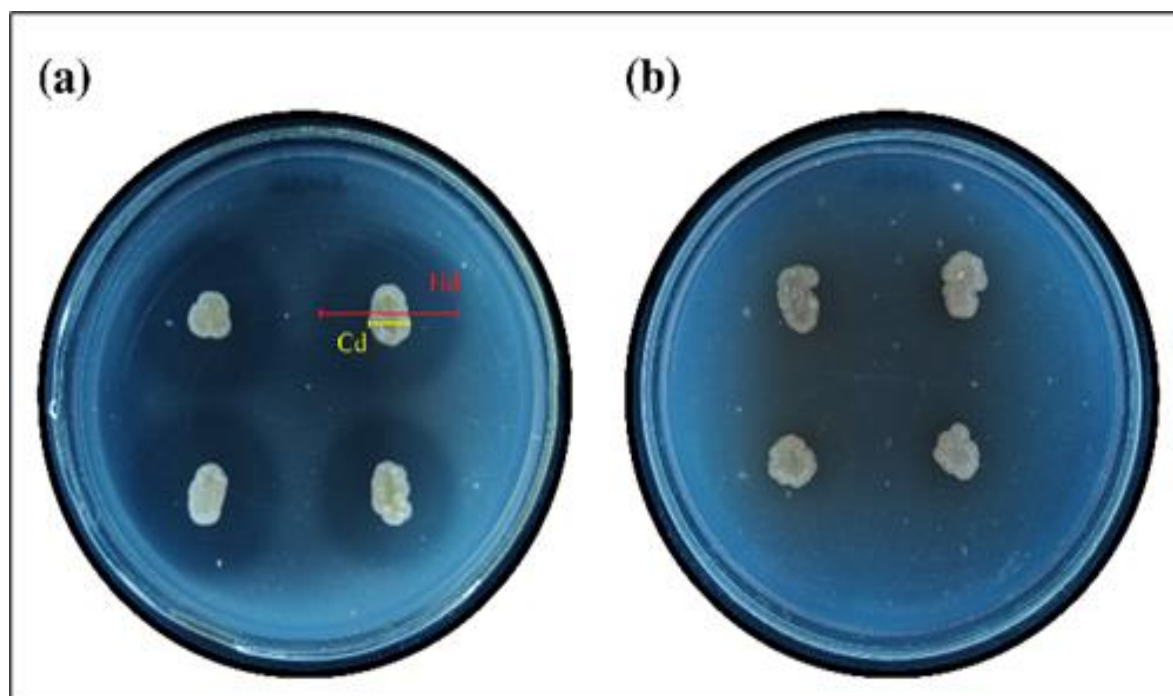


Fig. 1: Positive test for proteolytic assay, with indicators of Hd and Cd (a) Negative test for proteolytic assay (b).

From a total of 45 strains analyzed, a total of 41 (91.11%) were able to effectively produce degradation halos in SMA medium. As previously described, Caatinga-dweller actinobacteria were capable of producing proteolytic

enzymes [18] as a mechanism for biomass degradation and antifungal activity [19]. Past studies suggest approximate proportion of proteolytic enzymes from actinobacteria of multiple environments [20,21]

Table 1: Actinobacteria strains Final Enzymatic Indexes (FEI) and their respective standard deviations (σ).

Strain			Strain		
	FEI	σ		FEI	Σ
SN1	1.92	0.2	SN24	2.54	0.1
SN2	2.46	0.42	SN25	2.19	0.19
SN3	2.49	0.15	SN26	2.01	0.24
SN4	-	-	SN27	1.45	0.17
SN5	1.91	0.19	SN28	1.28	0.09
SN6	2.22	0.51	SN29	2.29	0.31
SN7	-	-	SN30	2.02	0.37
SN8	2.23	0.24	SN31	2.03	0.26
SN9	2.76	0.34	SN32	2.98	0.24
SN10	2.69	0.26	SN33	1.72	0.37
SN11	2.23	0.52	SN34	1.37	0.17
SN12	2.5	0.54	SN35	-	-
SN13	1.64	0.25	SN36	2.02	0.3
SN14	2.45	0.15	SN37	3.19	0.16
SN15	2.28	0.53	SN38	2.14	0.09
SN16	2.03	0.13	SN39	2.57	0.41
SN17	1.99	0.24	SN40	2.51	0.22
SN18	2.51	0.38	SN41	1.67	0.24
SN19	2.18	0.35	SN42	-	-
SN20	2.09	0.1	SN43	2.15	0.34
SN21	2.31	0.21	SN44	2.26	0.27
SN22	2.42	0.19	SN45	1.35	0.15
SN23	1.86	0.22	-	-	-
	Strain	FEI	Strain	FEI	
Bigger FEI	SN32	3.19±0.16	Lower FEI	SN45	1.35±0.15

(-) Absence of hydrolysis halo. Font: authors.

Although all of the actinobacterial growth was performed under mesophilic conditions, previous works already reported that even though these semi-aridic prokaryotes act

as meso-neutrophiles organisms at laboratory, they are able to support higher temperatures and salinities if exposed to such conditions [18].

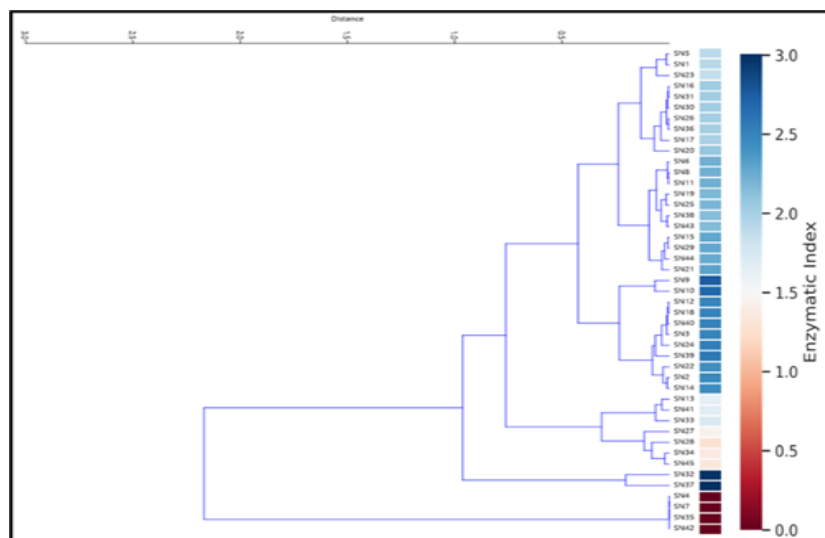


Fig. 2: Multivariate clustering analysis involving the enzymatic indexes of each strain coupled to a heatmap.

4. Conclusions

We conclude that actinobacterial strains from semi-arid Brazilian zones are able to produce, in high proportions and potentially thermoshalophilic, peptidases. Further studies on those strains are required to fulfill some gaps in this study: quantitative analysis of individual proteases, as well as pH, temperature, and salinity gradient tests.

5. Acknowledgments

We thank CAPES for their financial aid and general assistance during the graduate program, and we also thank Chico Mendes Institute and Dr. Francisca Soares for the opportunity to carry out the collection of soil samples and consequent isolation of bacterial groups.

References

1. Vitolo M. Brief review on enzyme activity. *World Journal of Pharmaceutical Research*, 2020; 9(2): 60-76.
2. Mojsov K. Microbial alpha-amylases and their industrial applications: a review. *International Journal of Management, IT and Engineering (IJMIE)*, 2012; 2(10): 583-609.
3. Hoyos P, Hernáiz MJ, Alcántara AR. 3.28- Biocatalyzed production of fine chemicals. In: *Comprehensive Biotechnology*, Pergamon Oxford, 2017; 334-373.
4. Lim T, He Y, Park B, Choy Y, Hwang KT. Wheat gluten hydrolysates prepared by sequential treatment with different combinations of commercial proteases. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 2022; 1-11.
5. Alavi F Momen S. Aspartic proteases from thistle flowers: Traditional coagulants used in the modern cheese industry. *International Dairy Journal*, 2020; 107: 104709.
6. Gagaoua M, Dib AL, Lakhdara N, Lamri M, Botinestean C, Lorenzo JM. Artificial meat tenderization using plant cysteine proteases. *Current Opinion in Food Science*, 2021; 38: 177-188.
7. Vidmar B, Vodovnik M. Microbial keratinases: enzymes with promising biotechnological applications. *Food technology and biotechnology*, 2018; 56(3): 312-328.
8. Mamo J, Assefa F. The role of microbial aspartic protease enzyme in food and beverage industries. *Journal of Food Quality*, 2018; 2018.
9. Industrial Enzymes Market by Type (Carbohydrases, proteases, Lipases, Polymerases & Nucleases), Application (Food & Beverages, Bioethanol, Feed, Detergents, Wastewater, Soil, and Oil Treatment), Source, Formulation and Region – Global Forecast to 2026. <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/industrial-enzymes-market-237327836.html>. 2022
10. Singh R, Kumar M, Mittal A, Mehta PK. Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. *3 Biotech*, 2016; 6(2): 1-15.
11. Goel N, Fatima SW, Kumar S, Sinha R, Khare SK. Antimicrobial resistance in biofilms: Exploring marine actinobacteria as a potential source of antibiotics and biofilm inhibitors. *Biotechnology Reports*, 2021; 30: e00613.
12. Romeu E, Cavalcante F, Martins C, Martins SC. Atividade Lipolítica In Vitro De Actinobactérias Em Gradiente De Ph, Salinidade E Temperatura. *Enciclopédia Biosfera*, 2021; 17(38).
13. Cunha TJJ, Sa IB, Silva PCG. Semiárido brasileiro: pesquisa, desenvolvimento e inovação. Principais solos do Semiárido tropical brasileiro: caracterização, potencialidades, limitações, fertilidade e manejo. *Embrapa Semiárido*, 2017, 38.
14. Fernandez R, Ramachandran R, Nallakymmar K. Screening and characterization of protease producing marine actinobacteria *Streptomyces pactum* RA71 isolated from Pulicat Lake, Chennai, Tamil Nadu, India. *Asian Journal of Microbiology, Biotechnology, and Environmental Sciences* 20, 2018; 618-625.
15. Hankin L, Anagnostakis SL. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. *Mycologia*, 1975; 67(3): 597-607.
16. Javed Z, Tripathi GD, Mishra M, Dashora K. Actinomycetes–The microbial machinery for the organic-cycling, plant growth, and sustainable soil health. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2021; 31: 101893.
17. Sunita S, Archana L, Mahananda Z, Senhal J. Isolation and characterization of Actinomycetes from rhizosphere soil of different plants for antiphytopathogenic activity and stress tolerance. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 2015; 4(Special Issue 2): 379-387.
18. Silveira MAV, Batista dos Santos SM, Okamoto DN, de Melo, IS, Juliano MA, Ribeiro Chagas J, Vasconcellos SP. Atlantic Forest's and Caatinga's semiarid soils and their potential as a source for halothermotolerant actinomycetes and proteolytic enzymes. *Environmental Technology*, 2021; 1-13.
19. Planiyandi SA, Yang SH, Suh JW. Extracellular proteases from *S. treptomyces phaeopurpureus* ExP ro138 inhibit spore adhesion, germination and appressorium formation in *Colletotrichum coccodes*. *Journal of applied microbiology*, 2013; 115(1): 207-217.
20. Lamilla C, Pavez M, Santos A, Hermosilla A, Llanquinao V, Barrientos L. Bioprospecting for extracellular enzymes from culturable Actinobacteria from the South Shetland Islands, Antarctica. *Polar Biology*, 2017. 40(3): 719-726.
21. Janatiningrum I, Lestari Y. Enzyme production, antibacterial and antifungal activities of actinobacteria isolated from *Ficus deltoidea* rhizosphere. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 2022; 23

**APÊNDICE B – ARTIGO II COMPLETO PUBLICADO EM PERIÓDICO
INDEXADO**

Título do Artigo

Biotechnological Potential and Enzymes Produced by Actinobacteria from Semi-Arid Soils

Periódico

Enciclopédia Biosfera

ISSN: 2317-2606

Qualis Novo

C

Qualis Capes Quadriênio 2013-2016

Biotecnologia - B5

Volume

19

Issue

42

Páginas

134-152

Área

Biotecnologia

Ano de Publicação

2022

DOI

10.18677/EnciBio_2022D12



BIOTECHNOLOGICAL POTENTIAL AND ENZYMES PRODUCED BY ACTINOBACTERIA FROM SEMI-ARID SOILS

João Moreira de Matos Neto¹, Leonardo Lima Bandeira², Ariel de Figueiredo Nogueira Mesquita¹, Suzana Claudia Silveira Martins³, Claudia Miranda Martins³.

