



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

CENTRO DE CIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR

BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

LAÍS OLIVEIRA LEITE

**CINÉTICA DE CRESCIMENTO DE *Bacillus subtilis* ATCC 6633 E
ATIVIDADES PROTEOLÍTICA E CELULOLÍTICA EM MEIOS DE
CULTURA FORMULADOS A PARTIR DO HIDROLISADO ÁCIDO DA
MACROALGA VERMELHA *Solieria filiformis***

**FORTALEZA
2022**

LAÍS OLIVEIRA LEITE

CINÉTICA DE CRESCIMENTO DE *Bacillus subtilis* ATCC 6633 E ATIVIDADES
PROTEOLÍTICA E CELULOLÍTICA EM MEIOS DE CULTURA FORMULADOS A
PARTIR DO HIDROLISADO ÁCIDO DA MACROALGA VERMELHA *Solieria*
filiformis

Trabalho de conclusão de curso apresentado
ao curso de Graduação em Biotecnologia do
Centro de Ciências da Universidade Federal
do Ceará, como requisito parcial à obtenção
do grau de Bacharela em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Márjory Lima
Holanda Araújo

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)

- L554c Leite, Laís Oliveira.
Cinética de crescimento de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 e atividades proteolítica e celulolítica em meios de cultura formulados a partir do hidrolisado ácido da macroalga vermelha *Solieria filiformis* / Laís Oliveira Leite. – 2022.
53 f. : il. color.
- Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Física, Fortaleza, 2022.
Orientação: Profa. Dra. Májory Lima Holanda Araújo.
1. Bioprocessos. 2. Proteases. 3. Celulases. 4. Recursos Renováveis. I. Título.

CDD 530

LAÍS OLIVEIRA LEITE

CINÉTICA DE CRESCIMENTO DE *Bacillus subtilis* ATCC 6633 E ATIVIDADES
PROTEOLÍTICA E CELULOLÍTICA EM MEIOS DE CULTURA FORMULADOS A
PARTIR DO HIDROLISADO ÁCIDO DA MACROALGA VERMELHA *Solieria*
filiformis

Trabalho de conclusão de curso apresentado
ao curso de Graduação em Biotecnologia do
Centro de Ciências da Universidade Federal
do Ceará, como requisito parcial à obtenção
do grau de Bacharela em Biotecnologia.

Aprovada em: 13/12/2022.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Márjory Lima Holanda Araújo

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Daniele de Oliveira Bezerra de Sousa

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Me. Francisco Ewerton de Sousa Lima

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Aos meus pais, Marco Aurélio e Andréia.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Marco Aurélio e Andréia, por todo o esforço feito ao longo da vida para me proporcionarem as melhores oportunidades, a melhor educação e pelo apoio familiar nos momentos mais difíceis.

À professora Márjory, pela orientação, pela confiança, pelos ensinamentos nas disciplinas do curso ministradas por ela e pelas oportunidades que me foram oferecidas no BioAP.

Aos professores Humberto Henrique e Cláudia Miranda, por cederem os equipamentos e o espaço de seus laboratórios para que eu conseguisse proceder com os experimentos.

Aos membros da banca examinadora, professora Daniele e Ewerton, que se disponibilizaram para fazer parte de um momento tão importante para mim e para ajudar a melhorar meu trabalho.

Aos professores da graduação, por todos os conhecimentos compartilhados e pelo incentivo no meu desenvolvimento pessoal como cientista.

Aos integrantes do LAMAB, Fernando e Leo, por se disponibilizarem para me ajudar na pesquisa, por tirarem minhas dúvidas e por serem ótimas pessoas para se conviver e ter uma amizade.

Ao Ewerton, pela ótima recepção que me foi oferecida no BioAP, pela paciência ao me ensinar sobre a linha de pesquisa, pela disponibilidade em me ajudar e tirar minhas dúvidas, por me acompanhar e me ajudar a me tornar uma pesquisadora melhor, por ser um ótimo co-orientador e um bom amigo.

Aos meus amigos do BioAP Bruno, Mariana, Rudá e Lorena, que me ajudaram nas atividades do laboratório, me acompanharam nessa jornada e a tornaram mais fácil.

Aos meus melhores amigos e irmãos que me foram dados pela graduação, Ariel, Bruno, João Neto e Amanda, a quem sou eternamente grata pelo apoio nos momentos mais difíceis e por todas as vivências e risadas que compartilhamos juntos.

À minha namorada Ariane, minha melhor amiga e companheira, por me ajudar a não desistir durante esse difícil processo, por sempre me incentivar a ser uma versão melhor de mim mesma e por fazer eu me sentir amada.

Aos meus amigos da T8 Gabi Sobral, Livia Pontes, Livia Cardoso, Otávio Hugo, Gabrielle Fernandes, Caio Correia, Igor Ferreira, Ítalo Gomes, Samuel Castro, Maria Eduarda Escócia, Matheus Finger, Jhennyfer de Oliveira, Francisco Augusto, Ana Leticia Cacao, Rebeca Carlos e Camila Sillos, por toda a ajuda ao longo do curso, pelas memórias compartilhadas e por serem a melhor turma do mundo.

Aos meus outros amigos de outras turmas Gabi Mesquita, Arthur Vieira, Daniel Maciel, Eric Mendes, Samille Yvna e Thiago Amorim, pelo companheirismo, pelos momentos vividos, por todas as conversas que tivemos e pela amizade verdadeira.

À Universidade Federal do Ceará (UFC) e à Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) pela infraestrutura e pela bolsa de iniciação científica.

“Na vida, não existe nada a se temer, apenas a ser compreendido.” (Marie Curie)

RESUMO

Nas últimas décadas, desafios globais induzidos por alterações climáticas e poluição ambiental têm mostrado a necessidade do desenvolvimento de meios de produção sustentáveis, ecologicamente corretos e econômicos. Nesse contexto, a biomassa algácea, um recurso natural renovável, cultivado no mar e com grande sequestro de carbono atmosférico, tem despertado muito interesse de pesquisadores nos últimos anos para geração de energia e insumos industriais. O presente trabalho objetiva utilizar o hidrolisado ácido-térmico da biomassa de *S. filiformis* como meio rico em carboidratos para a produção de enzimas de *Bacillus subtilis*. A hidrólise ácida da biomassa algácea foi realizada a 121 °C, H₂SO₄ 0,5 M por 20 min. Após filtração e o ajuste do pH do filtrado, o hidrolisado foi utilizado para compor dois meios para fermentação: hidrolisado não diluído (HID) e hidrolisado diluído (H_{1:1}) com NaCl 0,15 M na proporção 1:1 (v/v). O meio controle foi caldo nutritivo contendo glicose (CN_{glic}). O inóculo foi preparado em CN_{glic} por 24 h em agitação a 150 rpm e sob incubação a 37 °C. As fermentações foram realizadas em duplicatas a 37 °C sob orbital de 150 rpm por 72 h. A contagem de células viáveis em placa foi realizada. O extrato enzimático foi obtido a partir da centrifugação a 9.900 xg por 10 min dos meios após fermentação. As atividades proteolítica e celulolítica foram medidas. O meio HID apresentou o melhor crescimento de *B. subtilis*, com uma concentração máxima de células de 4,17 x 10¹³ UFC/mL às 48 h de fermentação. Os meios H_{1:1}, HID e CN_{glic} apresentaram, respectivamente, concentrações máximas de enzimas proteolíticas de 4,90 U/mL, 28,05 U/mL e 45,20 U/mL nos tempos de cultivo 58h, 24h e 48h, e concentrações máximas de enzimas celulolíticas de 0,017 U/mL, 0,050 U/mL e 0,019 U/mL nos tempos 72h, 72h e 48h, respectivamente. Os meios H_{1:1} e HID se mostraram meios promissores para processos fermentativos e para a produção de enzimas proteolíticas e celulolíticas de *B. subtilis*.

Palavras-chave: Bioprocessos, Proteases, Celulases, Recursos Renováveis.

ABSTRACT

In recent decades, the global challenges induced by climate and environmental changes have shown the need to develop environmentally friendly and chemical means of production. In this context, algal biomass, a renewable natural resource, cultivated in the sea and with great atmospheric carbon fixation, has aroused much research interest in recent years for energy generation and industrial inputs. The present work aims to use the thermal-acid hydrolyzate from the biomass of *S. filiformis* as a medium rich in carbohydrates for the production of *Bacillus subtilis* enzymes. Acid hydrolysis of algal biomass was performed at 121°C, 0.5 M H₂SO₄ for 20 min. After filtration and pH adjustment of the filtrate, the hydrolyzate was used to compose two fermentation media: undiluted hydrolyzate (HID) and diluted hydrolyzate (H_{1:1}) with 0.15 M NaCl in a 1:1 ratio (v/v). The control medium was a nutrient broth containing glucose (CN_{glc}). The inoculum was prepared in CN_{glc} for 24 h in mandatory at 150 rpm and under incubation at 37 °C. The fermentations were carried out in duplicates at 37 °C under orbital of 150 rpm for 72 h. The plate viable cell count was performed. The enzymatic extract was obtained from centrifugation at 9,900 xg for 10 min of the media after fermentation. Proteolytic and cellulolytic activities were measured. The HID medium showed the best growth of *B. subtilis*, with a maximum cell concentration of 4.17 x 10¹³ CFU/mL at 48 h of fermentation. The H_{1:1}, HID and CN_{glc} media demonstrated, respectively, maximum activity of proteolytic enzymes of 4.90 U/mL, 28.05 U/mL and 45.20 U/mL in the culture times of 58h, 24h and 48h, and maximum activity of cellulolytic enzymes of 0,017 U/mL, 0,050 U/mL and 0,019 U/mL at 72h, 72h and 48h, respectively. The H_{1:1} and HID media are known to be promising media for fermentation processes and for the production of proteolytic and cellulolytic enzymes from *B. subtilis*.

Keywords: Bioprocesses, Proteases, Cellulases, Renewable Resources.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição bioquímica das algas vermelhas.....	19
Tabela 2 - Concentração de açúcares obtida a partir da hidrólise ácida com ácido sulfúrico de diferentes espécies de algas em condições de hidrólise variáveis.....	36
Tabela 3 - Resultado da contagem de células das amostras dos meios H1:1 e HID e parâmetros cinéticos de crescimento de <i>B. subtilis</i> ATCC 6633.....	40

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Atividade proteolítica dos extratos enzimáticos provenientes do cultivo de *B. subtilis* em meios de cultura formulados com o hidrolisado de *Solieria filiformis* e com glicose.....42
- Figura 2 – Atividade celulolítica dos extratos enzimáticos provenientes do cultivo de *B. subtilis* em meios de cultura formulados com o hidrolisado de *Solieria filiformis* e com glicose.....45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CO ₂	Dióxido de Carbono
pH	Potencial Hidrogeniônico
H ₂ SO ₄	Ácido Sulfúrico
Ca(OH) ₂	Hidróxido de Cálcio
CaSO ₄	Sulfato de Cálcio
ART	Açúcares Redutores Totais
U	Unidade de Atividade Enzimática
CMC	Carboximetilcelulose
DNS	Ácido 3,5-dinitrosalicílico
UV	Radiação Ultravioleta
MgSO ₄	Sulfato de Magnésio
H ₂ O	Água
KH ₂ PO ₄	Fosfato de Monopotássio
UFC	Unidades Formadoras de Colônias

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
β	Beta
%	Porcentagem
μ	Velocidade Específica de Crescimento
M	Molar
m	Mili