1. Bachelor's Degree in Biotechnology (undergraduate) – Federal University of Ceará. neto.j2802@gmail.com
2. Graduate Student - Ecology and Natural Resources - Federal University of Ceará 3. Professor in the Biology Department - Federal University of Ceará

Recebido em: 15/11/2022 – Aprovado em: 15/12/2022 – Publicado em: 30/12/2022
DOI: 10.18677/EnciBio_2022D12

ABSTRACT

Soil bacteria are known to be potential degraders of plant biomass, macromolecules, and complex polysaccharides such as xylan and cellulose. Among these microbes, actinobacteria produces various extracellular enzymes, which makes this phylum a major part of the soil microbial population responsible for the decomposition of various biomolecules. In general, the members of this phylum have unique structural and reproductive aspects within the Bacteria domain, such as the colony arrangement in branched hyphae, which integrate a radial mycelium, and reproduction via sporulation. Known as 'biofactories of enzymes', actinobacteria have applications as biorefineries, in pulp and paper industry, food, agriculture, pharmaceutical uses, and many others. Actinobacteria from extreme environments such as the semi-arid region of Brazil can also produce enzymes with novel properties such as substrate specificity and stability. Actinobacteria with the potential to be applied in biotechnological industries must have a large number of enzymes. These metabolic enzymes of laccase, lipase, cellulase, and amylase from these microbes provide the potential for production and uphold the industrial requirements for societal benefit and commercialization. This review highlights the structures of actinobacteria enzymes, basic concepts about this bacterial phylum, and biotechnology with particular attention to industrially relevant enzymes. **KEYWORDS:** Amylase, cellulase, laccase, *Streptomyces*, white biotechnology.

POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO E ENZIMAS PRODUZIDAS POR ACTINOBACTÉRIAS DE SOLOS SEMI-ÁRIDOS RESUMO

As bactérias do solo são conhecidas por serem potenciais degradadores de biomassa vegetal, macromoléculas e polissacarídeos complexos como xilana e celulose. Dentre esses microrganismos, as actinobactérias produzem diversas enzimas extracelulares, o que torna este filo a maior parte da população microbiana do solo responsável pela decomposição de diversas biomoléculas. Em geral, os membros deste filo apresentam aspectos estruturais e reprodutivos únicos dentro do domínio Bactéria, como o arranjo das colônias em hifas ramificadas, que integram um micélio radial, e a reprodução por esporulação. Conhecidas como "biofábricas de enzimas", as actinobactérias têm aplicações como biorrefinarias, na indústria de celulose e papel, alimentos, agricultura, usos farmacêuticos e muitos outros. Actinobactérias de ambientes extremos, como a

região semiárida do Brasil, também podem produzir enzimas com novas propriedades, como especificidade e estabilidade do substrato. Actinobactérias com potencial para serem aplicadas em indústrias biotecnológicas devem possuir um grande número de enzimas. Essas enzimas metabólicas de lacase, lipase, celulase e amilase desses micróbios fornecem o potencial de produção e sustentam os requisitos industriais para benefício e comercialização da sociedade. Esta revisão destaca as estruturas das enzimas de actinobactérias, conceitos básicos sobre este filo de bactérias e biotecnologia com atenção especial para enzimas industrialmente relevantes. **PALAVRAS-CHAVE:** Amilase, biotecnologia branca, celulase, lacase, *Streptomyces*

INTRODUCTION

Several studies have reported different solutions for industrial demands in terms of processes. Microorganisms with multifunctional traits are among the proposed solutions and have been found to, among many things, reduce the use of chemical fertilizers and pesticides by producing or releasing different types of bioactive enzymes, compounds, antimicrobial substances or biocontrol compounds (LIU *et al.*, 2018; KHOSHRU *et al.*, 2020).

The use of enzymes, which are catalysts that increase reaction rates of biological processes, has gained prominence in several industrial segments as an alternative to conventional methods (PINHEIRO *et al.*, 2021). The global enzyme market was valued at almost US\$10 billion in 2019 and is expected to increase at an annual rate. The growing interest in these biocatalysts compared to chemical catalysts can be attributed to their high specificity, the ability to operate under low energy consumption, mild temperature and pH conditions, and their positive environmental impact (GIRELLI *et al.*, 2020).

Actinobacteria can be the answer for this increasing industrial enzyme production, since they produce several biologically active and important secondary metabolites, such as anti-tumor, antimicrobial and antiviral compounds (PHAM *et al.*, 2019). Several actinobacteria have been reported to produce enzymes of industrial interest, such as proteases, amylases, and cellulases, but not only this but this bacterial phylum can also produce other enzymes such as lignin and laccase, which have had potential use for biotechnological purposes (GOHAIN *et al.*, 2020). Enzymes obtained from actinobacteria have high stability, availability, and productivity. Not only this, but are also low cost, have a sustainable production and are practical and ecofriendly, which makes them a great industry investment (FERREIRA *et al.*, 2020).

Regarding these enzymes, microbial cellulase plays a role in environmental issues. The actual trend in the cellulase market is genome mediated application of cellulase production by actinobacteria through the recombination technology (SAHOO *et al.*, 2019). Amylases can be applied as an additive in the detergent industry and also in the production of maltose syrup and biodegradation of food waste (KHAROUF *et al.*, 2021). Xylanases, as well as pectinases, can be used in the clarification of juices, production of bioethanol, in the bakery industry as an additive and in paper bleaching (WALIA *et al.*, 2017).

From this perspective, actinobacteria are a source of these enzymes with desirable characteristics. Therefore, this review seeks to show a little about these microorganisms, biotechnology, and how these enzymes are structured.

Biotechnology concept

Defined as the science of manipulating organisms, organic systems and processes in order to generate a social, environmental or industrial benefit, Biotechnology has been growing and establishing itself in the recent years. This is an area that was first

consolidated in the United States and that has recently been established in underdeveloped and developing countries, as is the case in Brazil (BARCELOS *et al.*, 2018).

As it is a highly plural and interdisciplinary field of knowledge, many problems have been associated with the definition of biotechnology since it was first mentioned by Karl Erkey in 1919, with its concept undergoing several changes over the decades (VERMA *et al.*, 2011).

To facilitate the understanding of the plurality of this area, Kafarski (2012) developed a color scheme associated with the areas of activity and application of biotechnology. The colors and their respective contexts are as follows:

- Yellow: Nutritional biotechnology is one of the oldest branches of biotechnology, whose main focus is food production. Important advances in this area are being made in order to improve food characteristics, with the modification of specific nutritional factors, increasing the availability of vitamins, or decreasing the presence of allergens, for example.

- Blue: Marine biotechnology is based on the study and application of natural resources from marine sources. The pelagic environment is a remarkable source of bioactive compounds of biotechnological interest, where algae, microalgae and other microorganisms present in it stand out. This area intersects with several other areas of biotechnology, since marine biotechnology can generate inputs applicable to several other branches of biotechnology.

- White: Industrial Biotechnology is based on the application of biocatalysts to industrial processes. The focus was on the replacement of traditional industrial processes, the production of specific action biopolymers, the production of alternative biofuels to fossil fuels and production of enzymes or microorganisms relevant to the industry. White biotechnology is considered to be the largest of the biotechnological domains and has special relevance within the area, directly competing with classic technologies.

- Grey: Environmental Biotechnology aims at solving problems of environmental interest, such as the treatment of industrial effluents, phytoremediation or bioremediation based on microorganisms from polluted areas, reuse of waste and recovery of degraded soils.

- Golden: Bioinformatics, Nanotechnology and Systems Biology.

- Brown: Biotechnology of deserts and arid zones, which is related to the management of natural resources in dry regions, where resource management is a critical point for the resident populations of these regions. Biotechnology, in this case, becomes a tool to help face the adversities found in arid zones, and can be used in the development of cultivars resistant to high soil salinity, with low water demands and resistant to phytopathogens.

- Black: Regards Bioterrorism and Biological Weapons. Not all aspects of biotechnology have a direct positive impact, as is the case of black biotechnology, which uses biotechnological tools to produce biological weapons.

- Green: Biotechnology applied to agriculture is considered the new phase of the green revolution. It uses biotechnological techniques to develop more fertile cultivars that are more resistant to biotic and abiotic stresses. This area also encompasses modern applications of biotechnology, such as micropropagation techniques and genetic engineering for the development of plants with artificially selected specific characteristics.

- Red: Biotechnology applied to health is involved with the preservation of human health, encompassing the production of new drugs, vaccines and antibiotics,

as well as the development of new regenerative therapies, synthetic organs, and new diagnostic methods.

- Violet: Represents Biotechnology Associated with Legislation and Bioethics. As biotechnology has become a constant concern in people's lives, both from the ethical-legislative point of view and from the layman's point of view, violet biotechnology emerged as a response to these problems, focused mainly on the discussion and resolution of such problems.

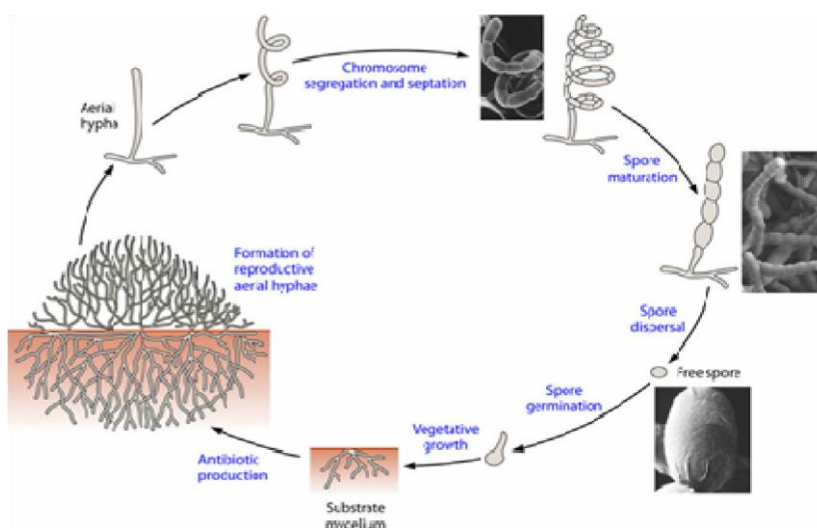
However, the author insists on emphasizing that the color system is incomplete, since biotechnology is an area in constant evolution and that new areas of knowledge can be developed and adapted to the schematization.

Actinobacteria

Actinobacteria or actinomycetes, as previously known, are Gram-positive filamentous prokaryotic microorganisms that have a high proportion ($\geq 55\%$) of guanine (G) and cytosine (C) in their genome (SEGARAN *et al.*, 2017). These microorganisms make up the largest and most taxonomically diverse phylum of the Eubacteria kingdom: the Actinobacteria phylum, which comprises a total of 23 orders and, until December 2015, 342 genera (EL OTHMANY *et al.*, 2021).

In general, members of this phylum have unique structural and reproductive aspects within the Bacteria domain (Figure 1), such as colony arrangement in branched hyphae, which integrate a radial mycelium, and reproduction via sporulation. Such characteristics are similar to those of filamentous fungi; however, at the cellular level, the cells that make up the hyphae have typical aspects of Gram-positive prokaryotic organisms: absence of a true nucleus, presence of chromosome organized in bacterial nucleoid, regions of cytoplasmic DNA, and presence of peptidoglycan cell wall. In the latter case, there is the exception of members of the order Corynebacteriales, where there is the development of a membrane external to the bacterial cell wall (LI *et al.*, 2016; RAHLWES; SPARKS; MORITA, 2019).

FIGURE 1 - Schematic representation of the life cycle of actinobacteria.