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
1.1	Algas marinhas como matéria prima renovável.....	17
1.1.1	<i>Composição bioquímica das macroalgas.....</i>	18
1.2	Biorrefinaria de algas como alternativa para a produção de biomoléculas.....	20
1.3	Hidrólise ácida da biomassa de macroalgas vermelhas.....	21
1.4	<i>Bacillus subtilis</i> como biofábrica de enzimas.....	22
1.5	Enzimas e suas aplicações na indústria.....	23
1.5.1	<i>Proteases.....</i>	24
1.5.2	<i>Celulases.....</i>	24
2	OBJETIVOS.....	26
2.1	Objetivo geral.....	26
2.2	Objetivos específicos.....	26
3	METODOLOGIA.....	27
3.1.1	<i>Solieria filiformis.....</i>	27
3.1.2	<i>Bacillus subtilis ATCC 6633.....</i>	27
3.2	Hidrólise ácido-térmica da biomassa algácea.....	28
3.2.1	<i>Determinação de carboidratos totais.....</i>	28
3.2.2	<i>Quantificação de açúcares redutores totais.....</i>	29
3.2.3	<i>Quantificação de proteínas solúveis.....</i>	29
3.3	Formulação dos meios de cultivo para crescimento bacteriano.....	30
3.4	Produção de crescimento bacteriano de <i>Bacillus subtilis</i> no hidrolisado ácido de <i>S. filiformis</i>.....	30
3.5	Contagem de células viáveis e obtenção do extrato enzimático.....	31
3.6	Cálculo dos parâmetros cinéticos de crescimento bacteriano.....	31
3.7	Atividade enzimática.....	32
3.7.1	<i>Proteolítica.....</i>	32
3.7.2	<i>Celulolítica.....</i>	33
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
4.1	Hidrólise ácido-térmica da biomassa algácea.....	35
4.2	Cinética de crescimento de <i>B. subtilis</i> ATCC 6633.....	38
4.3	Atividade enzimática.....	41

4.3.1	Proteolítica.....	41
4.3.2	Celulolítica.....	44
5	CONCLUSÃO.....	47
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48
	ANEXO A – VALORES DE ATIVIDADE PROTEOLÍTICA DOS EXTRATOS ENZIMÁTICOS PROVENIENTES DO CULTIVO DE <i>Bacillus subtilis</i> EM MEIOS DE CULTURA FORMULADOS COM O HIDROLISADO DE <i>Solieria filiformis</i> E COM GLICOSE.....	54
	ANEXO B – VALORES DE ATIVIDADE CELULOLÍTICA DOS EXTRATOS ENZIMÁTICOS PROVENIENTES DO CULTIVO DE <i>Bacillus subtilis</i> EM MEIOS DE CULTURA FORMULADOS COM O HIDROLISADO DE <i>Solieria filiformis</i> E COM GLICOSE.....	55

1 INTRODUÇÃO

1.1 Algas marinhas como matéria-prima renovável

As algas marinhas são organismos fotossintetizantes que vivem predominantemente em ambiente aquático, e são responsáveis pela produção de grande parte do oxigênio disponível no planeta. Além de possuírem grande diversidade de nutrientes na sua composição, também apresentam componentes que podem ser aplicados em diferentes setores para a obtenção de produtos que tragam benefícios ou melhorem o bem-estar humano, como na indústria de alimentos, graças ao seu rico conteúdo de proteínas e carboidratos, e na indústria farmacêutica, por suas atividades antioxidantes já previamente elucidadas na literatura (MARINHO *et al.*, 2019).

Atualmente, o desenvolvimento e a utilização de tecnologias sustentáveis estão atraindo mais atenção no mundo devido ao crescimento populacional e à grande demanda energética, ao esgotamento das reservas de combustíveis fósseis, ao aquecimento global e à deterioração do meio ambiente (LAKSHMI *et al.*, 2020). As algas são capazes de utilizar luz solar com alta eficiência, o que pode resultar em um aumento da biomassa e uma maior assimilação de dióxido de carbono (CO₂). Em comparação à biomassa terrestre, as algas apresentam um maior potencial de remediação de CO₂ presente na atmosfera e é capaz de transformar esse composto e assimilá-lo na forma de lipídios, carboidratos e outras biomoléculas que podem ser usadas para a produção de energia renovável (JOHN *et al.*, 2011).

As algas contêm vários compostos químicos bioativos e metabólitos secundários que podem ser empregados nas indústrias farmacêutica e nutracêutica, de cosméticos, de fertilizantes e em setores alimentícios. Fibras alimentares, antioxidantes, aminoácidos vitais, vitaminas, ácidos graxos poliinsaturados e minerais são abundantes na sua composição e podem ser utilizados em diversos aspectos. As algas marinhas são as principais fontes de ágar, carragenana e alginato, que são substâncias de grande interesse comercial (PRADHAN *et al.*, 2022). Além disso, são uma excelente matéria-prima para a produção de biocombustíveis e são uma importante fonte de produtos químicos de alto valor, como ácidos graxos poliinsaturados, carotenóides, ficobilinas e polissacarídeos (LAKSHMI *et al.*, 2020).

A utilização de macroalgas como matéria-prima para a produção de produtos de interesse comercial oferece várias vantagens em comparação com a utilização de matérias-primas de biomassa de primeira e segunda geração, como as lignocelulósicas. Por exemplo, as algas marinhas possuem um alto teor de polissacarídeos estruturais e baixos teores de lignina, características que contribuem para a geração de carboidratos fermentescíveis após hidrólise ácida com baixos teores de ácido, tempo e temperatura (ALBUQUERQUE *et al.*, 2021).

Desta forma, as macroalgas marinhas são consideradas uma excelente matéria-prima com um grande potencial de fornecer nutrientes para a multiplicação de microrganismos que podem servir como biofábricas para a produção de substâncias de alto valor agregado e que sejam de interesse para a indústria (JOHN *et al.*, 2011).

1.1.1 Composição bioquímica das macroalgas

Atualmente, apenas uma minoria das espécies conhecidas de algas marinhas é cultivada, e o conhecimento acerca da composição bioquímica de grande parte dessas espécies ainda é escasso. Além disso, estudos mostraram variação significativa na composição da biomassa intraespécies dependendo de fatores abióticos como luz, temperatura, minerais ou estação do ano, muitos dos quais dependem de onde, geograficamente, a alga vem crescendo. Assim, espécies adequadas para a produção futura de biomassa de algas marinhas podem diferir de lugar para lugar, e o conhecimento local é necessário para avaliar as espécies potenciais em uma base regional (OLSSON *et al.*, 2020).

A capacidade de extrair componentes e gerar produtos de forma eficiente para diferentes aplicações da biomassa de algas marinhas tem sido amplamente vista como relacionada à composição das espécies (HARRYSSON *et al.*, 2018). As algas marinhas contêm carboidratos, proteínas, lipídios e cinzas como seus principais constituintes. Em geral, um alto teor de carboidratos é necessário para utilização em processos de fermentação, assumindo que os polissacarídeos podem ser quebrados em açúcares fermentescíveis mais simples (OLSSON *et al.*, 2020).

A costa brasileira possui uma grande diversidade de espécies de algas vermelhas (Rhodophytas), e dentre elas está a espécie *Solieria filiformis* (Gigartinales, Solieriaceae), que é abundante na região do nordeste (DE CASTRO *et al.*, 2017). De acordo com o trabalho

realizado por De Castro *et al.*, 2017, o conteúdo de carboidratos na composição da macroalga *S. filiformis* é de cerca de 65,8 %, o que torna a sua biomassa promissora para a obtenção de açúcares fermentescíveis a partir da quebra dos polissacarídeos disponíveis, e demonstra seu potencial como substrato para a produção de compostos químicos de alto valor agregado por bioconversão. Como é demonstrado na Tabela 1, quando comparada às outras algas vermelhas em questão, *S. filiformis* apresenta um dos maiores conteúdos de carboidratos na sua composição. Além disso, é uma macroalga adaptada ao clima tropical, é facilmente cultivada no litoral cearense, e é um recurso renovável de fácil obtenção em grandes quantidades, que são fatores-chave para a escolha da sua utilização no presente trabalho.

Tabela 1 – Composição bioquímica das algas vermelhas

Espécies	Carboidratos (%)	Proteínas (%)	Lipídios (%)	Cinzas (%)	Umidade (%)	Referência
<i>Solieria filiformis</i>	65,8	9,6	1,7	15,9	7,0	De Castro <i>et al.</i> , 2017
<i>Kappaphycus alvarezii</i>	63,7	-	-	21,3	13,3	Hargreaves <i>et al.</i> , 2013
<i>K. alvarezii</i>	73,7	5,1	1,0	14,5	4,7	Sjamsiah, Ramli, Daik, Yarmo & Ajdari, 2013
<i>Gracilaria gracilis</i>	46,6	20,2	0,6	24,8	8,0	Rodrigues <i>et al.</i> , 2015
<i>Hypnea musciformis</i>	54,2	17,2	0,33	14,1	14,1	Carneiro <i>et al.</i> , 2014
<i>S. filiformis</i>	49,2	20,3	0,34	15,1	15,1	Carneiro <i>et al.</i> , 2014
<i>G. cervicornis</i>	63,1	19,7	0,4	10,5	14,6	Marinho-Soriano <i>et al.</i> , 2006
<i>H. charoides</i>	57,3	18,4	1,5	22,8	10,9	Wong & Cheung, 2000
<i>H. japonica</i>	57,5	19,0	1,4	22,1	9,9	Wong & Cheung, 2000
<i>Grateloupia turuturu</i>	60,4	22,9	2,6	18,5	-	Denis <i>et al.</i> , 2010
<i>G. turuturu</i>	43,2	22,5	2,2	20,5	11,7	Rodrigues <i>et al.</i> , 2015
<i>Euclima cottonii</i>	32,5	9,7	1,1	46,1	10,5	Matanjun, Mohamed, Mustapha & Muhammed, 2009

Espécies	Carboidratos (%)	Proteínas (%)	Lipídios (%)	Cinzas (%)	Umidade (%)	Referência
<i>Osmundea pinnatifida</i>	32,4	23,8	0,9	30,6	11,8	Rodrigues <i>et al.</i> , 2015 Park <i>et al.</i> , 2014
<i>Gelidium amansii</i>	67,3	15,6	0,0	5,7	11,4	
<i>G. amansii</i>	62,8	18,1	0,2	7,3	-	Cho <i>et al.</i> , 2014
(-) Não determinada						

Fonte: Adaptado de De Castro *et al.*, 2017.

1.2 Biorrefinaria de macroalgas como alternativa para a produção de biomoléculas

O interesse na biorrefinaria de macroalgas está aumentando para resolver as desvantagens ambientais e econômicas da biorrefinaria de biomassa terrestre, assim sendo, as biorrefinarias de macroalgas marinhas ainda não são tecnologias maduras. A vantagem mais significativa da alga é que ela não contém partes distintas geralmente encontradas em plantas terrestres; portanto, a alga inteira pode ser usada como biomassa (NAKHATE *et al.*, 2021). Devido à composição diferente da biomassa terrestre e de algas marinhas, as tecnologias propostas para uma não podem ser aplicadas diretamente à outra, e novos desenvolvimentos precisam ser explorados para a utilização de macroalgas (ÁLVAREZ-VIÑAS *et al.*, 2019). Comparadas às matérias-primas lignocelulósicas, as macroalgas são potencialmente mais adequadas para processos de biorrefinaria devido aos seus grandes rendimentos de biomassa, taxas de crescimento rápido e ausência de requisitos de terra terrestre para cultivo (ADAMS *et al.*, 2011). A falta de uma estrutura lignocelulósica recalcitrante implica que bioprocessos com menos gastos energéticos podem ser aplicados para recuperar bioprodutos de alto valor e interesse comercial (KOSTAS *et al.*, 2021).

Nas indústrias, o custo total de produção de enzimas é alto e o meio de crescimento corresponde a cerca de 30 a 40 % do custo de produção. Reduzir o custo de produção de enzimas pela otimização do meio de fermentação e dos parâmetros do processo é o principal objetivo da pesquisa básica para aplicações industriais (HAKIM *et al.*, 2018). Apesar de ser uma alternativa promissora para a produção de biomoléculas, o custo de produção de compostos de algas marinhas ainda é alto. A extração de muitos compostos ao mesmo tempo ou sucessivamente

em um conceito de biorrefinaria poderia compensar esse fato. Uma abordagem integrada de biorrefinaria sustentável facilita a extração de muitos produtos químicos da mesma biomassa, maximizando seu valor e gerando menos resíduos por meio de uma sucessão de etapas de extração (PEÑUELA *et al.*, 2021).

1.3 Hidrólise ácida da biomassa de macroalgas vermelhas

As algas vermelhas têm atraído a atenção de pesquisadores por apresentarem em sua composição uma grande quantidade de carboidratos que são facilmente hidrolisados gerando compostos de alto valor agregado ou que podem ser usados em processos fermentativos (ALBUQUERQUE, 2021; GREETHAM, 2020; DE CASTRO, 2017; JANG, 2012). O potencial econômico em termos de custo de extração e purificação dos monossacarídeos liberados pela hidrólise ácida de macroalgas é maior quando comparado com microalgas e plantas terrestres (PLIEGO-CORTÉS *et al.*, 2019).

A biomassa de macroalgas apresenta galactanas na sua composição, que são polímeros homogêneos com unidades alternadas de 3 \rightarrow β -D-galactose e 4 \rightarrow α -D-galactose ou 3,6-anidro- α -D-galactose, geralmente sulfatados em posições específicas. Após a hidrólise, as algas vermelhas geram dois monossacarídeos principais, a glicose, derivada da celulose e do amido, e a galactose (das galactanas) que são posteriormente fermentadas (YANAGISAWA *et al.*, 2011). Os monossacarídeos gerados após hidrólise podem ser usados para o cultivo de microrganismos, como *B. subtilis*, para a produção de biomoléculas de interesse comercial.

Nas biomassas lignocelulósicas, o pré-tratamento é essencial para tornar as biomoléculas constituintes (carboidratos, lipídios e proteínas) mais acessíveis às etapas subsequentes do bioprocessamento. O principal objetivo do tratamento é reduzir a recalcitrância da biomassa, abrindo a matriz complexa de carboidratos e lignina, despolimerizar lignina e hemicelulose e aumentar a área superficial (ZHANG *et al.*, 2022). Em comparação com a biomassa terrestre lignocelulósica, as algas marinhas são caracterizadas por nenhuma ou baixa quantidade de lignina. Assim, a degradação ou remoção de lignina não é necessária para algas marinhas, o que simplifica ainda mais o processo de conversão de carboidratos contidos na biomassa marinha em produtos químicos (RAJAK *et al.*, 2020).

1.4 *Bacillus subtilis* como biofábrica de enzimas

O uso de microrganismos em processos de fermentação, bioprodução e biotransformação tem uma longa história e, recentemente, se desenvolveu radicalmente devido aos avanços tecnológicos na triagem, cultivo e engenharia genética de várias linhagens de microrganismos (PARK *et al.*, 2020). Nos processos biotecnológicos, a diversidade de microrganismos é estudada e diferentes reações metabólicas são intituladas como um potencial repositório que é direcionado à obtenção de produtos desejáveis (REKIK *et al.*, 2019).

Dentre os microrganismos amplamente utilizados em pesquisa científica, *Bacillus subtilis* faz parte do grupo de organismos que se destacam devido às suas propriedades. É o organismo modelo mais bem estudado da linhagem gram-positiva, e que apresenta uma caixa de ferramentas genéticas considerada extremamente poderosa, além de ser de fácil cultivo e apresentar um rápido crescimento (ERRINGTON & AART, 2020). É uma bactéria bem conhecida por formar esporos. Bactérias gram-positivas são conhecidas por apresentarem a capacidade de sobreviver em condições de alta temperatura e baixo pH, e tolerância a altas concentrações de açúcar, sal e etanol (MALEKI *et al.*, 2021).

B. subtilis é uma espécie geralmente reconhecida como segura (GRAS – *Generally Recognized As Safe*) que tem sido intensamente estudada e utilizada para a produção de uma variedade de produtos bioquímicos. Esse microrganismo pode metabolizar uma vasta gama de substratos que variam de glicose a matérias-primas de carbono, como alimentos, celulose e resíduos agrícolas. A ausência de uma membrana externa e vias de secreção bem caracterizadas facilita a realocação eficiente de proteínas para o espaço extracelular. Graças a essas características, esse microrganismo tem sido uma das fábricas celulares mais poderosas para a produção extracelular de enzimas e peptídeos (PARK *et al.*, 2021).

B. subtilis é uma das bactérias mais importantes comercialmente, e é amplamente utilizada para a produção de uma variedade de metabólitos (vitaminas, aminoácidos e antibióticos) e enzimas industriais. Os membros do grupo deste microrganismo estão amplamente distribuídos no solo, onde ajudam a reciclar carbono e nitrogênio através da produção e secreção de hidrolases, como proteases, amilases e celulasas (HARWOOD *et al.*, 2018). Podem ser aplicados na produção de novas vacinas e drogas terapêuticas pela sua capacidade de produção de proteínas recombinantes (WESTERS *et al.*, 2004); na produção de

alimentos fermentados (KIMURA *et al.*, 2019); e na indústria têxtil, pela sua capacidade de produção de pectinases (ALQAHTANI *et al.*, 2022).

Bacillus subtilis pode degradar ou usar carboidratos e proteínas como fonte de energia para seu próprio metabolismo durante a fermentação. Após a hidrólise ácida, estão disponíveis para consumo do microrganismo tanto glicose quanto galactose, que servirão como fonte de carbono ao longo do processo fermentativo. *B. subtilis* é capaz de consumir esses dois monossacarídeos durante a fermentação, e após a glicose ser consumida até certo nível, a galactose pode ser utilizada como fonte auxiliar de carbono (CHEN *et al.*, 2022).

Outros componentes do meio de cultivo, além dos açúcares, influenciam no crescimento bacteriano. Extrato de levedura, peptona e triptona são acrescentadas ao meio para servirem como fontes orgânicas de nitrogênio para *B. subtilis*, e são compostos que influenciam maior produção de enzimas (SAHOO *et al.*, 2020). Além disso, a adição de sais inorgânicos no meio, como Na^+ , Mg^{2+} , K^+ , podem influenciar a formação de esporos (TIAN *et al.*, 2022). Desta forma, a composição do meio é um fator-chave para a produção de enzimas e deve ser formulada em condições ótimas para o crescimento do microrganismo.

Graças às propriedades anteriormente mencionadas, *B. subtilis* é considerado um microrganismo adequado para a produção de enzimas a partir de diferentes substratos, o que torna viável a sua aplicação no desenvolvimento do presente trabalho.

1.5 Enzimas e suas aplicações na indústria

As enzimas são utilizadas industrialmente para diversas finalidades por serem ambientalmente amigáveis, eficientes, seletivas e por serem capazes de acelerar reações (REKIK *et al.*, 2019). Entre todas as enzimas obtidas de diferentes organismos, as enzimas microbianas são as mais favorecidas. Para fins industriais e tecnologia de DNA recombinante, as enzimas microbianas são altamente confiáveis (FAROOQ *et al.*, 2021). Dentre as enzimas de interesse comercial, podem ser citadas as proteases e as celulases, que são amplamente abordadas na literatura quanto aos seus mecanismos de ação, tecnologias de produção e suas diversas aplicações.

1.5.1 Proteases

Proteases (EC: 3.4.21–24) são enzimas capazes de clivar ligações peptídicas entre resíduos de aminoácidos de outras proteínas, e são consideradas um dos grupos mais importantes de enzimas industriais, sendo responsáveis por mais de 65 % das vendas totais de enzimas ao redor do mundo (HAKIM *et al.*, 2018). São classificadas com base no seu mecanismo de ação, e são divididas em quatro categorias: proteases alcalinas, proteases ácidas, cisteíno proteases e metaloproteases (RAO *et al.*, 1998).

Historicamente, as proteases foram isoladas, purificadas e identificadas em organismos vivos e em bactérias. Os microrganismos são uma boa fonte de proteases devido a uma série de vantagens, como a ampla diversidade bioquímica, o rápido crescimento e o espaço limitado necessário para o cultivo celular. Recentemente, a maioria dos processos industriais são realizados em condições adversas, onde as enzimas são instáveis sob temperaturas extremamente altas, pH alto ou baixo, alta concentração de solventes orgânicos e detergentes, mas apenas uma classe limitada de proteases é reconhecida como recurso comercial (SI *et al.*, 2018).

Dentre o grupo de proteases comercialmente importantes estão as proteases alcalinas, que apresentam aplicação em diversos setores industriais, como: detergentes, couro, farmacêutica, processamento de proteínas, alimentos, reagentes de diagnóstico, processamento de soja, síntese de peptídeos e tratamento de resíduos (HAKIM *et al.*, 2018). Essas proteases se mostraram adequadas ao uso industrial principalmente por conta da sua alta estabilidade e atividade sob condições severas, bem como suas habilidades para hidrolisar vários substratos proteicos (REKIK *et al.*, 2019).

1.5.2 Celulases

As celulases (EC: 3.2.1.4) são complexos enzimáticos compostos por três enzimas: endoglucanases, exoglucanases e β -glucosidases. As enzimas endoglucanases clivam as ligações glicosídicas β -1,4 presentes nos polímeros de celulose e as convertem em polímeros com menor grau de polimerização, como a celotriose e a celobiose, que são então decompostas

por hidrólise em monossacarídeos simples de glicose pelas enzimas β -glucosidases (RAJNISH *et al.*, 2021).

Animais, plantas e microrganismos podem ser fontes ou produtores de celulases. No entanto, a produção de enzimas industriais geralmente é realizada por microrganismos (ZHANG *et al.*, 2013). A produção industrial de celulases destina-se a diversas aplicações, como para a indústria de papel e celulose, reciclagem de papel e destintagem; extração e clarificação de sucos; aditivos para a indústria alimentícia; ração animal; decomposição de resíduos para melhoria da fertilidade do solo, e o desenvolvimento de bioetanol celulósico (SIQUEIRA *et al.*, 2020).

Atualmente, a demanda comercial de celulases é atendida pela sua produção através da fermentação submersa (SmF). No entanto, a produção de celulase via SmF é dispendiosa, porque este processo requer utilização de quantidade excessiva de água, condições assépticas estritas, juntamente com processamento *down-stream* que consome muita energia como, por exemplo, a purificação da enzima (SRIVASTAVA *et al.*, 2021). Desta forma, processos que apresentem um menor consumo de energia e de recursos, e que possam usar biomassas alternativas como substrato, são desejáveis para a ampla produção dessas enzimas.

Tendo em vista os assuntos abordados anteriormente, o presente trabalho foi desenvolvido pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Biotecnologia de Algas e Bioprocessos (BioAP) da Universidade Federal do Ceará (UFC), com base nos trabalhos de De Castro *et al.* (2017) e Albuquerque *et al.* (2021) e no potencial relatado de utilização de biomassa algácea para a produção de biomoléculas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Promover o crescimento bacteriano de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 utilizando como fonte de carbono, açúcares redutores provenientes da hidrólise ácida da biomassa úmida de *Soliera filiformis* e avaliar as enzimas secretadas no meio.

2.2 Objetivos específicos

- Hidrolisar a biomassa de *S. filiformis* em meio ácido;
- Determinar os teores de açúcares redutores, carboidratos totais e proteínas do hidrolisado obtido;
- Formular o meio de cultura para promover o crescimento bacteriano de *B. subtilis* ATCC 6633 utilizando o hidrolisado como fonte de açúcares;
- Obter um extrato enzimático por meio da fermentação do hidrolisado;
- Quantificar as enzimas do extrato enzimático obtido.

3 METODOLOGIA

3.1 Material Biológico

3.1.1 *Solieria filiformis*

A macroalga vermelha *Solieria filiformis* (Kützinger) P.W. Gabrielson foi colhida em agosto de 2022, aproximadamente a 200 metros da costa, cultivada pelo método *long-line* no mar da praia de Flecheiras, município de Trairi, Ceará, Brasil (03°13'06" S – 39°16'47" W), pela Associação de Produtores de Algas de Flecheiras e Guajiru (APAFG) em parceria com o Laboratório de Biotecnologia de Algas e Bioprocessos (BioAP) localizado na Universidade Federal do Ceará (UFC) – *Campus* do Pici Prof. Prisco Bezerra, no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (DBBM), SisGen: A41C95F. A macroalga foi levada em sacos plásticos para o laboratório, onde foram lavadas com água corrente para retirada de epífitas, incrustantes, sal e grãos de areia, e, posteriormente, com água destilada. Em seguida, foram armazenadas a -20 °C até sua utilização.