Source: Adapted from Barka *et al.*, (2016).

Given the structural characteristics of actinobacteria, the mycelium formed by the grouping of actinobacterial hyphae can generally be subdivided into three main types: vegetative or substrate mycelium, aerial mycelium, and reproductive mycelium or spore-bearing mycelium (LI *et al.*, 2016). Despite these generalist definitions, it is

important to point out that not all genera and species are fully adequate to the described characteristics, considering that only some of these are capable of effectively forming all the described structures.

Actinobacteria are intimately involved in key ecological functions, acting mainly as saprophytes: organic matter degrading beings that aid the return of carbon to its biogeochemical cycle (NALINI; PRAKASH, 2020). Furthermore, these prokaryotes are able to act as regulator to other microbial populations through the production of secondary metabolites that can perform antagonistic or symbiotic relations between others microorganism (RIBEIRO *et al.*, 2022), insects (RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ *et al.*, 2019) or plants, in this last quote, through the production of plant growth regulators or other type of vegetal hormones (BOUKHATEM *et al.*, 2022).

This actinobacterial metabolic robustness is needed to effectively perform so many functions and inhabit a range of environments, including those which possess extreme conditions: high salinity, high temperatures, high solar irradiation and low nutrient or water availability (SIVAKALA *et al.*, 2021) is what justifies their wide enzymatic potential and their vast number of produced bioactive molecules. Thus, actinobacteria are one of the most studied sources of composts of biotechnological interest, responsible for two thirds of all biotic related antibiotics (KALTENPOTH, 2009) and being widely studied as founts of secondary metabolites (HASSAN *et al.*, 2019; SALWAN; SHARMA, 2020), enzymatic inhibitors (SIDDHART *et al.*, 2019) and enzymes (ALVES *et al.*, 2016; ROMEU *et al.*, 2021; ELFRAMAWY *et al.*, 2022).

The vegetative mycelium is slender, transparent and highly branched, being the first structure formed from the germination of the dispersed form of the reproductive spores of another colony. It is responsible for the secretion of extracellular enzymes, absorption of nutrients presents in the medium and attachment of the colony to the substrate. (HAZARIKA; THAKUR, 2020). At a certain point in the life cycle of the actinobacterial colony, the vegetative mycelium tends to emerge from the substrate and form the so-called aerial mycelium. This mechanism is mainly triggered by the decrease in the availability of nutrients in the environment and characterized by the sudden change in the general characteristics of the hyphae, especially in their hydrophobicity characteristics.

Enzymes

Enzymes are lytic biomolecules of a mostly protein nature, responsible for key metabolic functions in any existing biological system. The performance of their metabolic charges is due to the ability of these macromolecules to recognize specific substrates and decrease the activation energy of the reactions that convert substrates into products and vice versa. The enzyme catalysis reaction is carried out through the joint action of two peptide portions of the enzymes: the binding site and the catalysis site. The binding site is responsible for the specificity of the binding of enzymes to their specific substrates and analogs, while the portion of the catalysis site is the peptide characterized by the presence of specific groups or ions that will be responsible for performing actual conversion reactions (VITOLLO, 2020).

The International Enzyme Commission (IEC) has classified a total of six major classes of enzymes according to the type of reaction catalyzed: Oxidoreductases [EC-1], Transferases [EC-2], Hydrolases [EC-3], Lyases [EC-4], Isomerases [EC-5] and Ligases [EC-6] (MOJISOV, 2012). Among these six classes, the hydrolases group has a certain prominence, since it brings together enzymes capable of using water molecules to carry out covalent bond breaking reactions, demonstrating unique importance in a physiological context, since they are responsible for the conversion of nutrients to monomeric or oligomeric subunits that are more easily used by the

organism and, due to the need for broad action, end up having a lower specificity to substrates (HOYO *et al.*, 2017).

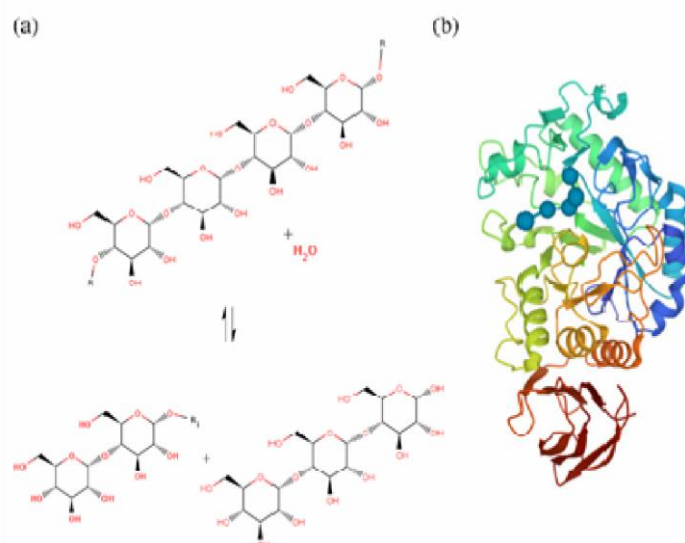
Capable of performing countless biological processes, enzymes are considered biomolecules of unparalleled biotechnological importance, subject to applications in almost all areas, such as agriculture, industry, environment, and health. The biotechnological interest involving these enzymes ends up turning more strongly to microbial sources, since microbial enzymes have less time and cost for production, higher yields and greater stability under extreme conditions. Furthermore, many microorganisms end up secreting several enzymes directly into the culture medium, which facilitates the downstream processes (GOPINATH, 2017).

Amylases

Starch is a glucose biopolymer resulting from the mixture of two other polysaccharides: amylose (α -1,4 bonds) and amylopectin (α -1,4 and α -1,6 bonds). This molecule is one of the main sources of energy for living beings and is produced and metabolized by different organisms. With the starch hydrolysis being mediated through the production of hydrolytic enzymes called amylases, which are subdivided into three groups: γ -Amylases, β -Amylases and α -Amylases [EC-3.2.1.1], the latter group being known to have a higher reaction rate compared to the other two.

Also known as glycosyl hydrolases, because the glycosidic bonds are their hydrolysis focus, these enzymes can be subdivided into two other subgroups depending on the site of enzymatic action on the starch molecules. Endoamylases hydrolyze the starch molecule randomly, forming oligosaccharides of different characteristics, while exoglucanases act only on the ends of the polysaccharide chains, forming D-glucose (monosaccharide) and Maltose (Disaccharide). (GOPINATH, 2017). The mechanism of starch hydrolysis mediated by α -Amylases and an example structure can be found in Figure 2.

FIGURE 2 – (a) Mechanism of action of starch hydrolysis mediated by α -Amylase (BRENDA) (b) Three-dimensional structure of α -Amylase isolated from *Bacillus subtilis* (RCSB PDB accession code: 1BAG).



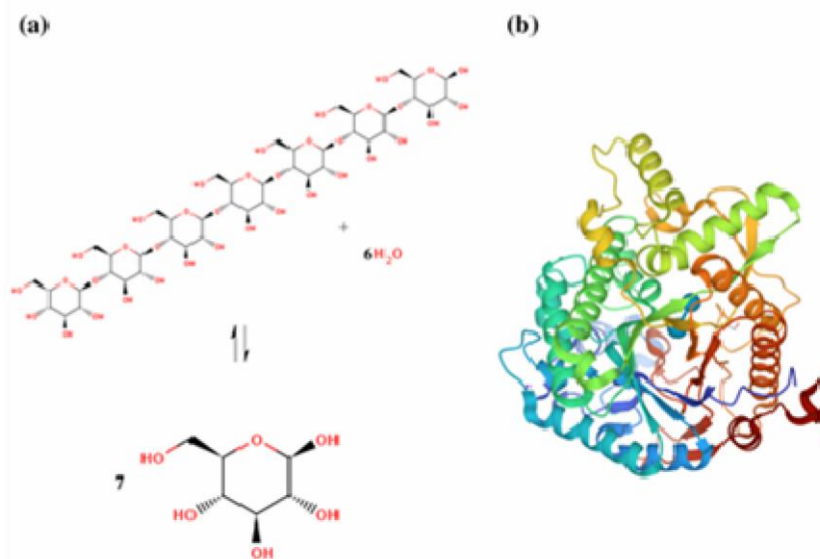
Source: Authors, (2022).

These hydrolases have diverse applications, capable of being applied in the food industry, in the starch conversion industry, in the detergent industry and in the pulp and paper industry (FAROOQ, 2021). In addition, the by-products of starch hydrolysis has several applications, especially in the food industry, where they are used as sweeteners, thickeners, gels, and texture controllers (WHISTLER; DANIEL, 2000).

Cellulases

Considered the most abundant biopolymer on earth, cellulose is a polysaccharide of D-glucose (β -1,4 bonds), characterized by the formation of an arrangement in crystalline microfibrils that conjugate to form the cellulose fiber. Due to these characteristics (disposition of microfibrils and type of glycosidic bond), cellulose is not a macromolecule easily metabolized by a good portion of living organisms, requiring a total of three enzymatic types for its total degradation: β glucosidases [EC-3.2. 1.21], exoglucanases [EC-3.2.1.91] and endoglucanases [EC3.2.1.4] (BEHERA; RAY, 2016). The main organisms responsible for its catalysis are of microbial origin, such as filamentous fungi (VIETO *et al.*, 2022), yeasts (SOHAIL *et al.* 2022) and bacteria (MSANGOSOKO *et al.*, 2021), mainly actinobacteria (ZAKALYUKINA *et al.*, 2021; SHARMA *et al.*, 2022). Elucidation of the mechanism of action and a structural example of β -glucosidase can be found in Figure 3.

FIGURE 3 - (a) Mechanism of action of β -glucosidasemediated hydrolysis mediated by β -glucosidase (BRENDA) (b) Three-dimensional structure of β -glucosidase isolated from *Neotermes koshunensis* (RCSB PDB accession code: 3VIK).



Source: Authors,

(2022).

Cellulolytic enzymes and microorganisms that produce these enzymes, in general, have diverse biotechnological applications, such as in agriculture (SILVA *et al.*, 2019), in waste treatment (SHARMA; KUMAWAT; KAUR, 2022), and in industries, such as detergents, pulp and paper, textiles, and in the fermentation of biomass into biofuels (KUMARI *et al.*, 2019; RAJKUMAR *et al.*, 2021).

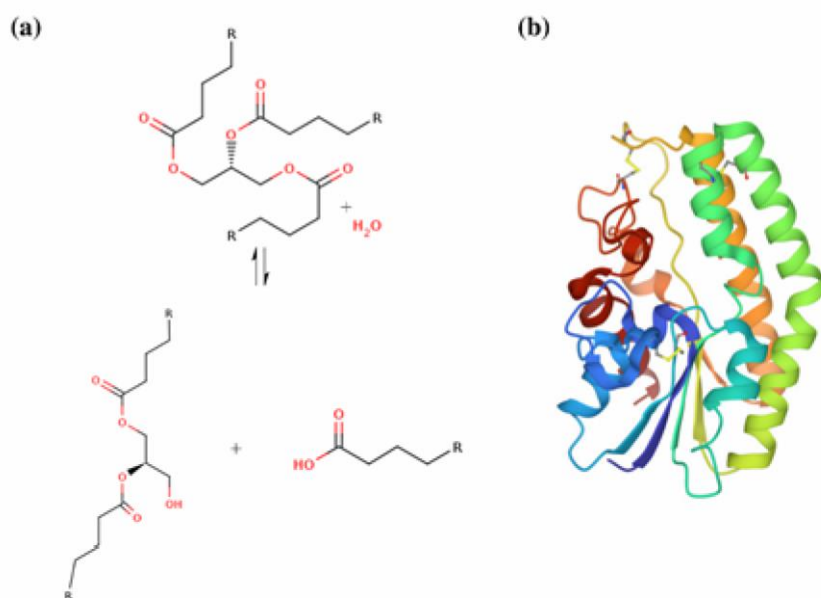
Lipases

Lipids are diverse biomolecules that play fundamental roles in metabolic homeostasis. These molecules can act as a source of cellular energy, molecular

signals, membrane components, among many other functions. In summary, lipids are nonpolar biomolecules, insoluble in water, and soluble in organic solvents. This class of molecules includes: triacylglycerols, defined as esters formed by the union of one glycerol molecule with three other fatty acids, which in turn are classified as longchain hydrocarbons that may or may not have unsaturations in their chains, with such unsaturations can be classified as cis or trans depending on their conformations; ester waxes, which are simple fatty acid molecules esterified to a fatty alcohol molecule; phospholipids, defined as two fatty acids esterified to an L-Glycerol-3phosphate; phosphosphingolipids, molecules similar to phospholipids, but which have an amino alcohol (sphingosine) esterified to a long-chain fatty acid; and sterols (SARGENT *et al.*, 2003; AHMED *et al.*, 2020;).