3.1.2 *Bacillus subtilis* ATCC 6633

A bactéria *Bacillus subtilis* ATCC 6633 foi obtida da coleção de culturas do Laboratório de Toxinas Vegetais (LABTOX) do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (DBBM) da Universidade Federal do Ceará (UFC), foi estocada em solução de glicerol 20 % no freezer a 20 °C e, posteriormente, foi reativada em caldo nutritivo (5,0 g de peptona, 5,0 g de triptona; 5,0 g de cloreto de sódio (NaCl); 2,5 g de extrato de levedura e 10,0 g de glucose anidra por litro de meio) e incubada (incubadora Tecnal®, modelo TE-420) a 37 °C, 150 rpm por 24 h.

3.2 Hidrólise ácido-térmica da biomassa algácea

A hidrólise ácido-térmica da macroalga úmida triturada foi realizada em erlenmeyer de 500 mL utilizando a concentração de 50 g/L (De Castro *et al.*, 2017), à concentração final de H₂SO₄ 0,5 M. O tempo de hidrólise foi de 20 min à temperatura de 121 °C em autoclave.

Em seguida, o homogenato foi filtrado a vácuo em tecido de *nylon* e o restante da solução foi neutralizada com Ca(OH)₂. Após nova filtração a vácuo em papel filtro, o precipitado insolúvel (CaSO₄) foi retirado, e o pH da fase líquida foi ajustado para 7,0 com auxílio de medidor de pH mPA210 (MS Tecnocon Instrumentação®), e posteriormente foram retiradas amostras para a realização de quantificação de açúcares redutores totais, de carboidratos totais e de proteínas solúveis em triplicata.

3.2.1 Determinação de carboidratos totais

A determinação de carboidratos totais do hidrolisado foi realizada pelo método espectrofotométrico H₂SO₄ – UV (ALBALAMESH; BERHE; GHEZZEHEI, 2013), onde uma alíquota de 1 mL da solução de carboidratos diluída na proporção 1:1000 foi misturada com 3 mL de ácido sulfúrico concentrado em um tubo de ensaio e agitada em vórtex por 30 segundos. A temperatura da mistura subiu rapidamente dentro de 10 a 15 segundos após a adição do ácido. Então, a solução foi resfriada em temperatura ambiente. Por fim, foi medida a absorção de luz UV em espectrofotômetro UV-VIS a 315 nm. A determinação de carboidratos foi realizada utilizando uma curva padrão com concentrações conhecidas de D-glucose para a determinação do fator de concentração em gramas por litro (g/L). Os ensaios foram realizados em triplicata. O cálculo da concentração de carboidratos foi realizado com base na seguinte equação:

$$[C] = Abs \times F \times D$$

Onde:

[C] = concentração de carboidratos (g/L)

Abs = média das absorvâncias lidas

F = fator de concentração

D = recíproca do fator de diluição da amostra

3.2.2 *Quantificação de açúcares redutores totais*

A quantificação de açúcares redutores no hidrolisado foi realizada segundo o método DNS (MILLER, 1959), que quantifica açúcares redutores totais (ART) pela oxidação do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), a partir de 100 µL de amostra diluída na proporção 1:100, usando uma curva padrão com concentrações conhecidas de D-glucose como padrão redutor e leituras das absorvâncias realizadas na região do visível a 540 nm em espectrofotômetro. Os ensaios foram realizados em triplicata. O cálculo da concentração de ART foi realizado com base na seguinte equação:

$$[\text{ART}] = \text{Abs} \times F \times D$$

Onde:

[ART] = concentração de carboidratos (g/L)

Abs = média das absorvâncias lidas

F = fator de concentração

D = recíproca do fator de diluição da amostra

3.2.3 *Quantificação de proteínas solúveis*

A dosagem de proteínas solúveis no hidrolisado foi realizada pelo método de Bradford (1976), que é baseado na interação entre o corante *Coomassie Brilliant Blue G-250* (Sigma) e as macromoléculas de proteínas que contém os aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas (cadeias polipeptídicas). Na reação, 100 µL de amostra foram adicionados a dois tubos de ensaio, um contendo 2,5 mL da solução de Bradford e

outro contendo 2,5 mL de água deionizada. O branco foi preparado utilizando 100 µL de água deionizada e 2,5 mL da solução de Bradford. Os tubos foram, então, agitados em vórtex por 10 s e a reação ocorreu ao longo de 15 min. Foram realizadas leituras em espectrofotômetro UV-VIS a 595 nm utilizando cubetas de plástico.

3.3 Formulação dos meios de cultura para crescimento bacteriano

O hidrolisado neutralizado foi ajustado para a concentração de 8 g/L de ART para servir principalmente como fonte de carbono no processo de fermentação e foram adicionados componentes para auxílio do crescimento do microrganismo (5,0 g de peptona, 5,0 g de triptona, 5,0 g de cloreto de sódio e 2,5 g de extrato de levedura por litro de meio) para formulação dos meios de cultura bacteriana. Em seguida, o meio formulado foi testado nas formas não diluída (HID), diluída (H_{1:1}) com NaCl 0,15 M na proporção 1:1 (v/v). O meio controle foi caldo nutritivo (CN_{glic}) utilizando D-glicose na concentração de 8 g/L. Todos os meios de cultivo foram esterilizados por calor úmido em autoclave com temperatura de 121 °C, 1,0 atm por 15 min.

3.4 Produção do crescimento bacteriano de *Bacillus subtilis* no hidrolisado ácido de *S. filiformis*

O inóculo foi obtido em CN_{glic} segundo composição mostrada no item 3.3 após cultivo durante 24 h sob agitação orbital constante (150 rpm) a 37 °C para promover o crescimento do *B. subtilis* ATCC 6633. A densidade óptica (DO) foi medida em espectrofotômetro a 600 nm. A DO do inóculo foi estabelecida em 2,0.

O crescimento bacteriano de *B. subtilis* foi realizado nos meios HID, H_{1:1} e CN_{glic} em frascos erlenmeyer com volume de 250 mL, onde 90 mL dos meios foram adicionados e inoculados com 10 mL do inóculo, encerrando em um volume final de 100 mL. Os ensaios foram realizados em duplicatas. O tempo de cultivo foi de 72 h a 37 °C sob agitação de 150 rpm em incubadora Tecnal®, modelo TE-420. Alíquotas de 1,5 mL foram

retiradas em intervalos de 2 horas nas primeiras 12 horas de cada dia de cultivo, e foram armazenadas a 5 °C até a sua utilização para contagem de células viáveis.

3.5 Contagem de células viáveis e obtenção do extrato enzimático

A contagem de células foi realizada em meio Plate Count Agar (pH 7.0) autoclavado a 121 °C por 15 min. Placas de Petri estéreis foram divididas em quatro quadrantes, e em cada quadrante foram inoculadas triplicatas de 15 µL das alíquotas dos meios de cultivo bacteriano. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37 °C por 24 h para crescimento das colônias, que foram contadas em contador de colônias IONLAB®, modelo CC150. A concentração bacteriana em cada alíquota foi expressa em UFC/mL.

Após centrifugação a 8.000 xg 4 °C por 10 min para a separação das células bacterianas, o sobrenadante foi retirado, denominado extrato enzimático e armazenado em microtubos de 2 mL a 5 °C para posterior utilização em testes de atividade proteolítica e celulolítica.

3.6 Cálculo dos parâmetros cinéticos de crescimento bacteriano

Após a contagem de células, os parâmetros cinéticos do crescimento microbiano foram calculados com auxílio do software MicrosoftExcel de acordo com as equações demonstradas abaixo:

$$(I) \quad Vx = \frac{\Delta X}{\Delta t} = \frac{X_0 - X}{\Delta t}$$

$$(II) \quad \mu = \frac{dX(\Delta X)}{dt(\Delta t)} \times \frac{1}{X} = \frac{Vx}{X}$$

$$(III) \quad k = \frac{\ln 2}{g}$$

$$(IV) \quad g = \frac{t}{n}$$

$$(V) \quad n = 3,3 \times (\log N - \log N_0)$$

onde:

V_x = velocidade média de crescimento bacteriano para um intervalo específico (UFC/mL.h)

t = tempo de cultivo (h)

μ = velocidade específica de crescimento bacteriano (h^{-1})

X = concentração bacteriana (UFC/mL)

N = número de células bacterianas (UFC)

N_0 = número de células bacterianas no início do cultivo (UFC)

n = número de gerações da população bacteriana

g = tempo de geração da população bacteriana (h)

k = constante de taxa de crescimento

3.7 Atividades enzimáticas

3.7.1 Proteolítica

A determinação da atividade proteolítica do extrato enzimático foi realizada utilizando o substrato azocaseína (Charney e Tomarelli, 1947), na qual 100 μ L de cada amostra foram misturados em microtubos com 100 μ L de tampão Tris-HCl 0,1 M com pH 9,0, e com 100 μ L de uma solução de azocaseína de concentração 10 mg/mL. A solução foi incubada em banho-maria a 37 °C por 30 min. Posteriormente, foram adicionados 500 μ L de ácido tricloroacético (TCA) 10 % (m/v) para parar a reação. Os microtubos foram centrifugados por 5 minutos a 9.900 xg. Foi retirado 200 μ L dos sobrenadantes obtidos, que foram adicionados a 200 μ L de NaOH 1,8 M. Os experimentos foram feitos em triplicata. O tubo branco foi preparado adicionando-se TCA 10 % antes do período de incubação. A leitura das amostras foi realizada em

espectrofotômetro UV-VIS a 420 nm, considerando uma unidade de atividade enzimática a quantidade de enzima necessária para aumentar a absorvância em 0,01 sob as condições do experimento.

3.7.2 Celulolítica (CMCase)

A atividade celulolítica foi determinada no extrato enzimático pela concentração de grupos com extremidades redutoras em uma solução de carboximetilcelulose (CMC). Para o experimento, foi dissolvido 0,5 mL de solução de CMC 1,0 % (p/v) em tampão Tris-HCl (0,1 M, pH 9.0) e foi adicionado 200 µL do extrato enzimático. A solução final foi incubada a 50 °C por 60 minutos. Posteriormente, foram adicionados 200 µL de DNS para paralisar a atividade enzimática. Os tubos foram fervidos em banho-maria por 5 min para o desenvolvimento da cor. Por fim, taxa de produção de açúcares redutores foi determinada por leituras em espectrofotômetro UV-VIS a 540 nm. Uma curva de D-glucose foi utilizada como padrão. Os tubos brancos de reagente e enzima foram incubados simultaneamente com as amostras.

A unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 µmol de glicose por minuto de reação a 50 °C. A atividade enzimática foi expressa em unidade de atividade enzimática por mililitro de solução (U/mL) e por miligrama de proteína (U/mgP). Os cálculos foram realizados de acordo com as seguintes equações (GHOSE, 1987):

$$(I) \quad E = \frac{GLIC}{V \times T}$$

$$(II) \quad EmgP = \frac{E}{DP}$$

Onde:

E = concentração de enzimas (mg/mL)

EmgP = concentração de enzimas por mg de proteína (U/mgP)

GLIC = concentração de glicose produzida (mg/mL)

DP = dosagem de proteínas na amostra (mg/mL)

V = volume final da solução (mL)

T = tempo de reação (min)

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Hidrólise ácido-térmica da biomassa algácea

A concentração de carboidratos totais observada no hidrolisado ácido térmico obtido a partir da biomassa de *S. filiformis* úmida foi de 76,58 %. A porcentagem de carboidratos no hidrolisado obtido no presente trabalho foi semelhante ao valor relatado para a biomassa da alga *Kappaphycus alvarezii*, 72,65 % (SUNWOO *et al.*, 2020), que é uma das espécies de algas vermelhas mais importantes industrialmente, e é utilizada como referência em processos de biorrefinaria devido a sua composição bioquímica (RUDKE *et al.*, 2020). Nas algas, a abundância e a composição dos carboidratos variam entre as espécies; dentro do filo Rhodophyta, normalmente são encontrados amido, celulose, xilana e manana (FREITAS *et al.*, 2022). Esses polissacarídeos são facilmente dissolvidos e hidrolisados quando tratados com soluções ácidas, e a grande quantidade de carboidratos relatada indica que a biomassa de *Solieria filiformis* é promissora para a obtenção de açúcares.