Lipases or triacylglycerol lipases [EC-3.1.1.3], in turn, are enzymes capable of degrading this diverse class of biomolecules. The mechanism of action associated with the lipase-mediated hydrolysis reaction of triacylglycerols and a structural example of a lipase are illustrated in Figure 4.

FIGURE 4- (a) Mechanism of action of triacylglycerol lipasemediated hydrolysis of triacylglycerol (BRENDA) (b) Threedimensional structure of lipase isolated from *Streptomyces rimosus* (RCSB PDB accession code: 5MAL).



Source: Authors, (20220).

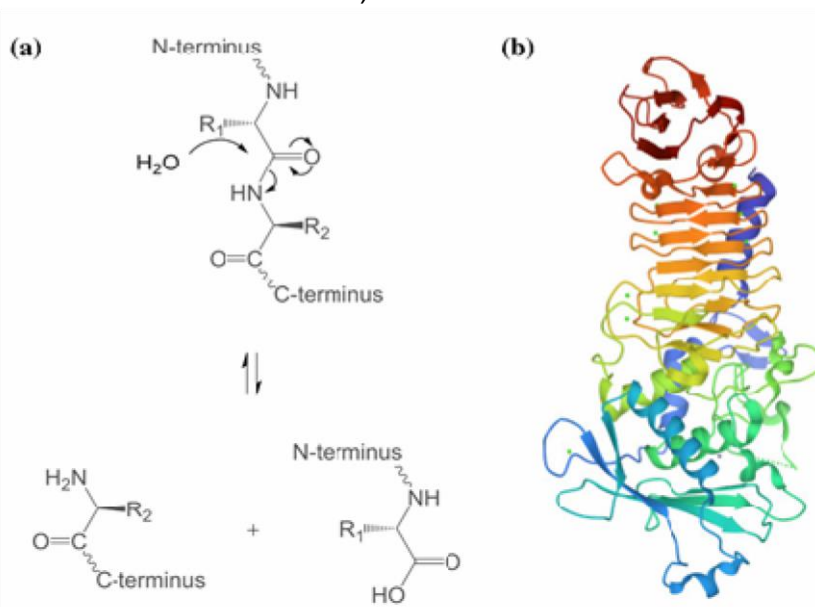
These enzymes hydrolyze esterified, transesterified and inter-esterified regions, being extremely versatile and applicable from a biotechnological point of view, and can be used in the production of biofuels (RACHMADONA *et al.*, 2020 ; CONSTANTINI; CALIFANO, 2021), as biosensors (HASANAH *et al.*, 2019), in the leather industry (MOUJEHED *et al.*, 2022; LI *et al.*, 2020), in the treatment of industrial effluents (RACHMADONA *et al.*, 2020), in the textile industry (EL MENOUFY *et al.*, 2022), in the oil, aroma and flavor, pharmaceutical industry (VANLEEJW *et al.*, 2019), among many others.

Proteases

Proteases or peptidases [EC-3.4] are an enzymatic subclass of the group of hydrolases that perform the cleavage of C-N bonds involving two amino acids (peptide bonds) in proteins and peptides. This class of enzymes, although quite unique in terms

of functionality, presents a certain structural plurality when analyzing its catalysis mechanisms (nucleophiles), thus they can be divided into six classes: serine peptidases [EC-3.4.21], glutamyl peptidases [3.4.21.19], cysteine peptidases [EC-3.4.22], aspartate peptidases [EC-3.4.23], metallopeptidases [EC- 3.4.24] and threonine peptidases (RAWLINGS; BATEMAN, 2019). The reaction mechanism of peptidases and a structural example can be found in Figure 5.

FIGURE 5 - (a) Reaction scheme of peptidases-mediated proteolysis hydrolysis (BRENDA) (b) Three-dimensional structure of psychrophilic protease isolated from *Pseudomonas sp.* (RCSB access code: 1H71).



Source: Authors, (2022).

These enzymes have a wide variety of biotechnological applications: representing one of the three largest groups of industrial enzymes, accounting for approximately 60% of enzyme world's income in the commercialization (MAMO; ASSEFA, 2018), a sector that is expected to reach a commercial value of approximately \$9.10 billion by the end of 2026 (Industrial Enzymes Market, 2022), subject to application in the beverage industry (CHOI *et al.*, 2019; LIM *et al.*, 2022), in the detergent industry as bioadditives (SALWAN; SHARMA, 2019), in the cheese industry as milk coagulants (ALAVI; MOMEN, 2020), in the meat industry as tenderizers (GAGAOUA *et al.*, 2021), in the cosmetics industry (VIDMAR; VODOVNIK, 2018), in effluent treatment (RAMAKODI *et al.*, 2020), as bioremediation molecules (KUMAR; JAIN, 2020), as a food supplement (WANG *et al.*, 2020), as well as countless other uses.

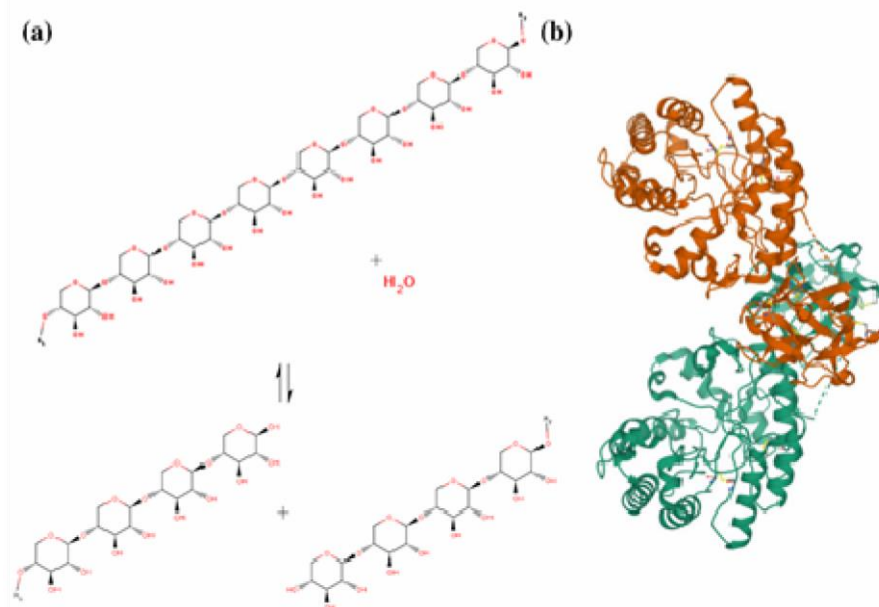
Xylanases

Xylan is the most abundant hemicellulose present in the cell walls of plants and algae and can make up about 30% of the dry mass of terrestrial plants. This polysaccharide consists of a backbone of D-xylose subunits joined by β -1,4 glycosidic bonds, which can be variable in terms of structure, being able to present itself as a purely linear polyxylose backbone, or as a heteropolysaccharide of diverse structure (BAJPAI, 2014).

Therefore, xylanases or xylanhydrolases [EC-3.2.1.8] are the main enzymes responsible for the xylan degradation process, that is, they are hydrolytic agents of β 1,4

glycosidic bonds (HECK *et al.*, 2005). The reaction mechanism of endoxylanases and a structural example can be found in Figure 6.

FIGURE 6 - (a) Reaction scheme for endoxylanase-mediated xylan hydrolysis (BRENDA) (b) Three-dimensional structure of endoxylanase isolated from *Streptomyces olivaceoviridis* (RCSB accession code: 1XYF).



Source: Authors, (2022)

The biotechnological potential associated with these enzymes is very broad, since xylan is a material of high bioavailability and can be used for the production of biofuels (BIBRA *et al.*, 2018; SHARMA *et al.*, 2020), in the industry of paper as a bleaching agent of biological origin (MHIRI *et al.*, 2020), in the food industry as a juice clarifier (ADIGUZEL *et al.*, 2019), as a poultry feed supplement (SINGH *et al.*, 2021), in the bread and wheat industry (BOTH *et al.*, 2021) and many others.

Laccases

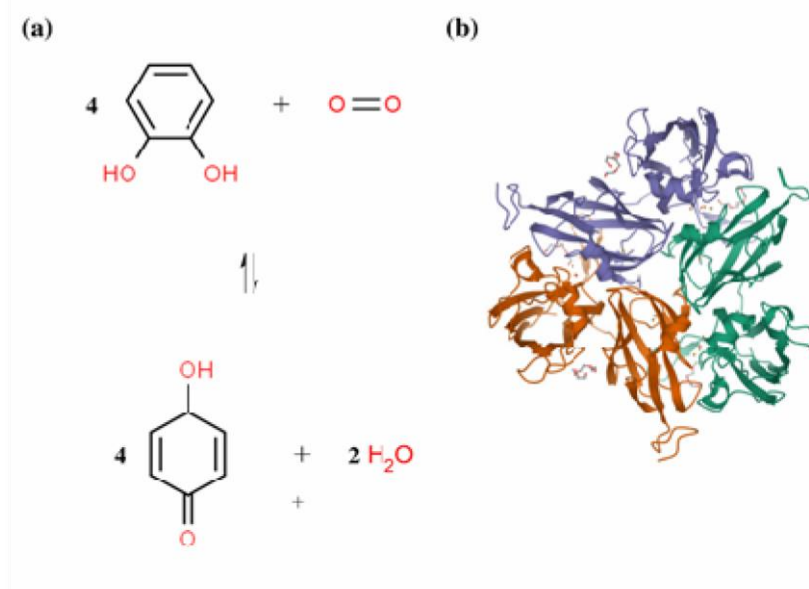
Laccases [EC-1.10.3.2], unlike all the other enzymatic classes mentioned, are not part of the group of hydrolases, but of the oxidoreductases, enzymes that catalyze the oxidation-reduction reaction in their substrates. In general, the laccase group encompasses lytic proteins that carry copper ions in their structure, being members of an enzymatic family called multicopper oxidases (MCOs), capable of oxidizing a wide range of substrates using oxygen gas molecules (O_2) as the final electron acceptor, reducing it to H_2O without releasing partially reduced by-products called reactive oxygen species (ROS). Laccases are capable of performing catabolic and anabolic nature, acting on the degradation of humus and lignin, in the synthesis of polymeric pigments, in the lignification process, in the synthesis of polyflavonoids and in the humidification of soil organic matter (JANUSZ *et al.*, 2020).

Although the enzymes that make up this enzymatic group have structural similarity to each other, they differ in regard to their redox potential. Laccases with high redox potential have a wider spectrum of action and are therefore more attractive from a biotechnological point of view (SUN *et al.*, 2021). It is possible to observe that a good part of low redox potential laccases can be found in plants, animals and bacteria, whereas enzymes of the same family with high redox potential are found mostly in fungi

(MUNK *et al.*, 2015), but can also be found in other organisms, such as actinobacteria (TRUBTSINA *et al.*, 2021).

The high bioremediation capacity that these enzymes have, especially in the degradation of azo dyes in the textile industry, makes this one of the main focuses of studies involving biotechnological applications of laccases (GOUD *et al.*, 2020; TRUBTSINA *et al.*, 2021; ADESANYA; ADESANYA, 2022). However, this does not exclude other applicability, as in humidification and composting (LI *et al.*, 2022), in the production of anticancer drugs, antioxidant hormone drugs, biosensors, and food product stabilizers (SENTHIVELAN *et al.*, 2016; KAUR *et al.*, 2022). Examples of a laccase-catalyzed reaction scheme and a three-dimensional model of this enzyme can be found in Figure 7.