A hidrólise ácida da biomassa triturada de *S. filiformis* gerou um total de 24,943 ± 3,21 g/L de açúcares redutores totais (ART) nas condições estabelecidas. Essa concentração corrobora com os valores encontrados na literatura acerca da hidrólise da biomassa de outras algas (Tabela 2), e demonstra que a realização da hidrólise em baixas concentrações de ácido e biomassa também possibilita a obtenção de um teor de ART semelhante ou maior do que os teores observados em outras espécies de algas. De Castro *et al.* (2017) obteve um total de monossacarídeos de 18,1 g/L a partir da biomassa de *S. filiformis* hidrolisada utilizando os mesmos parâmetros do presente trabalho (50 g/L, 121 °C, 20 min, H₂SO₄ 0,5 M). Essa diferença nos teores de ART obtidos em ambos os trabalhos pode ser explicada pela diferença na composição da alga, que varia de acordo com a fatores abióticos como luz, temperatura, minerais ou estação do ano. Esses fatores podem resultar em uma biomassa com uma concentração menor ou maior de polissacarídeos hidrolisáveis, o que impacta diretamente na concentração de ART que podem ser gerados no processo de hidrólise mesmo que sejam utilizados os mesmos parâmetros.

Tabela 2 - Concentração de açúcares obtida a partir da hidrólise ácida com ácido sulfúrico de diferentes espécies de algas em condições de hidrólise variáveis

Alga	Biomassa (g/L)	Concentração de H ₂ SO ₄ (M)	Tempo de Hidrólise (min)	Temperatura (°C)	Concentração de Açúcares (g/L)	Referência
<i>Solieria filiformis</i>	50,0	0,5	20	121	24,9	Presente trabalho
<i>S. filiformis</i>	50,0	0,5	20	121	18,1	De Castro <i>et al.</i> , 2017
<i>Chlorella sp.</i>	100,0	0,5	30	121	46,0	Khomlaem <i>et al.</i> , 2020
<i>C. vulgaris</i>	60,0	1,0	60	90	7,1	Megawati <i>et al.</i> , 2022
<i>Gracilaria birdiae</i>	200,0	2,0	30	121	52,85	Albuquerque <i>et al.</i> , 2021
<i>G. birdiae</i>	200,0	2,0	10	121	57,48	Albuquerque <i>et al.</i> , 2021
<i>Kappaphycus alvarezii</i>	100,0	0,2	15	130	38,4	Meinita <i>et al.</i> , 2012
<i>K. alvarezii</i>	20,0	0,1	15	121	14,1	Sudhakar <i>et al.</i> , 2022
<i>Gelidium amansii</i>	80,0	0,091	45	121	25,5	Cho <i>et al.</i> , 2014
<i>G. amansii</i>	100,0	0,05	10	180	24,4	Kim <i>et al.</i> , 2022
<i>G. amansii</i>	100,0	0,1	10	180	12,4	Kim <i>et al.</i> , 2022
<i>Eucheuma denticulatum</i>	200,0	0,1	10	160	51,4	Teh <i>et al.</i> , 2017
<i>E. denticulatum</i>	55,0	0,1	25	120	27,9	Tong <i>et al.</i> , 2021

Fonte: Elaborado pela autora.

Kim *et al.* (2022) obteve uma concentração de 24,4 g/L de açúcares a partir da hidrólise de 100 g/L da biomassa de *Gelidium amansii* nas condições H₂SO₄ 0,05 M, 10 min, 180 °C. Apesar da utilização de uma concentração de biomassa maior e de temperatura mais severa, o teor obtido de açúcares foi semelhante ao do presente trabalho. Isso pode ser explicado tanto pela composição bioquímica da alga utilizada, que é variável entre as espécies e seu local de cultivo, quanto pela concentração de ácido e pelo curto

tempo de hidrólise. Como é demonstrado na literatura, a alga *G. amansii* apresenta um teor de carboidratos de 69,9 % da sua biomassa (KIM *et al.*, 2022). Esses carboidratos, na sua maioria, são rapidamente convertidos em carboidratos de peso molecular menores quando em meio ácido, porém uma concentração maior de biomassa não assegura maior quantidade de açúcares pois, quando se é utilizada uma baixa concentração de ácido, a biomassa pode não ser totalmente hidrolisada por conta da baixa superfície de contato, o que resulta em uma menor ação do ácido sobre a biomassa da alga. Além disso, apesar de ser utilizada condição extrema de temperatura, a reação terá menos tempo para acontecer em um curto tempo de hidrólise. Dessa forma, mesmo com a utilização de maior biomassa, obtém-se um teor de açúcares semelhante ao obtido em trabalhos que utilizaram menores concentrações.

Albuquerque *et al.* (2021) realizou a hidrólise de 200,0 g/L da biomassa de *Gracilaria birdiae* nas condições H₂SO₄ 2,0 M, 30 min, 121 °C e apresentou uma concentração de 52,85 g/L de açúcares no hidrolisado obtido. Apesar de serem utilizados tempo de hidrólise e temperaturas iguais aos do presente trabalho, foi relatado um maior teor de açúcares utilizando esses parâmetros. Isso pode ser explicado pela maior ação do ácido ao se utilizar maiores concentrações de biomassa, o que gerou uma maior quantidade de açúcares redutores na solução hidrolisada.

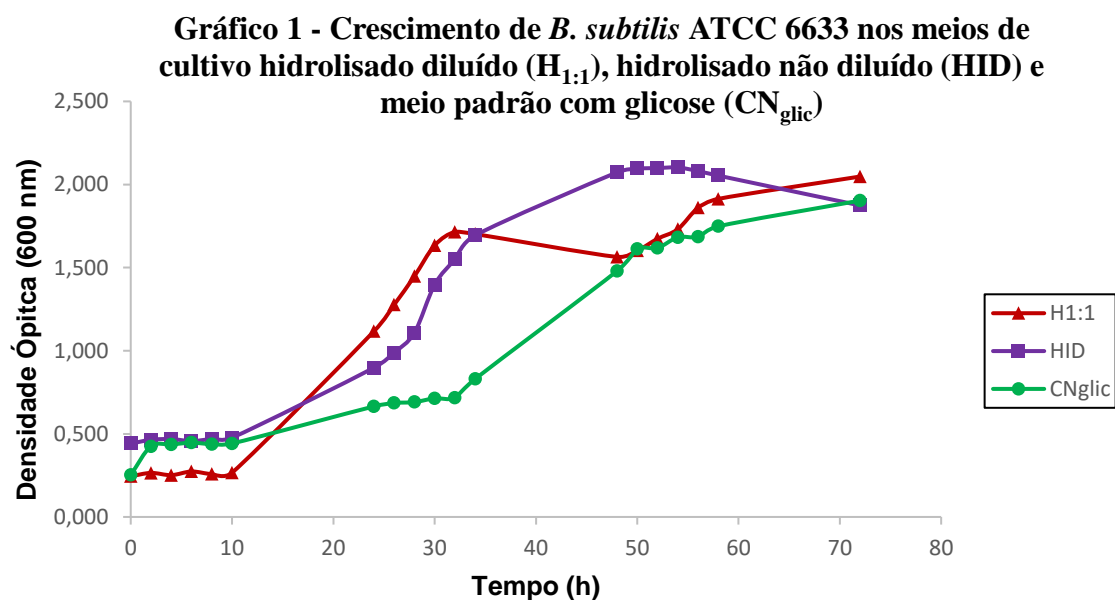
Como demonstrado pela literatura, os resultados são variáveis e sensíveis aos parâmetros de hidrólise definidos. O presente trabalho selecionou os parâmetros ótimos de hidrólise definidos pelo trabalho de De Castro *et al.* (2017) para a obtenção de melhor teor de monossacarídeos no hidrolisado para a sua utilização em processos de fermentação. Desta forma, foi possível obter uma maior quantidade de açúcares redutores que a previamente reportada na literatura e demonstrar que o hidrolisado de *S. filiformis* apresenta em sua composição uma quantidade promissora de açúcares para sua utilização como fonte de carbono em processos fermentativos.

O teor de proteínas solúveis obtido no hidrolisado foi de 0,022 mg/mL. Um baixo teor de proteínas na solução é esperado após a hidrólise, e pode ser explicado pelos parâmetros em que a reação acontece, que são condições consideradas extremas para algumas proteínas. A hidrólise é realizada com ácido em altas temperaturas, fatores que podem resultar na desnaturação proteica, onde ocorrem mudanças na estrutura da proteína e fazer com que elas percam sua estrutura conformacional (ZHANG *et al.*, 2021). Além disso, as proteínas podem precipitar quando em solução ácida, e a filtração realizada após

a hidrólise pode ser um dos fatores que resultaram no baixo teor de proteínas determinado. O baixo teor de proteínas presente no hidrolisado não afeta o objetivo do presente trabalho, mas demonstra que, para pesquisas em que a quantidade de proteínas influencie no resultado, o processo de hidrólise não é recomendado.

4.2 Cinética de crescimento de *B. subtilis* ATCC 6633

As curvas de crescimento do microrganismo *Bacillus subtilis* ATCC 6633 nos meios hidrolisado diluído (H_{1:1}), hidrolisado não diluído (HID) e meio padrão com glicose (CN_{glic}) estão representadas no Gráfico 1. Uma cepa utilizada de *B. subtilis* apresentou em todos os meios uma fase *lag* de 10 horas, na qual as células bacterianas se adaptam para utilizar a fonte de carbono e os nutrientes disponíveis e iniciar o crescimento exponencial (SWINNEN *et al.*, 2004). Nessa etapa do crescimento, houve apenas uma pequena variação no número de células presentes no meio. O resultado obtido indica que o microrganismo foi capaz de se adaptar aos meios H_{1:1} e HID melhor que no seu meio padrão, CN_{glic}.



Fonte: Elaborado pela autora.

Os microrganismos presentes no meio HID iniciaram a fase estacionária do crescimento às 34 h de cultivo, onde o número de novos microrganismos é igual ao número de células que estão morrendo. Nesta mesma etapa de cultivo, o meio H_{1:1} se

apresenta de forma diferente, com densidades celulares menores, bem como velocidade de crescimento microbiano menor, não sendo possível afirmar que as células teriam entrado em fase estacionária nesse ponto do cultivo. Vale ressaltar que quando os nutrientes presentes no meio são consumidos, se inicia o estado de privação de nutrientes e são formadas células dormentes e inativas conhecidas como esporos (MOHSIN *et al.*, 2021). Apesar de seu período de dormência, esses esporos podem voltar à fase vegetativa do crescimento, retomando o crescimento celular (WEN *et al.*, 2022). Desta forma, após o início do consumo da galactose, o microrganismo deixa o estado de dormência celular e volta a se multiplicar no meio.

No meio CN_{glic}, *B. subtilis* ATCC 6633 não alcançou a fase estacionária. Como é demonstrado pela cinética de crescimento, a multiplicação bacteriana aconteceu mais lentamente, dada a menor inclinação da reta correspondente à fase *log*, quando comparada aos demais meios. Esses resultados indicam que, tanto no meio H_{1:1} quanto no meio CN_{glic}, *B. subtilis* alcançou densidade ótica similares após 50 h de cultivo (1,7), sendo menor que no meio HID (2,1). Vale ressaltar que o meio HID apresenta o dobro da concentração de nutrientes e pode ter favorecido a multiplicação bacteriana apresentando após 50 h de cultivo uma densidade ótica maior.

No meio HID, o microrganismo apresentou um ciclo completo de crescimento no período de 72 horas. Isso indica que, neste meio, *B. subtilis* foi capaz de consumir totalmente carboidratos presentes no meio no período de cultivo. Às 54 horas de cultivo, o microrganismo alcançou o valor máximo de densidade ótica (absorbância a 600 nm = 2,103) e se iniciou o período de morte celular. A observação completa do seu ciclo de crescimento indica que, dentre os três meios utilizados, o microrganismo se adaptou melhor ao meio HID (hidrolisado não diluído).

Amostras dos meios com maior crescimento celular (HID e H_{1:1}) foram retiradas para a etapa de contagem de células em placa para a comparação do crescimento nos meios de cultivo. Como está demonstrado na Tabela 3, o microrganismo apresentou o mesmo perfil de crescimento em ambos os meios nos tempos selecionados.

Tabela 3 - Resultado da contagem de células das amostras dos meios H_{1:1} e HID e parâmetros cinéticos de crescimento de *B. subtilis* ATCC 6633

Fonte: Elaborado pela autora.

Amostra	Tempo (h)	Concentração de Microrganismos (UFC/mL)	Absorbância Média (600 nm)	V _x (UFC/mL.h)	Tempo de Geração (h)	μ (h ⁻¹)	Constante de Taxa de Crescimento (k)
H _{1:1}	0	2,80 x 10 ⁶	0,245 ± 0,008	0	0	0	0
	24	5,02 x 10 ⁹	1,117 ± 0,176	2,09 x 10 ⁸	0,750	0,0	0,0217
	48	3,80 x 10 ¹³	1,565 ± 0,024	7,92 x 10 ¹¹	1,071	0,091	0,0155
	72	8,67 x 10 ¹²	2,048 ± 0,334	1,20 x 10 ¹¹	1,686	0,014	0,0162
HID	0	3,37 x 10 ⁶	0,441 ± 0,025	0	0	0	0
	24	5,60 x 10 ⁹	0,898 ± 0,122	2,33 x 10 ⁸	0,746	0,0	0,0215
	48	4,17 x 10 ¹³	2,073 ± 0,025	8,69 x 10 ¹¹	1,068	0,061	0,0154
	72	1,42 x 10 ¹³	1,874 ± 0,113	1,97 x 10 ¹¹	1,659	0,014	0,0160

Nos meios H_{1:1} e HID, o decréscimo da constante de crescimento às 48 horas de cultivo sugeriu a condição adversa do meio para dar continuidade ao crescimento. O trabalho realizado por Chen *et al.* (2022) demonstrou a preferência do consumo de glicose por *B. subtilis* para fermentação de soja em meio contendo diferentes monossacarídeos: glicose, galactose, arabinose, ribose, ramnose e ácido glicurônico. De todos os monossacarídeos presentes no meio, a curva da glicose foi a que apresentou o maior declínio durante o processo fermentativo. Com base no fato apresentado, pode-se sugerir que o microrganismo teve crescimento reduzido pela quantidade reduzida de glicose no meio. O decréscimo da velocidade de crescimento às 72 horas de cultivo para μ = 0,014 h⁻¹ indicou o início da fase estacionária do crescimento.

O perfil de crescimento demonstrado pela Tabela 3 indicou que ambos os meios são igualmente apropriados para o cultivo e produção de biomassa de *B. subtilis* ATCC 6633. No entanto, considerando-se a concentração dos componentes dos meios, o meio HID seria o mais apropriado para a produção de biomassa bacteriana, uma vez que a maior densidade ótica e a maior contagem de células viáveis foram obtidas nesse meio.

No meio HID, pode-se afirmar pela queda nos valores de absorbância que a velocidade de crescimento do microrganismo diminui por conta do início da fase estacionária e, após as 58 horas de cultivo, o início da fase de morte celular. Às 72 horas de cultivo é demonstrado que a concentração de células é reduzida de 4,17 x 10¹³ UFC/mL

para $1,42 \times 10^{13}$ UFC/mL, havendo também uma redução da velocidade de $\mu = 0,091 \text{ h}^{-1}$ para $\mu = 0,014 \text{ h}^{-1}$. Essa redução no número de células e da velocidade de crescimento pode ser explicada pela continuidade da fase estacionária. Após essa etapa, ocorre um excesso de bactérias mortas e a redução do número de bactérias vivas, o que caracteriza o início da fase de morte celular. A capacidade de sobrevivência das bactérias depende de sua capacidade de formar esporos. Bactérias formadoras de esporos como o *B. subtilis* assumem a forma de esporos no último estágio (VEHAPI *et al.*, 2022). Desta forma, pode-se afirmar que a maior concentração de esporos no meio deve ser observada ao fim do cultivo.

A fase estacionária é o período onde os nutrientes presentes no meio já estão em quantidades limitantes e as células começam a esporular para se adaptarem às novas condições de cultivo. Nesta etapa e na fase de morte ocorre a liberação de conteúdo intracelular para o meio, o que indica que a quantidade de enzimas e outras biomoléculas produzidas no processo será maior ao fim da fermentação. Para a produção de enzimas, o meio HID se mostrou mais apropriado por apresentar todas as fases do crescimento bacteriano. Com base neste fato, as amostras selecionadas para os testes de atividade enzimática foram baseadas nos pontos da curva HID, que apresentou todas as fases de crescimento de *B. subtilis* ATCC 6633. Os pontos selecionados foram: tempos 0 (início do cultivo), 10 (antes do início da fase *log*), 24 (fase *log*), 48 (início da fase estacionária), 58 (fase estacionária) e 72 (etapa de morte celular e fim do cultivo).

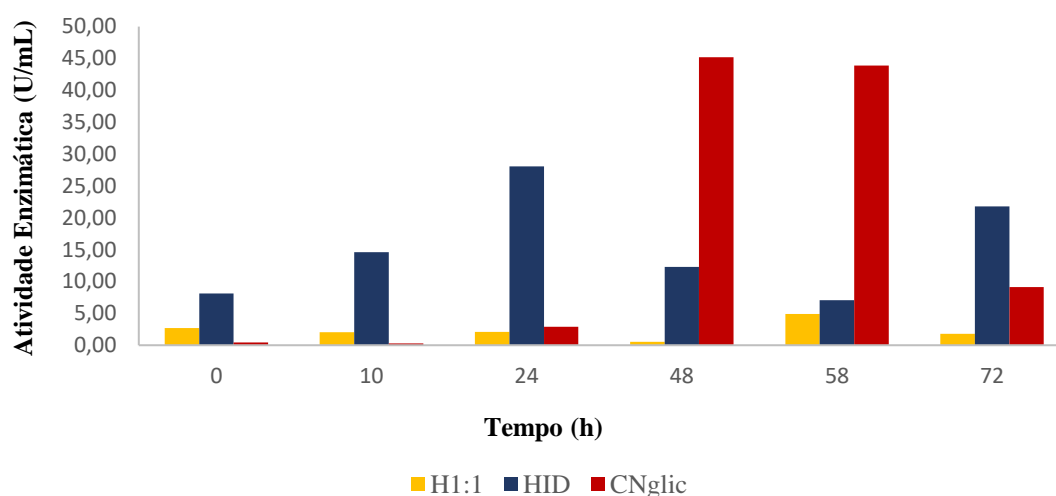
4.3 Atividades enzimáticas

4.3.1 Proteolítica

A atividade proteolítica dos extratos enzimáticos está mostrada na Figura 1. O teste de atividade proteolítica indicou presença de enzimas em todos os meios de cultivo. No meio H_{1:1}, a maior atividade enzimática detectada no meio foi de 544,75 U/mgP às 10 horas de cultivo, contudo a atividade foi similar ao tempo 0, sugerindo que os componentes dos meios formulados já apresentavam proteases. Outra hipótese sugere que o meio H_{1:1}, por ser diluído, apresenta uma baixa concentração de seus componentes,

sendo o NaCl predominante após a diluição. Numerosos íons metálicos têm sido descritos como tendo um impacto na atividade de proteases. Mustefa et al. (2021) demonstraram que em concentrações baixas de NaCl (1 mM) a atividade proteolítica foi favorecida pela concentração do sal no meio. No entanto, em concentrações maiores (>2mM) a atividade proteolítica foi prejudicada e diminuiu acentuadamente. A baixa atividade proteolítica em relação aos outros meios de cultivo pode ser explicada pelo excesso de NaCl no meio.

Figura 1 - Atividade proteolítica dos extratos enzimáticos provenientes do cultivo de *B. subtilis* em meios de cultura formulados com o hidrolisado de *Soliera filiformis* e com glicose



Fonte: Elaborado pela autora.

No meio HID, o máximo de atividade enzimática ocorreu às 24 horas de cultivo, que corresponde a um dos pontos da fase de crescimento exponencial (fase *log*). A maior atividade proteolítica específica de 7.453,76 U/mgP observada nessa etapa da fermentação pode ser explicada pela alta taxa metabólica do microrganismo. Na fase *log*, a concentração de nutrientes presentes no meio é reduzida drasticamente diante das necessidades do microrganismo e as células estão todas se dividindo. Assim, *B. subtilis* aumenta o consumo dos substratos disponíveis no meio para dar continuidade ao crescimento, e as biomoléculas produzidas ao longo desse processo são secretadas para o meio. No ponto de início da fase estacionária, às 48 horas de cultivo, é demonstrada uma queda drástica na atividade enzimática específica para 1.470,74 U/mgP. Essa queda é explicada pela estabilização no crescimento do microrganismo, pois os nutrientes do meio

se tornam limitantes, algumas células começam a morrer e o microrganismo começa a esporular para sobreviver nas novas condições. Nessa fase é verificado um aumento da concentração de proteínas no meio, o que reduz a atividade enzimática específica. Na etapa de morte celular às 72 horas de cultivo, foi observado um novo aumento na atividade enzimática, porém acompanhado de aumento de 15 vezes na concentração de proteases no meio, o que pode ter ocorrido pela liberação de conteúdo intracelular pelas células mortas. Esse resultado provocou a redução da atividade específica das enzimas proteolíticas.

No meio CN_{glic}, utilizado como controle, o pico de atividade enzimática específica foi de 1.470,74 U/mgP às 48 horas de cultivo (início da fase estacionária). O microrganismo cultivado em meio CN_{glic} apresentou a maior atividade enzimática (43,9 U/mL), porém não alcançou a atividade enzimática específica verificada no meio HID, sendo 5 vezes menor.

Moni *et al.* (2022) realizou o cultivo da cepa de *B. subtilis* RB14 por 24 h a 37 °C em meio de pH 6.8 contendo peptona 3,0 %, D-glicose 1,0 %, KH₂PO₄ 0,1 %, MgSO₄.7H₂O 0,05 %, e obteve uma atividade proteolítica de 233,25 U/mL ao fim da fermentação baseada em biofilme.

Ami Sayaniya e Pritesh Patel (2021) isolaram a cepa de *B. subtilis* APO-1 do solo de área industrial e a cultivaram em meio ágar sólido alcalino (glicose 5,0 g/L; extrato de levedura 3,0 g/L; peptona 5,0 g/L; ágar 20,0 g/L) para seu isolamento, cultivo e manutenção, e obtiveram uma atividade enzimática máxima de 48,27 U/mL a 37 °C.

Hashmi *et al.* (2022) obteve uma produção máxima de 99,8 U/mL de protease de *B. subtilis* S1 isolado de sólido alcalino e cultivado em caldo nutritivo suplementado com caseína 1,0 % (p/v) a 37 °C, pH 7.0, sob agitação de 120 rpm.

Dentre os três meios utilizados no presente trabalho, o meio HID apresentou a maior atividade enzimática máxima e se mostrou um meio promissor para a produção de enzimas proteolíticas. De acordo com os valores vistos na literatura, é possível otimizar o processo a partir da formulação do meio de forma que a produção enzimática seja favorecida, e seja possível obter uma maior produção enzimática em um menor período de tempo de fermentação. Com os resultados do presente trabalho, pode-se afirmar que o hidrolisado algáceo utilizado como fonte de carbono na composição do meio de cultivo de *B. subtilis* ATCC 6633 exerceu um papel melhor que a glicose no crescimento do

microrganismo e na produção de enzimas, o que o torna uma alternativa promissora na formulação de meios de cultivo.