FIGURE 7 - (a) Laccase-mediated oxidation-reduction reaction of benzenediol to benzosemiquinone (BRENDA) (b) Three-dimensional structure of laccase isolated from *Streptomyces coelicor* (RCSB accession code: 3CG8).



Source: Authors, (2022).

FINAL CONSIDERATIONS

The growing need for stable, multipurpose biocatalysts and the expected scaling of enzymatic market highlights the need for research of novel enzymes and exploration of biotechnological potential in areas not yet thoroughly explored. Actinobacteria isolated from multiple sources were already reported to produce many lytic proteins, including the ones presented in this review. The Brazilian semiarid region is a hotspot for this bacterial phylum and its extreme environment is characterized by high temperatures, saline soils and low water and nutrient availability. The aforementioned information combined with actinobacteria's high adaptability and ubiquitously distribution denotes that this understudied region can act as source of those prokaryotes for high throughput enzymatic production bioprocesses, suggesting a high potential not only for white biotechnology, but from related areas as green, red and grey biotechnology.

REFERENCES

- ADESANYA, A.; ADESANYA, V. A. Laboratory-Scale Study: Biodegradation of Bisphenol A (BPA) by Different Actinobacterial Consortium. In: **Actinobacteria - Diversity, Applications and Medical Aspects**, IntechOpen, 2022. DOI: 10.1016/j.procbio.2022.04.015
- ADIGUZEL, G.; FAIZ, O.; SISECIOGLU, M.; SARI, B.; BALTACI, O.; *et al.*; A novel endo- β -1, 4-xylanase from *Pediococcus acidilactici* GC25; purification, characterization and application in clarification of fruit juices. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 129, p. 571-578, 2019. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.02.054
- AHMED, S.; SHAH, P.; AHMED, O. Biochemistry, Lipids. **National Center for Biotechnology**, 2022. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK525952/>. Acesso em: 13 de novembro de 2022.
- ALAVI, F.; MOMEN, S. Aspartic proteases from thistle flowers: Traditional coagulants used in the modern cheese industry. **International Dairy Journal**, v. 107, p. 104709, 2020. DOI: 10.1016/j.idairyj.2020.104709
- ALVES, D.; SILVA, V.M.; GARCIA, F.; MARTINS, S.C.; MARTINS, C. Produção de celulase e amilase por actinobactérias do semiárido brasileiro. **Enciclopédia Biosfera**, v. 13, n. 24, 2016. DOI: 10.18677/EnciBio_2016B_121
- BAJPAI, P.; Chapter 2-Xylan: occurrence and structure. **Xylanolytic Enzymes**, v. 16, p. 9-18, 2014. DOI:10.1016/B978-0-12-801020-4.00002-0
- BARKA, E. A.; VATSA, P.; SANCHEZ, L.; GAVEAU-VAILLANT, N.; JACQUARD, C. *et al.* Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 80, n. 1, p. 1-43, 2016. DOI: 10.1128/MMBR.0001915
- BARCELOS, M. C.; LUPKI, F. B.; CAMPOLINA, G. A.; NELSON, D. L.; MOLINA, G. The colors of biotechnology: general overview and developments of white, green and blue areas. **FEMS Microbiology Letters**, v. 365, n. 21, p. fny239, 2018. DOI: 10.1093/femsle/fny239
- BEHERA, S. S.; RAY, R. C. Solid state fermentation for production of microbial cellulases: recent advances and improvement strategies. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 86, p. 656-669, 2016. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2015.10.090
- BIBRA, M.; KUNREDDY, V. R.; SANI, R. K. Thermostable xylanase production by *Geobacillus* sp. strain DUSELR13, and its application in ethanol production with lignocellulosic biomass. **Microorganisms**, v. 6, n. 3, p. 93, 2018. DOI: 10.3390/microorganisms6030093
- BOTH, J.; BIDUSKI, B.; GÓMEZ, M.; BERTOLIN, T. E.; FRIEDRICH, M. T. *et al.* Micronized whole wheat flour and xylanase application: dough properties and bread quality. **Journal of Food Science and Technology**, v. 58, n. 10, p. 3902-3912, 2021. DOI: 10.1007/s13197-020-04851-2

BOUKHATEM, Z. F.; MERABET, C.; TSAKI, H. Plant growth promoting actinobacteria, the most promising candidates as bioinoculants?. **Frontiers in Agronomy**, p. 14, 2022. DOI: 10.3389/fagro.2022.849911

CHOI, Y.; LIM, T.; HE, Y.; HWANG, K. T. Chemical characteristics and antioxidant properties of wheat gluten hydrolysates produced by single and sequential enzymatic hydrolyses using commercial proteases and their application in beverage system. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v. 13, n. 1, p. 745754, 2019. DOI: 10.1007/s11694-018-9987-x

COSTANTINI, A.; CALIFANO, V. Lipase immobilization in mesoporous silica nanoparticles for biofuel production. **Catalysts**, v. 11, n. 5, p. 629, 2021. DOI: 10.3390/catal11050629

EL OTHMANY, R.; ZAHIR, H.; ELLOUALI, M.; LATRACHE, H. Current Understanding on Adhesion and Biofilm Development in Actinobacteria. **International Journal of Microbiology**, v. 2021, 2021. DOI: 10.1155/2021/6637438

EL MENOIFY, H. A.; GOMAA, S. K.; HAROUN, A. A.; FARAG, A. N.; SHAFEI, M. S. *et al.* Comparative studies of free and immobilized partially purified lipase from *Aspergillus niger* NRRL-599 produced from solid-state fermentation using gelatincoated titanium nanoparticles and its application in textile industry. **Egyptian Pharmaceutical Journal**, v. 21, n. 2, p. 143, 2022. DOI: 10.4103/epj.epj_90_21

ELFRAMAWY, A.; EL-HANAFY, A.; SHARAMANT, M.; GHOZLAN, H. Molecular identification of native Egyptian Actinobacteria: Screening for lignin utilization and degradation of lignin model compounds. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 40, p. 102289, 2022. DOI: 10.1016/j.cbab.2022.102289

FERREIRA, J. S.; OLIVEIRA, D.; MALDONADO, R. R.; KAMIMURA, E. S.; FURIGO, A. Enzymatic pretreatment and anaerobic co-digestion as a new technology to highmethane production. **Applied microbiology and Biotechnology**, v. 104, n. 10, p. 4235-4246, 2020. DOI: 10.1007/s00253-020-10526-x

GAGAOUA, M.; DIB, A. L.; LAKHDARA, N.; LAMRI, M.; BOTINEȘTEAN, C. *et al.* Artificial meat tenderization using plant cysteine proteases. **Current Opinion in Food Science**, v. 38, p. 177-188, 2021. DOI: 10.1016/j.cofs.2020.12.002
GIRELLI, A. M.; ASTOLFI, M. L.; SCUTO, F. R. Agro-industrial wastes as potential carriers for enzyme immobilization: A review. **Chemosphere**, v. 244, p. 125368, 2020. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2019.125368

GOHAIN, A.; MANPOONG, C.; SAIKIA, R.; DE MANDAL, S. Actinobacteria: diversity and biotechnological applications. **Recent Advancements in Microbial Diversity**, p. 217-231, 2020. DOI: 10.1016/B978-0-12-821265-3.00009-8.

GOPINATH, S. C.; ANBU, P.; ARSHAD, M. M.; LAKSHMIPRIYA, T.; VOON, C. H. *et al.* Biotechnological processes in microbial amylase production. **BioMed Research International**, v. 2017, 2017. DOI: 10.1155/2017/1272193

GOUD, B. S.; CHA, H. L.; KOYYADA, G.; KIM, J. H. Augmented biodegradation of textile azo dye effluents by plant endophytes: a sustainable, eco-friendly alternative. **Current Microbiology**, v. 77, n. 11, p. 3240-3255, 2020. DOI:

10.1007/s00284-020-02202-0

HASANA, U.; SANI, N. D. M.; HENG, L. Y.; IDROES, R.; SAFITRI, E. Construction of a hydrogel pectin-based triglyceride optical biosensor with immobilized lipase enzymes. **Biosensors**, v. 9, n. 4, p. 135, 2019. DOI: 10.3390/bios9040135

HASSAN, Q. P.; BHAT, A. M.; SHAH, A. M. Bioprospecting actinobacteria for bioactive secondary metabolites from untapped ecoregions of the northwestern Himalayas. In: **New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering**. Elsevier, 2019. p. 77-85. DOI: 10.1016/B978-0-444-63504-4.00006-

2

HAZARIKA, S. N.; THAKUR, D. ACTINOBACTERIA. In: **Beneficial Microbes in Agro-Ecology**. Academic Press, 2020. p. 443-476. DOI: 10.1016/B978-0-12823414-3.00021-6

HECK, J. X.; FLÔRES, S. H.; HERTZ, P. F.; AYUB, M. A. Z. Optimization of cellulase-free xylanase activity produced by *Bacillus coagulans* BL69 in solid-state cultivation. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 1, p. 107-112, 2005..

HOYOS, P.; HERNÁIZ, M. J.; ALCÁNTARA, A. R. 3.28-Biocatalyzed production of fine chemicals. In: **Comprehensive Biotechnology**. Pergamon Oxford, 2017. p. 334-373. DOI: 10.1016/b978-0-08-088504-9.00225-7

Industrial Enzymes Market by Type (Carbohydrases, proteases, Lipases, Polymerases & Nucleases), Application (Food & Beverages, Bioethanol, Feed, Detergents, Wastewater, Soil, and Oil Treatment), Source, Formulation and Region – Global Forecast to 2026, **Markets and Markets**, 2022. Disponível em: <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/industrial-enzymes-market237327836.html> . Acesso em: 30 de out. De 2022.

JANUSZ, G.; PAWLIK, A.; ŚWIDERSKA-BUREK, U.; POLAK, J.; SULEJ, J. *et al.* Laccase properties, physiological functions, and evolution. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 3, p. 966, 2020. DOI: 10.3390/ijms21030966
KAFARSKI, P. Rainbow code of biotechnology. **Chemik**, v. 66, n. 8, p. 811-816, 2012.

KALTENPOTH, M. Actinobacteria as mutualists: general healthcare for insects?. **Trends in microbiology**, v. 17, n. 12, p. 529-535, 2009. DOI: 10.1016/j.tim.2009.09.006

KAUR, R.; SALWAN, R.; SHARMA, V. Structural Properties, Genomic Distribution of Laccases from *Streptomyces* and Their Potential Applications. **Process Biochemistry**, 2022. DOI: 10.1016/j.procbio.2022.04.015

KHEROUF, M.; HABBECHÉ, A.; BENAMIA, F.; SAOUDI, B.; KEROUAZ, B. *et al.* Statistical optimization of a novel extracellular alkaline and thermostable amylase production from thermophilic *Actinomadura keratinilytica* sp. Cpt29 and its potential

application in detergent industry. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 35, p. 102068, 2021. DOI: 10.1016/j.bcab.2021.102068

KHOSHRU, B.; MOHARRAMNEJAD, S.; GHARAJEH, N. H.; LAJAYER, B. A.; GHORBANPOUR, M. Plant microbiome and its important in stressful agriculture. In: **Plant Microbiome Paradigm**. Springer, Cham, 2020. p. 13-48. DOI: 10.1007/978-3-030-50395-6_2

KUMAR, L.; JAIN, S. K. Role of Proteases in Bioremediation of Temple ProteinContaining Waste with Special Reference to Mangalnath, Ujjain (MP)–India. **Indian Journal of Pure and Applied Biosciences**, v. 8, n. 3, p. 602-607, 2020. DOI: 10.18782/2582-2845.8178

KUMARI, S.; SHARMA, U.; KRISHNA, R.; SINHA, K.; KUMAR, S. Screening and molecular characterization of cellulase producing actinobacteria from Litchi Orchard. **Current Chemical Biology**, v. 13, n. 1, p. 90-101, 2019. DOI: 10.2174/2212796812666180718114432

LI, S.; SUN, K.; LATIF, A.; SI, Y.; GAO, Y. *et al.* Insights into the Applications of Extracellular Laccase-Aided Humification in Livestock Manure Composting. **Environmental Science & Technology**, 2022. DOI: 10.1021/acs.est.1c08042

LI, Q.; CHEN, X.; JIANG, Y.; JIANG, C. Morphological identification of actinobacteria. **Actinobacteria-basics and Biotechnological Applications**, p. 5986, 2016. DOI: 10.5772/61461

LIU, K.; MCINROY, J. A.; HU, C. H.; KLOEPPER, J. W. Mixtures of plant-growthpromoting rhizobacteria enhance biological control of multiple plant diseases and plant-growth promotion in the presence of pathogens. **Plant Dis**, 102 (2018), pp. 67-72. DOI: 10.1094/PDIS-04-17-0478-RE

MAMO, J.; ASSEFA, F. The role of microbial aspartic protease enzyme in food and beverage industries. **Journal of Food Quality**, v. 2018, 2018. DOI: 10.1155/2018/7957269

MHIRI, S.; BOUANANE-DARENED, A.; JEMLI, S.; NEIFAR, S.; AMERI, R. *et al.* A thermophilic and thermostable xylanase from *Caldicoprobacter algeriensis*: Recombinant expression, characterization and application in paper biobleaching. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 164, p. 808817, 2020. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.07.162

MSANGOSOKO, K.; BHATTACHARYA, R.; RAMAKRISHNAN, B.; SHARMA, K.; SUBRAMANIAN, S. Cellulolytic activity of gut bacteria isolated from the eri silkworm larvae, *Samia ricini*, (Lepidoptera: Saturniidae). **International Journal of Tropical Insect Science**, v. 41, n. 4, p. 2785-2794, 2021. DOI: 10.1007/s42690-021-00459-x

MOJSOV, K. Microbial alpha-amylases and their industrial applications: a review. **International Journal of Management, IT and Engineering (IJMIE)**, v. 2, n. 10, p. 583-609, 2012.

MOUJEHED, E.; ZARAI, Z.; KHEMIR, H.; MILED, N.; BCHIR, M. S. *et al.* Cleaner degreasing of sheepskins by the *Yarrowia lipolytica* LIP2 lipase as a chemical-free alternative in the leather industry. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 211, p. 112292, 2022. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2021.112292

MUNK, L.; SITARZ, A. K.; KALYANI, D. C.; MIKKELSEN, J. D.; MEYER, A. S. Can laccases catalyze bond cleavage in lignin?. **Biotechnology advances**, v. 33, n. 1, p. 13-24, 2015. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2014.12.008

NALINI, M. S.; PRAKASH, H. S. Actinobacteria: diversity, plant interactions and biotechnology applications. In: **Plant Microbiomes for Sustainable Agriculture**. Springer, Cham, 2020. p. 199-244. DOI: 10.1007/978-3-030-38453-1_7

PHAM, J. V.; YILMA, M. A.; FELIZ, A.; MAJID, M. T.; MAFFETONE, N. *et al.* A review of the microbial production of bioactive natural products and biologics. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 1404, 2019. DOI: 10.3389/fmicb.2019.01404

PINHEIRO, V. E.; FERREIRA, J. A.; BETINI, J. H. A.; KAMIMURA, E. S.; POLIZELI, M. L. Utilizing a novel fungal enzymatic cocktail as an eco-friendly alternative for cellulose pulp biobleaching. **BioResources**, v. 16, n. 4, p. 7509-7529, 2021. DOI: 10.1080/14786419.2014.968157

RACHMADONA, N.; HARADA, Y.; AMOAH, J.; QUAYSON, E.; AZNURY, M. *et al.* Integrated bioconversion process for biodiesel production utilizing waste from the palm oil industry. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 10, n. 3, p. 107550, 2022. DOI: 10.1016/j.jece.2022.107550

RAHLWES, K. C.; SPARKS, I. L.; MORITA, Y. S. Cell walls and membranes of Actinobacteria. **Bacterial Cell Walls and Membranes**, p. 417-469, 2019. DOI: 10.1007/978-3-030-18768-2_13

RAJKUMAR, J.; DILIPAN, E.; RAMACHANDRAN, M.; PANNEERSELVAM, A.; THAJUDDIN, N. Bioethanol production from seagrass waste, through fermentation process using cellulase enzyme isolated from marine actinobacteria. **Vegetos**, v. 34, n. 3, p. 581-591, 2021. DOI: 10.1007/s42535-021-00239-5

RAMAKODI, M. P.; SANTHOSH, N.; PRAGADEESH, T.; MOHAN, S. V.; BASHA, S. Production of protease enzyme from slaughterhouse effluent: an approach to generate value-added products from waste. **Bioresource Technology Reports**, v. 12, p. 100552, 2020. DOI: 10.1016/j.biteb.2020.100552

RAWLINGS, N. D.; BATEMAN, A. Origins of peptidases. **Biochimie**, v. 166, p. 4-18, 2019. DOI: 10.1016/j.biochi.2019.07.026

RIBEIRO, G. A. L.; MESQUITA, A. F. N.; BANDEIRA, L. L.; CAVALCANTE, F. G.; MARTINS, S. C. S.; MARTINS, C. M. In vitro antagonism of actinobacteria against rhizobia from the soil. **Enciclopédia Biosfera**, v. 19, n. 41, 2022. DOI: 10.18677/EnciBio_2022C15

RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ, D.; MELO, W. G.; MENEGATTI, C.; LOURENZON, V. B.; DO NASCIMENTO, F. S. *et al.* Actinobacteria associated with stingless bees

biosynthesize bioactive polyketides against bacterial pathogens. **New Journal of Chemistry**, v. 43, n. 25, p. 10109-10117, 2019. DOI: 10.1039/C9NJ01619H

ROMEU, E.; CAVALCANTE, F.; MARTINS, C.; MARTINS, S. C. Atividade lipolítica in vitro de actinobactérias em gradiente de pH, salinidade e temperatura. **Enciclopédia Biosfera** v. 18, n. 38, 2021. DOI: 10.18677/EnciBio_2021D7

SAHOO, K.; SAHOO, R. K.; GAUR, M.; SUBUDHI, E. Isolation of cellulase genes from thermophiles: a novel approach toward new gene discovery. In: **New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering**. Elsevier, 2019. p. 151-169. DOI: 10.1016/B978-0-444-63503-7.00009-7

SALWAN, R.; SHARMA, V. Molecular and biotechnological aspects of secondary metabolites in actinobacteria. **Microbiological research**, v. 231, p. 126374, 2020. DOI: 10.1016/j.micres.2019.126374

SALWAN, R.; SHARMA, V. Trends in extracellular serine proteases of bacteria as detergent bioadditive: alternate and environmental friendly tool for detergent industry. **Archives of microbiology**, v. 201, n. 7, p. 863-877, 2019. DOI: 10.1007/s00203-019-01662-8

SARGENT, J. R.; TOCHER, D. R.; BELL, J. G. The lipids. **Fish nutrition**, p. 181-257, 2003. DOI: 10.1016/B978-012319652-1/50005-7

SEGARAN, G.; SUNDAR, R. D. V.; SETTU, S.; SHANKAR, S.; SATHIAVELU, M. A review on endophytic actinomycetes and their applications. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 9, n. 10, p. 152-158, 2017.

SENTHIVELAN, T.; KANAGARAJ, J.; PANDA, R. C. Recent trends in fungal laccase for various industrial applications: an eco-friendly approach-a review. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 21, n. 1, p. 19-38, 2016. DOI: 10.1007/s12257-015-0278-7

SHARMA, S.; KUMAWAT, K. C.; KAUR, S. Potential of indigenous ligno-cellulolytic microbial consortium to accelerate degradation of heterogenous crop residues. **Environmental Science and Pollution Research**, p. 1-16, 2022. DOI: 10.1007/s11356-022-21809-3

SHARMA, D.; CHAUDHARY, R.; KAUR, J.; ARYA, S. K. Greener approach for pulp and paper industry by Xylanase and Laccase. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 25, p. 101604, 2020. DOI: 10.1016/j.bcab.2020.101604

SIDDHARTH, S. Isolation and characterization of bioactive compounds with antibacterial, antioxidant and enzyme inhibitory activities from marine-derived rare actinobacteria, *Nocardioopsis* sp. SCA21. **Microbial pathogenesis**, v. 137, p. 103775, 2019. DOI: 10.1016/j.micpath.2019.103775

SILVA, V. M.; MENESES, A. C.; MESQUITA, S.; MARTINS, C.; MARTINS, S. C. Atividade pectinolítica de rizóbios de região semiárida. **Enciclopédia Biosfera**, v. 16, n. 29, 2019. DOI: 10.18677/EnciBio_2019A135

SINGH, A. K.; MISHRA, B.; BEDFORD, M. R.; JHA, R. Effects of supplemental xylanase and xylooligosaccharides on production performance and gut health variables of broiler chickens. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 12, n. 1, p. 1-15, 2021. DOI: 10.1186/s40104-021-00617-8

SIVAKALA, K. K.; GUTIÉRREZ-GARCÍA, K.; JOSE, P. A.; THINESH, T.; ANANDHAM, R. *et al.* Desert environments facilitate unique evolution of biosynthetic potential in *Streptomyces*. **Molecules**, v. 26, n. 3, p. 588, 2021. DOI: 10.3390/molecules26030588

SOHAIL, M.; BARZKAR, N.; MICHAUD, P.; JAHROMI, S. T.; BABICH, O. *et al.* Cellulolytic and xylanolytic enzymes from yeasts: Properties and industrial applications. **Molecules**, v. 27, n. 12, p. 3783, 2022. DOI: 10.3390/molecules27123783

SUN, K.; LI, S.; SI, Y.; HUANG, Q. Advances in laccase-triggered anabolism for biotechnology applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 41, n. 7, p. 969993, 2021. DOI: 10.1080/07388551.2021.1895053

TRUBITSINA, L. I.; ABDULLATYPOV, A. V.; LARIONOVA, A. P.; TRUBITSIN, I. V.; ALFEROV, S. V. *et al.* Expression of thermophilic two-domain laccase from *Catenuloplanes japonicus* in *Escherichia coli* and its activity against triarylmethane and azo dyes. **PeerJ**, v. 9, p. e11646, 2021. DOI: 10.7717/peerj.11646

VANLEEUEW, E.; WINDERICKX, S.; THEVISSSEN, K.; LAGRAIN, B.; DUSSELIER, M. *et al.* Substrate-specificity of *Candida rugosa* lipase and its industrial application. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 7, n. 19, p. 1582815844, 2019. DOI: 10.1021/acssuschemeng.9b03257

VIDMAR, B.; VODOVNIK, M. Microbial keratinases: enzymes with promising biotechnological applications. **Food technology and biotechnology**, v. 56, n. 3, p. 312-328, 2018. DOI: 10.17113/ftb.56.03.18.5658

VIETO, S.; ESCUDERO-LEYVA, E.; AVENDAÑO, R.; RECHNITZER, N.; BARRANTES-MADRIGAL, M. D. *et al.* Biodeterioration and cellulolytic activity by fungi isolated from a nineteenth-century painting at the National Theatre of Costa Rica. **Fungal Biology**, v. 126, n. 2, p. 101-112, 2022. DOI: 10.1016/j.funbio.2021.11.001

VITOLO, M. Brief review on enzyme activity. **World Journal of Pharmaceutical Research**, v. 9, n. 2, p. 60-76, 2020. DOI: 10.20959/wjpr20202-16660

WALIA, A.; GULERIA, S.; MEHTA, P.; CHAUHAN, A.; PARKASH, J. Microbial xylanases and their industrial application in pulp and paper biobleaching: a review. **3 Biotech**, v. 7, n. 1, p. 1-12, 2017. DOI:10.1007/s13205-016-0584-6.