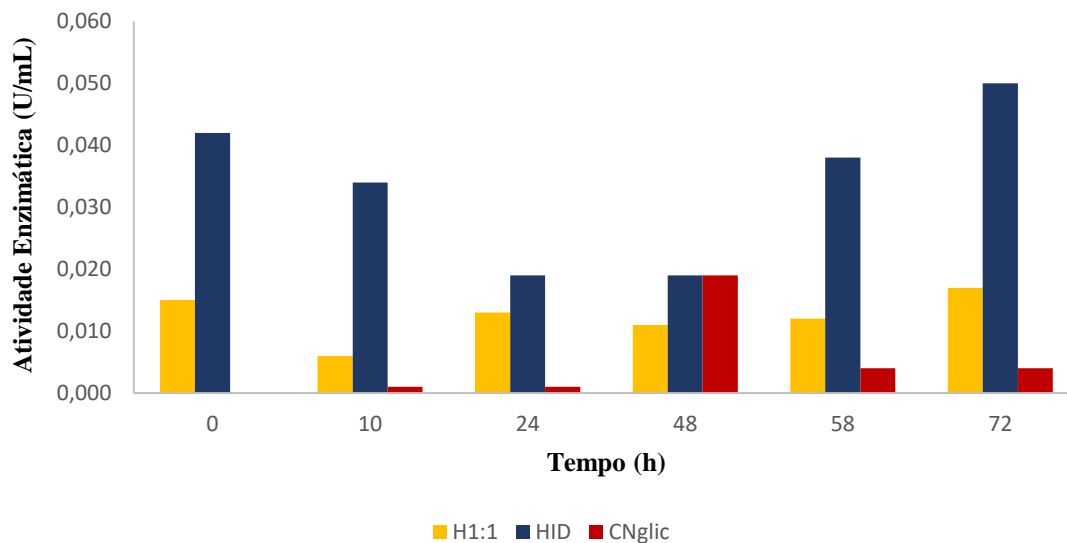
4.3.2 Celulolítica

A atividade celulolítica dos extratos enzimáticos provenientes do cultivo de *Bacillus subtilis* nos meios HID, H_{1:1} e CN_{glic} estão representados na Figura 2. Os testes de atividade celulolítica com as amostras dos meios H_{1:1}, HID e CN_{glic} resultaram em um perfil semelhante de atividade celulolítica ao longo do cultivo. No entanto, só foi possível detectar atividade enzimática no meio CN_{glic} após 48 horas de cultivo.

Os picos de atividade específica nos meios H_{1:1} e HID foram, respectivamente, 2,98 U/mgP e 9,62 U/mgP, e ambos ocorreram no início do cultivo (t = 0). Para se adaptar ao meio e possibilitar o início ao crescimento, *B. subtilis* ATCC 6633 precisa ser capaz de consumir os nutrientes disponíveis. Com base nesses resultados, pode-se sugerir a presença de uma baixa concentração de celulose no hidrolisado.

Após as 24 horas de cultivo, percebe-se uma queda da atividade enzimática específica em ambos os meios. No meio H_{1:1}, a atividade enzimática apresenta um declínio até as 58 horas de cultivo, atingindo um valor de 0,22 U/mgP, porém apresenta um novo aumento às 72 horas (0,30 U/mgP). Apesar da baixa atividade enzimática específica, ao fim do processo foi observada uma atividade enzimática de 0,017 U/mL no meio, o maior valor desde o início do cultivo.

Figura 2 - Atividade celulolítica dos extratos enzimáticos provenientes do cultivo de *B. subtilis* em meios de cultura formulados com o hidrolisado de *Soliera filiformis*



Fonte: Elaborado pela autora.

No meio HID, a atividade celulolítica apresenta um padrão contínuo de declínio após as 24 horas de cultivo. No entanto, assim como foi observado para o meio H_{1:1}, a maior atividade enzimática no meio foi detectada às 72 horas de cultivo, apresentando um valor de 0,050 U/mL. A produção de enzimas de *B. subtilis* está diretamente associada ao processo de esporulação. Uma grande quantidade de esporos no meio indica que as células-mãe onde foram formados foram lisadas, e o conteúdo intracelular foi liberado para o meio juntamente com o esporo (RILEY *et al.*, 2020). Dessa forma, é esperado que uma maior produção de enzimas aconteça nos estágios onde as células começam a morrer e a serem lisadas, o que ocorre nas fases estacionárias e de morte celular, que representam o fim do crescimento microbiano.

No meio CN_{glíc} valor máximo de atividade enzimática foi de 0,019 U/mL. Uma baixa produção de enzimas celulolíticas era esperado devido ao meio de cultivo, que não apresenta celulose na sua composição. Uma alta produção de enzimas que não estão sendo demandadas seria energética e metabolicamente desvantajoso para o microrganismo, por isso o seu cultivo no meio CN_{glíc} apresentou a menor produção dentre os três meios utilizados no experimento.

A partir dos dados obtidos, pode-se afirmar que o meio HID apresentou a maior atividade enzimática (0,050 U/mL) e a maior atividade enzimática específica (9,62 U/mgP) dentre os três meios estudados. Desta forma, o meio HID foi comprovado como o melhor dentre os três meios para a produção de celulases e a biomassa hidrolisada de *S. filiformis* demonstrou ser uma fonte de carbono alternativa promissora para processos fermentativos.

5 CONCLUSÃO

A hidrólise ácida da biomassa gerou um líquido rico em carboidratos fermentescíveis de concentração $24,943 \pm 3,21$ g/L capazes de promover a multiplicação de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 em meio de cultivo HID formulado a partir do hidrolisado. Neste meio, a concentração máxima de células viáveis foi de $4,17 \times 10^{13}$ UFC/mL e uma velocidade máxima de crescimento de $8,69 \times 10^{11}$ UFC/mL.h. Esse meio apresentou o melhor perfil de produção de enzimas celulolíticas com uma atividade enzimática máxima de 0,050 U/mL às 72 h de cultivo e uma atividade enzimática específica máxima de 9,62 U/mgP no tempo 0, além de apresentar atividade proteolítica máxima de 28,05 U/mL e atividade proteolítica específica máxima de 7.453,76 U/mgP às 24 h de cultivo. Dessa forma, o meio HID se mostrou um meio alternativo promissor para processos fermentativos e para a produção de enzimas proteolíticas e celulolíticas.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, J. M. M., Toop, T. A., Donnison, I. S.; Gallagher, J. A. (2011). Seasonal variation in *Laminaria digitata* and its impact on biochemical conversion routes to biofuels. **Bioresource Technology**, 102 (21), 9976–9984. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.08.032>

ALBALASMEH, A. A., Berhe, A. A.; Ghezzehei, T. A. (2013). A new method for rapid determination of carbohydrate and total carbon concentrations using UV spectrophotometry. **Carbohydrate Polymers**, 97(2), 253–261. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.04.072>

ALBUQUERQUE, J. C. S., Araújo, M. L. H., Rocha, M. V. P., de Souza, B. W. S., de Castro, G. M. C., Cordeiro, E. M. S., Silva, J. de S.; Benevides, N. M. B. (2021). Acid hydrolysis conditions for the production of fine chemicals from *Gracilaria birdiae* alga biomass. **Algal Research**, 53. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.102139>

ALQAHTANI, Y. S., More, S. S., Keerthana, R., Shaikh, I. A., Anusha, K. J., More, V. S., Niyonzima, F. N., Muddapur, U. M.; Khan, A. A. (2022). Production and Purification of Pectinase from *Bacillus subtilis* 15A-B92 and Its Biotechnological Applications. **Molecules**, 27(13). <https://doi.org/10.3390/molecules27134195>

ÁLVAREZ-VIÑAS, M., Flórez-Fernández, N., Torres, M. D., & Domínguez, H. (2019). Successful approaches for a red seaweed biorefinery. In **Marine Drugs** (Vol. 17, n 11). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/md17110620>

BRADFORD, M. M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. In **Analytical Biochemistry** (Vol. 72).

CHARNEY, J. & TOMARELLI, R.M., A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. **J. Biol. Chemical**. v.170, n. 23, p.501-505, 1947.

CHEN, X., Lu, Y., Zhao, A., Wu, Y., Zhang, Y.; Yang, X. (2022). Quantitative analyses for several nutrients and volatile components during fermentation of soybean by *Bacillus subtilis* natto. **Food Chemistry**, 374. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131725>

CHO, H., Ra, C. H.; Kim, S. K. (2014). Ethanol production from the seaweed *Gelidium amansii*, using specific sugar acclimated yeasts. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, 24(2), 264–269. <https://doi.org/10.4014/jmb.1307.07054>

DE CASTRO, G. M. C., Benevides, N. M. B., Cabral, M. C., Miranda, R. D. S., Filho, E. G., Rocha, M. V. P.; Araújo, M. L. H. (2017). Optimized acid hydrolysis of the polysaccharides from the seaweed *Solieria filiformis* (Kützinger) P.W. Gabrielson for bioethanol production. **Acta Scientiarum - Biological Sciences**, 39(4), 423–430. <https://doi.org/10.4025/actascibiolsci.v39i4.37227>

ERRINGTON J., Aart LTV. Microbe Profile: *Bacillus subtilis*: model organism for cellular development, and industrial workhorse. **Microbiology** (Reading). 2020 May;166(5):425-427. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000922>

- FREITAS, M. v., Inácio, L. G., Martins, M., Afonso, C., Pereira, L.; Mouga, T. (2022). Primary Composition and Pigments of 11 Red Seaweed Species from the Center of Portugal. **Journal of Marine Science and Engineering**, 10(9). <https://doi.org/10.3390/jmse10091168>
- GHOSE, T. K. (1987). INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY APPLIED CHEMISTRY DIVISION COMMISSION ON BIOTECHNOLOGY* MEASUREMENT OF CELLULASE ACTIVITIES. In **Pure Chem** (Vol. 59, n 2).
- GREETHAM, D., Adams, J. M.; Du, C. (2020). The utilization of seawater for the hydrolysis of macroalgae and subsequent bioethanol fermentation. **Scientific Reports**, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-66610-9>
- GUO, Z., Wei, Y., Zhang, Y., Xu, Y., Zheng, L., Zhu, B.; Yao, Z. (2022). Carrageenan oligosaccharides: A comprehensive review of preparation, isolation, purification, structure, biological activities and applications. In **Algal Research** (Vol. 61). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102593>
- HAKIM, A., Rumzum Bhuiyan, F., Iqbal, A., Hossain Emon, T., Ahmed, J.; Kalam Azad, A. (2018). Production and partial characterization of dehairing alkaline protease from *Bacillus subtilis* AKAL7 and *Exiguobacterium indicum* AKAL11 by using organic municipal solid wastes. **Heliyon**, 4, 646. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018>
- HARRYSSON, H., Hayes, M., Eimer, F., Carlsson, N. G., Toth, G. B.; Undeland, I. (2018). Production of protein extracts from Swedish red, green, and brown seaweeds, *Porphyra umbilicalis* Kützinger, *Ulva lactuca* Linnaeus, and *Saccharina latissima* (Linnaeus) J. V. Lamouroux using three different methods. **Journal of Applied Phycology**, 30(6), 3565–3580. <https://doi.org/10.1007/s10811-018-1481-7>
- HARWOOD, C. R., Mouillon, J. M., Pohl, S.; Arnau, J. (2018). Secondary metabolite production and the safety of industrially important members of the *Bacillus subtilis* group. In **FEMS Microbiology Reviews** (Vol. 42, n 6, pp. 721–738). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuy028>
- HASHMI, S.; Iqbal, S.; Ahmed, I.; Janjua, H.A. Production, Optimization, and Partial Purification of Alkali-Thermotolerant Proteases from Newly Isolated *Bacillus subtilis* S1 and *Bacillus amyloliquefaciens* KSM12. **Processes** 2022, 10, 1050. <https://doi.org/10.3390/pr10061050>
- JANG, S. S. (2012). Production of mono sugar from acid hydrolysis of seaweed. **African Journal of Biotechnology**, 11(8). <https://doi.org/10.5897/ajb10.1681>
- JOHN, R. P., Anisha, G. S., Nampoothiri, K. M.; Pandey, A. (2011). Micro and macroalgal biomass: A renewable source for bioethanol. **Bioresource Technology**, 102(1), 186–193. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.139>
- KIM, H., Kang, B.-J., Kim, S.-H., Park, J.-H.; Yoon, J. (2022). Application of magnetite supplementation for enhancing biohydrogen production using *Gelidium amansii* hydrolysate. https://papers.ssrn.com/sol3/papers.cfm?abstract_id=4255547
- KIMURA, K.; Yokoyama, S. (2019). Trends in the application of *Bacillus* in fermented foods. In **Current Opinion in Biotechnology** (Vol. 56, pp. 36–42). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2018.09.001>