WANG, Q. D.; LI, S.; ZHANG, K. Y.; ZHANG, Y.; BAI, S. P. *et al.* Protease supplementation attenuates the intestinal health damage caused by low-protein diets in Pekin ducks. **Poultry Science**, v. 99, n. 12, p. 6630-6642, 2020. DOI: 10.1016/j.psj.2020.10.012

WHISTLER, R. L.; DANIEL, J. R. Starch. **Kirk Othmer Encyclopedia of Chemical Technology**, 2000. DOI: 10.1002/0471238961.1920011823080919.a01

ZAKALYUKINA, Y. V.; ZAYTSEV, A. R.; BIRYUKOV, M. V. Study of cellulosedestroying activity of actinobacteria associated with ants. **Moscow University Biological Sciences Bulletin**, v. 76, n. 1, p. 20-27, 2021. DOI: 10.3103/S0096392521010065

ANEXO A – TABELA DE COLORAÇÃO DE MICÉLIOS DAS CEPAS

<i>Cepa</i>	<i>Localização</i>	<i>Micélio Aéreo</i>	<i>RAL</i>	<i>Micélio Reverso</i>	<i>RAL</i>	<i>P. Difuso</i>
SN1	UBJ	Pearl Mouse Grey	7048	Silk Grey	7044	-
SN2	UBJ	Pale Brown	8025	Pearl Mouse Grey	7048	-
SN3	UBJ	Pure White	9010	Signal Violet	4008	-
SN4	UBJ	Quartz Grey	7039	Silk Grey	7044	-
SN5	UBJ	Beige Grey	7006	Oyster White	1013	-
SN6	UBJ	Pale Brown	8025	Pearl Mouse Grey	7048	-
SN7	UBJ	Signal White	9003	Pure White	9010	-
SN8	UBJ	Beige Grey	7006	Silk Grey	7044	-
SN9	UBJ	Beige Grey	7006	Silk Grey	7044	-
SN10	UBJ	Beige Grey	7006	Grey Brown	8019	-
SN11	UBJ	Grey White	9002	Grey Brown	8019	-
SN12	UBJ	Pale Brown	8025	Beige Grey	7006	-
SN13	UBJ	Pale Brown	8025	Beige Grey	7006	-
SN14	7CI	Beige Grey	7006	Platinum Grey	7036	-
SN15	7CI	Beige Grey	7006	Grey Brown	8019	-
SN16	7CI	Cream	9001	Cream	9001	-
SN17	AIU	Cream	9001	Cream	9001	-
SN18	AIU	Traffic White	9016	Cream	9001	-
SN19	AIU	Pale Brown	8025	Beige Grey	7006	-
SN20	UBJ	Beige Grey	7006	Beige Grey	7006	-
SN21	AIU	Grey White	9002	Papyrus White	9018	-
SN22	AIU	Cream	9001	Cream	9001	-
SN23	AIU	Tarpaulin Grey	7010	Tarpaulin Grey	7010	+
SN24	AIU	Cream	9001	Cream	9001	-
SN25	AIU	Pure White	9010	Traffic White	9016	-
SN26	AIU	Beige Grey	7006	Pearl Mouse Grey	7048	-
SN27	AIU	Ivory	1014	Ivory	1014	-
SN28	AIU	Quartz Grey	7039	Moss Grey	7003	-
SN29	AIU	Saffron Yellow	1017	Saffron Yellow	1017	-
SN30	AIU	Pure White	9010	Saffron Yellow	1017	-
SN31	AIU	Traffic White	9016	Traffic White	9016	-
SN32	UBJ	Papyrus White	9018	Grey White	9002	-
SN33	UBJ	Traffic White	9016	Signal White	9003	-
SN34	UBJ	Beige Grey	7006	Pearl Mouse Grey	7048	-
SN35	UBJ	Beige Grey	7006	Dusty Grey	7037	-
SN36	UBJ	Pure White	9010	Signal Violet	4008	-
SN37	UBJ	Traffic White	9018	Traffic White	9018	-
SN38	UBJ	Beige Grey	7006	Traffic White	9018	-
SN39	UBJ	Pure White	9010	Claret Violet	4004	+
SN40	UBJ	Signal Grey	7004	Silk Grey	7044	+
SN41	UBJ	Beige Grey	7006	Signal Grey	7004	-
SN42	UBJ	Pure White	9010	Papyrus White	9018	-
SN43	UBJ	White Aluminium	9006	White Aluminium	9006	-
SN44	UBJ	Cream	9001	Cream	9001	-
SN45	UBJ	Pearl Mouse Grey	7048	White Aluminium	9006	-

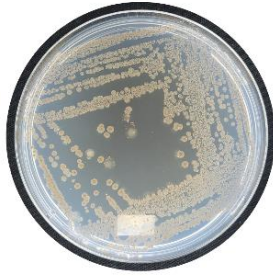
Fonte: Autor, 2022.

ANEXO B – DIVERSIDADE DE MICÉLIOS AÉREOS

SN1



SN2



SN3



SN4



SN5



SN6



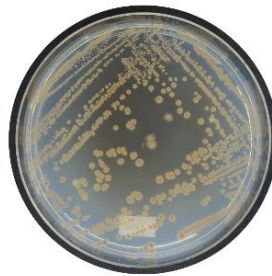
SN7



SN8



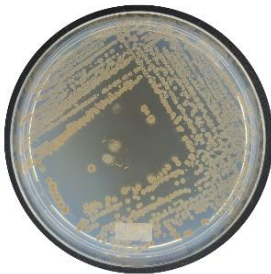
SN9



SN10



SN11



SN12



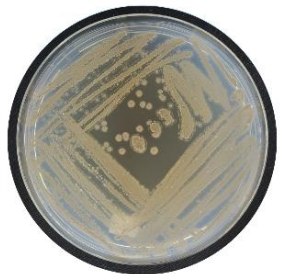
SN13



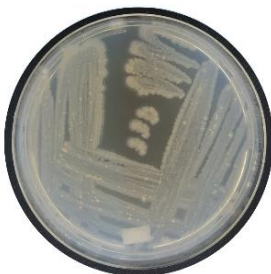
SN14



SN15



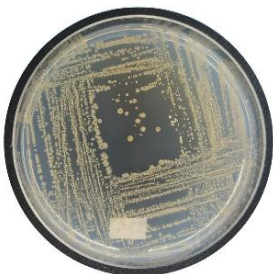
SN16



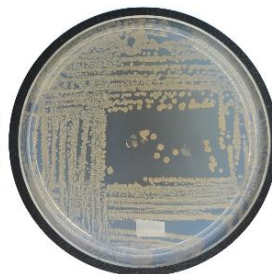
SN17



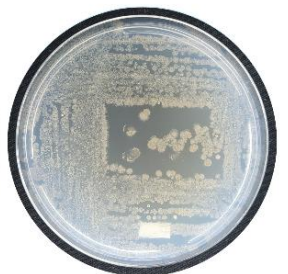
SN18



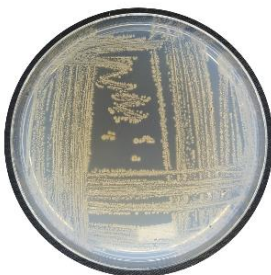
SN19



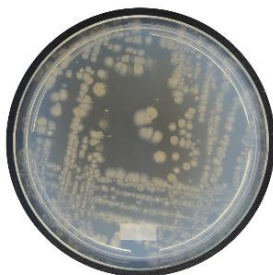
SN20



SN21



SN22



SN23



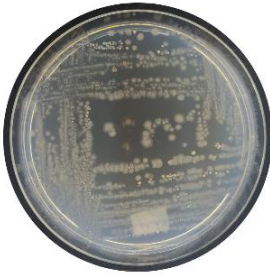
SN24



SN25



SN26



SN27



SN28



SN29



SN30



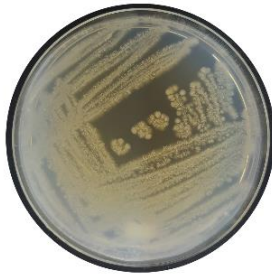
SN31



SN32



SN33



SN34



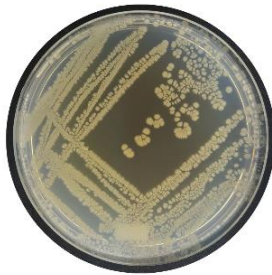
SN35



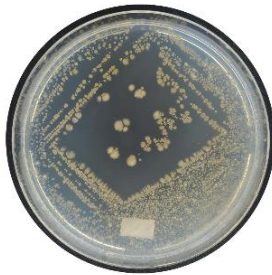
SN36



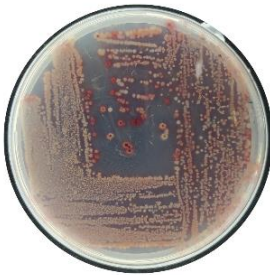
SN37



SN38



SN39



SN40



SN41



SN42



SN43



SN44



SN45



ANEXO C – DIVERSIDADE DE MICÉLIOS VEGETATIVOS

SN1



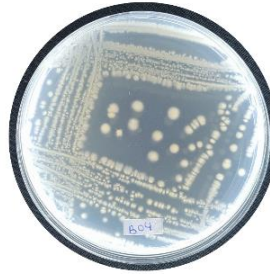
SN2



SN3



SN4



SN5



SN6



SN7



SN8



SN9



SN10



SN11



SN12



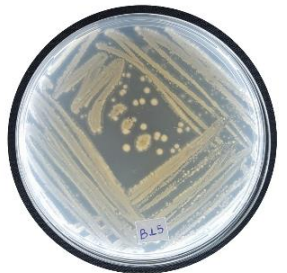
SN13



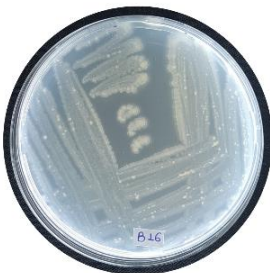
SN14



SN15



SN16



SN17



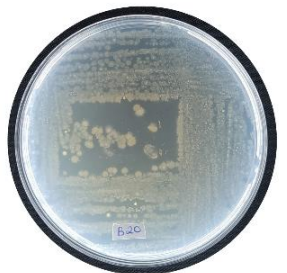
SN18



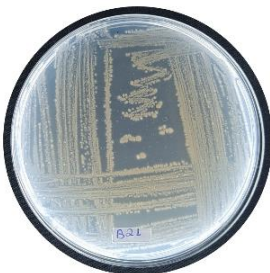
SN19



SN20



SN21



SN22



SN23



SN24



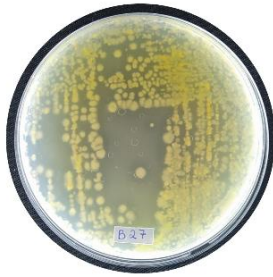
SN25



SN26



SN27



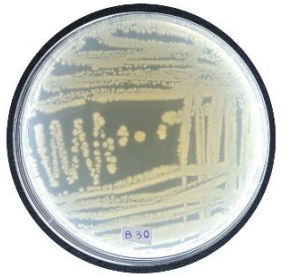
SN28



SN29



SN30



SN31



SN32



SN33



SN34



SN35



SN36



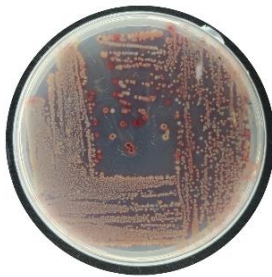
SN37



SN38



SN39



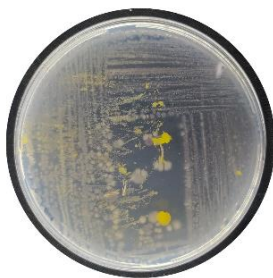
SN40



SN41



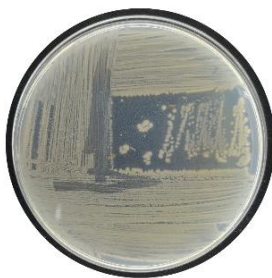
SN42



SN43



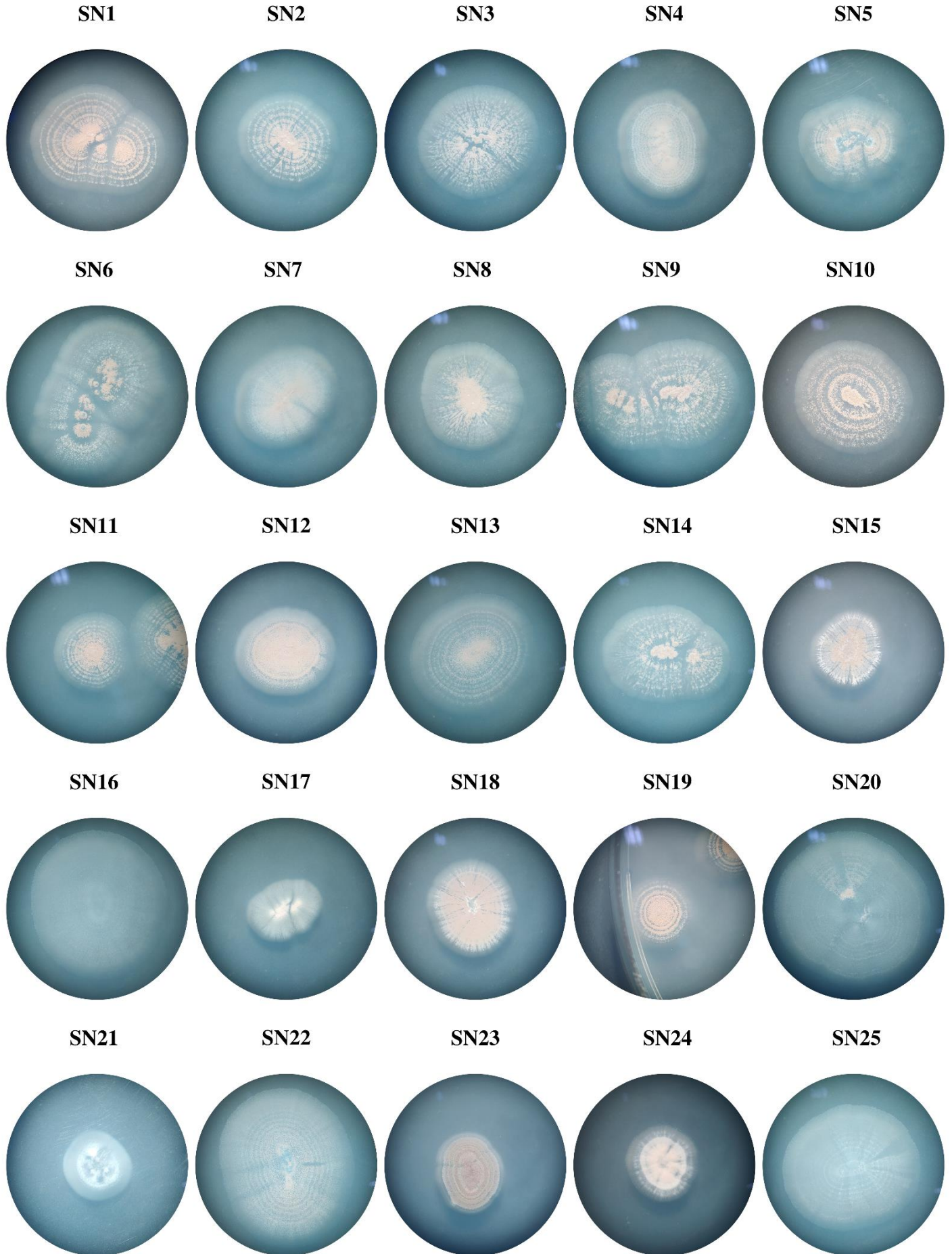
SN44



SN45



ANEXO D – DIVERSIDADE DE COLÔNIAS INDIVIDUAIS



SN26



SN27



SN28



SN29



SN30



SN31



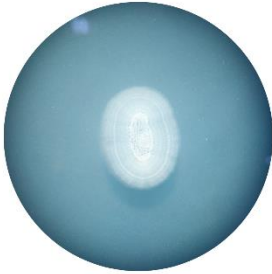
SN32



SN33



SN34



SN35



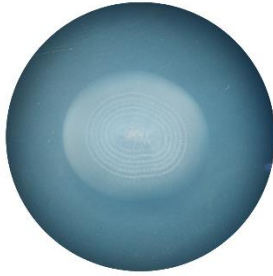
SN36



SN37



SN38



SN39



SN40



SN41



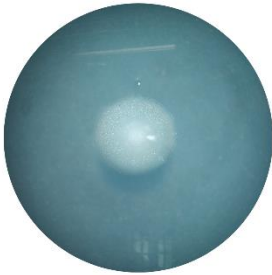
SN42



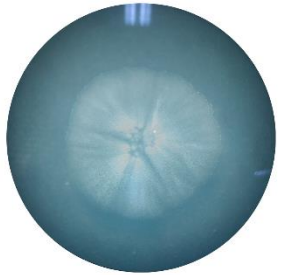
SN43



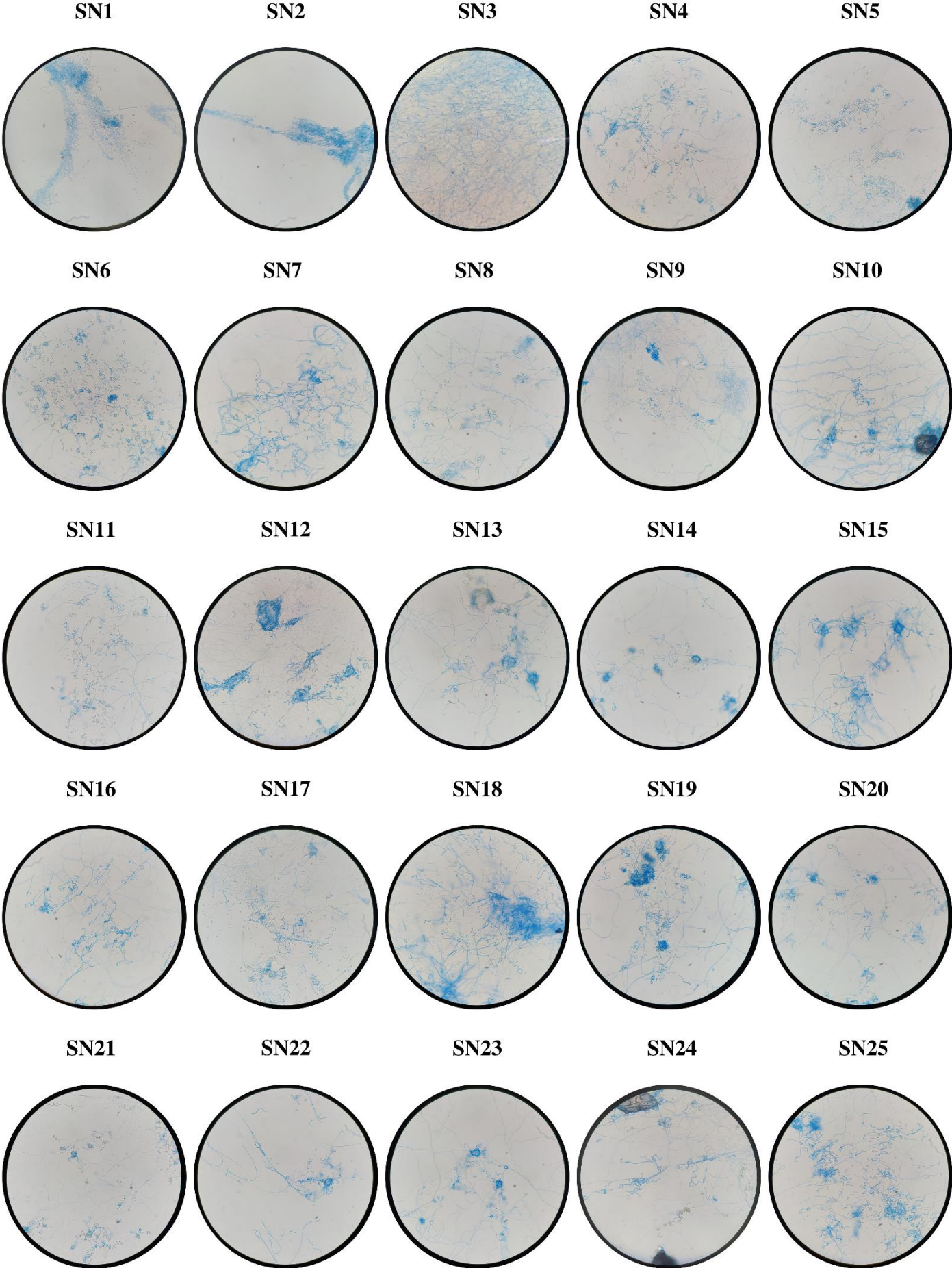
SN44



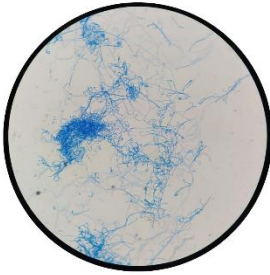
SN45



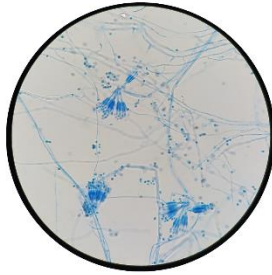
ANEXO E – RESULTADOS DAS LEITURAS DO MICROCULTIVO



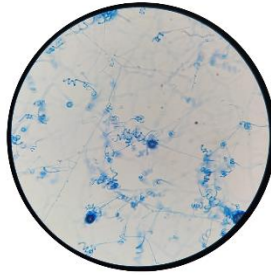
SN26



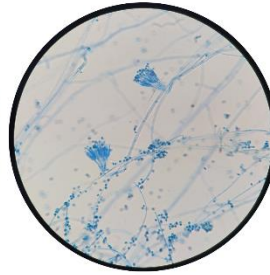
SN27



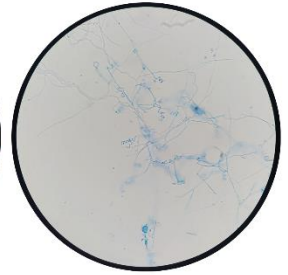
SN28



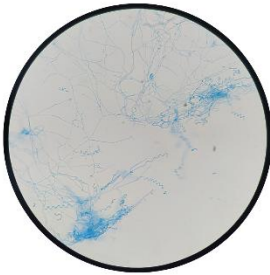
SN29



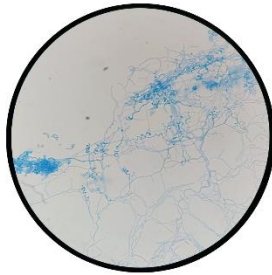
SN30



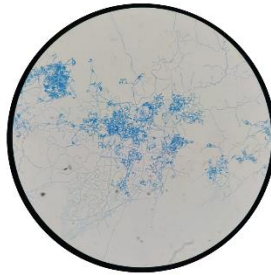
SN31



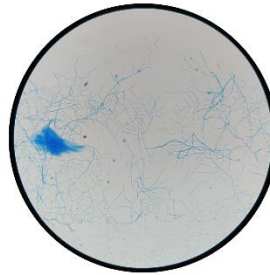
SN32



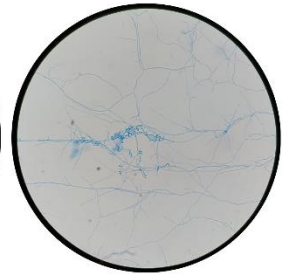
SN33



SN34



SN35



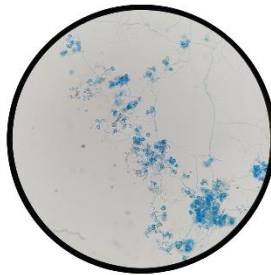
SN36



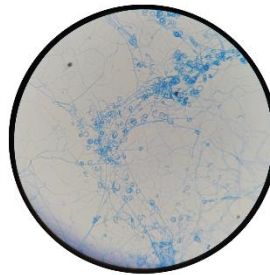
SN37



SN38



SN39



SN40



SN41



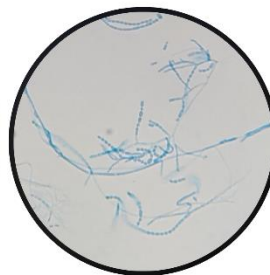
SN42



SN43



SN44



SN45