- KOSTAS, E. T., Adams, J. M. M., Ruiz, H. A., Durán-Jiménez, G., & Lye, G. J. (2021). Macroalgal biorefinery concepts for the circular bioeconomy: A review on biotechnological developments and future perspectives. In **Renewable and Sustainable Energy Reviews** (Vol. 151). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2021.111553>
- LAKSHMI, D. S., Sankaranarayanan, S., Gajaria, T. K., Li, G., Kujawski, W., Kujawa, J.; Navia, R. (2020). A short review on the valorization of green seaweeds and ulvan: Feedstock for chemicals and biomaterials. In **Biomolecules** (Vol. 10, n 7, pp. 1–20). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/biom10070991>
- MALEKI, F., Changizian, M., Zolfaghari, N., Rajaei, S., Noghabi, K. A.; Zahiri, H. S. (2021). Consolidated bioprocessing for bioethanol production by metabolically engineered *Bacillus subtilis* strains. **Scientific Reports**, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-92627-9>
- MARINHO, G. S., Sørensen, A. D. M., Safafar, H., Pedersen, A. H.; Holdt, S. L. (2019). Antioxidant content and activity of the seaweed *Saccharina latissima*: a seasonal perspective. **Journal of Applied Phycology**, 31(2), 1343–1354. <https://doi.org/10.1007/s10811-018-1650-8>
- MEGAWATI, Bahlawan, Z. A. S., Damayanti, A., Putri, R. D. A., Triwibowo, B.; Prasetiawan, H. (2022). Comparative Study on the Various Hydrolysis and Fermentation Methods of *Chlorella vulgaris* Biomass for the Production of Bioethanol. **International Journal of Renewable Energy Development**, 11(2), 515–522. <https://doi.org/10.14710/IJRED.2022.41696>
- MEINITA, M. D. N., Hong, Y. K.; Jeong, G. T. (2012). Comparison of sulfuric and hydrochloric acids as catalysts in hydrolysis of *Kappaphycus alvarezii* (cottonii). **Bioprocess and Biosystems Engineering**, 35(1–2), 123–128. <https://doi.org/10.1007/s00449-011-0609-9>
- MILLER G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426, 1959.
- MOHSIN, M. Z., Omer, R., Huang, J., Mohsin, A., Guo, M., Qian, J.; Zhuang, Y. (2021). Advances in engineered *Bacillus subtilis* biofilms and spores, and their applications in bioremediation, biocatalysis, and biomaterials. In **Synthetic and Systems Biotechnology** (Vol. 6, n° 3, pp. 180–191). KeAi Communications Co. <https://doi.org/10.1016/j.synbio.2021.07.002>
- MONI, R., Khan, M. A. A. N., Islam, M. Z., Zohora, U. S.; Rahman, M. S. (2022). Biofilm Fermentation: A Propitious Method for the Production of Protease Enzyme by *Bacillus subtilis* RB14. **Industrial Biotechnology**, 18(1), 48–59. <https://doi.org/10.1089/ind.2021.0016>
- MUSTEFA S., Venkatesa, S., Mumecha, T. K.; Gameda, M. T. (2021). Production of Alkaline Proteases using *Aspergillus sp.* Isolated from Injera: RSM-GA Based Process Optimization and Enzyme Kinetics Aspect. **Current Microbiology**, 78(5), 1823–1834. <https://doi.org/10.1007/s00284-021-02446-4>
- NAKHATE, P., & van der Meer, Y. (2021). A systematic review on seaweed functionality: A sustainable bio-based material. **Sustainability** (Switzerland), 13(11). <https://doi.org/10.3390/su13116174>

OLIVEIRA, T. Avaliação da produção de enzimas celulolíticas por fungos isolados da região dos Campos Gerais. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Ponta Grossa. 2020.

OLSSON, J., Toth, G. B.; Albers, E. (2020). Biochemical composition of red, green and brown seaweeds on the Swedish west coast. <https://doi.org/10.1007/s10811-020-02145-w/Published>

PARK, H., Park, G., Jeon, W., Ahn, J. O., Yang, Y. H., Choi, K. Y., Whole-cell biocatalysis using cytochrome P450 monooxygenases for biotransformation of sustainable bioresources (fatty acids, fatty alkanes, and aromatic amino acids), **Biotechnology Advances**, Volume 40, 2020, 107504, ISSN 0734-9750, <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107504>

PARK, S. A., Bhatia, S. K., Park, H. A., Kim, S. Y., Sudheer, P. D. V. N., Yang, Y. H.; Choi, K. Y. (2021). *Bacillus subtilis* as a robust host for biochemical production utilizing biomass. In **Critical Reviews in Biotechnology** (Vol. 41, n 6, pp. 827–848). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/07388551.2021.1888069>

PEÑUELA, A., Robledo, D., Bourgougnon, N., Bedoux, G., Hernández-Nú ez, E.; Freile-Peigrín, Y. (2018). Environmentally friendly valorization of *Solieria filiformis* (Gigartinales, Rhodophyta) from IMTA using a biorefinery concept. **Marine Drugs**, 16(12). <https://doi.org/10.3390/md16120487>

PLIEGO-CORTÉS, H., Bedoux, G., Boulho, R., Taupin, L., Freile-Peigrín, Y., Bourgougnon, N.; Robledo, D. (2019). Stress tolerance and photoadaptation to solar radiation in *Rhodomenia pseudopalmata* (Rhodophyta) through mycosporine-like amino acids, phenolic compounds, and pigments in an Integrated Multi-Trophic Aquaculture system. **Algal Research**, 41. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101542>

PRADHAN, B., Bhuyan, P. P., Patra, S., Nayak, R., Behera, P. K. Behera, C., Behera, A. K., Ki, J., Jena, M., Beneficial effects of seaweeds and seaweed-derived bioactive compounds: Current evidence and future prospective, **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, Volume 39, 2022, 102242, ISSN 1878-8181, <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102242>.

RAJAK, R. C., Jacob, S.; Kim, B. S. (2020). A holistic zero waste biorefinery approach for macroalgal biomass utilization: A review. **Science of the Total Environment**, 716. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137067>

RAJNISH, K. N., Samuel, M. S., John J, A., Datta, S., Chandrasekar, N., Balaji, R., Jose, S.; Selvarajan, E. (2021). Immobilization of cellulase enzymes on nano and micro-materials for breakdown of cellulose for biofuel production-a narrative review. In **International Journal of Biological Macromolecules** (Vol. 182, pp. 1793–1802). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.05.176>

RAO, M.B., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S., Deshpande, V.V., 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** 62 (3), 597-635. <https://doi.org/10.1128/MMBR.62.3.597-635.1998>

REKIK, H., Zarái Jaouadi, N., Gargouri, F., Bejar, W., Frikha, F., Jmal, N., Bejar, S.; Jaouadi, B. (2019). Production, purification and biochemical characterization of a novel detergent-stable serine alkaline protease from *Bacillus safensis* strain RH12.

International Journal of Biological Macromolecules, 121, 1227–1239.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.10.139>

RILEY EP, Schwarz C, Derman AI, Lopez-Garrido J. Milestones in *Bacillus subtilis* sporulation research. **Microb Cell**. 2020 Nov 27;8(1):1-16. doi: 10.15698/mic2021.01.739. PMID: 33490228; PMCID: PMC7780723.

RUDKE, A. R., de Andrade, C. J.; Ferreira, S. R. S. (2020). *Kappaphycus alvarezii* macroalgae: An unexplored and valuable biomass for green biorefinery conversion. In **Trends in Food Science and Technology** (Vol. 103, pp. 214–224). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.07.018>

SAHOO, A., Mahanty, B., Daverey, A.; Dutta, K. (2020). Nattokinase production from *Bacillus subtilis* using cheese whey: Effect of nitrogen supplementation and dynamic modelling. **Journal of Water Process Engineering**, 38. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2020.101533>

SAYANIYA, A. V., Patel, P.; Isolation and Characterization of Detergent Compatible Alkaline Protease Producing *Bacillus Subtilis* APO-1. **Biomed J Sci & Tech Res** 35(5)-2021. BJSTR. MS.ID.005750.

SI, J. B., Jang, E. J., Charalampopoulos, D.; Wee, Y. J. (2018). Purification and Characterization of Microbial Protease Produced Extracellularly from *Bacillus subtilis* FBL-1. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, 23(2), 176–182. <https://doi.org/10.1007/s12257-017-0495-3>

SIQUEIRA, J. G. W., Rodrigues, C., Vandenberghe, L. P. de S., Woiciechowski, A. L.; Soccol, C. R. (2020). Current advances in on-site cellulase production and application on lignocellulosic biomass conversion to biofuels: A review. In **Biomass and Bioenergy** (Vol. 132). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2019.105419>

SRIVASTAVA, N., Srivastava, M., Alhazmi, A., Kausar, T., Haque, S., Singh, R., Ramteke, P. W., Mishra, P. K., Tuohy, M., Leitgeb, M.; Gupta, V. K. (2021). Technological advances for improving fungal cellulase production from fruit wastes for bioenergy application: A review. **Environmental Pollution**, 287. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117370>

SUDHAKAR, M. P.; Dharani, G. (2022). Evaluation of seaweed for the production of lactic acid by fermentation using *Lactobacillus plantarum*. **Bioresource Technology Reports**, 17. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2021.100890>

SUNWOO, I. Y., Sukwong, P., Park, Y. R., Jeong, D. Y., Kim, S. R., Jeong, G. T.; Kim, S. K. (2021). Enhancement of Galactose Uptake from *Kappaphycus alvarezii* Using *Saccharomyces cerevisiae* through Deletion of Negative Regulators of GAL Genes. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 193(2), 577–588. <https://doi.org/10.1007/s12010-020-03434-3>

SWINNEN, I. A. M., Bernaerts, K., Dens, E. J. J., Geeraerd, A. H.; van Impe, J. F. (2004). Predictive modelling of the microbial lag phase: A review. **International Journal of Food Microbiology**, 94(2), 137–159. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.01.006>

TEH, Y. Y., Lee, K. T., Chen, W. H., Lin, S. C., Sheen, H. K.; Tan, I. S. (2017). Dilute sulfuric acid hydrolysis of red macroalgae *Euclima denticulatum* with microwave-assisted heating for biochar production and sugar recovery. **Bioresource Technology**, 246, 20–27. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.07.101>

TIAN, Z., Hou, L., Hu, M., Gao, Y., Li, D., Fan, B., Wang, F.; Li, S. (2022). Optimization of Sporulation Conditions for *Bacillus subtilis* BSNK-5. **Processes**, 10(6). <https://doi.org/10.3390/pr10061133>

TONG, K. T. X., Tan, I. S., Foo, H. C. Y., Tiong, A. C. Y., Lam, M. K.; Lee, K. T. (2021). Third-generation L-Lactic acid production by the microwave-assisted hydrolysis of red macroalgae *Eucheuma denticulatum* extract. **Bioresource Technology**, 342. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125880>

VEHAPI, M., İnan, B., Kayacan-Cakmakoglu, S., Sagdic, O.; Özçimen, D. (2022). Optimization of Growth Conditions for the Production of *Bacillus subtilis* Using Central Composite Design and Its Antagonism Against Pathogenic Fungi. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**. <https://doi.org/10.1007/s12602-021-09904-2>

WEN, J., Vischer, N. O. E., de Vos, A. L., Manders, E. M. M., Setlow, P.; Brul, S. (2022). Organization and dynamics of the SpoVAEa protein and its surrounding inner membrane lipids, upon germination of *Bacillus subtilis* spores. **Scientific Reports**, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-09147-3>

WESTERS, L., Westers, H.; Quax, W. J. (2004). *Bacillus subtilis* as cell factory for pharmaceutical proteins: A biotechnological approach to optimize the host organism. In *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* (Vol. 1694, n 1-3 SPEC.ISS., pp. 299–310). <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2004.02.011>

YANAGISAWA, M., Nakamura, K., Ariga, O., Nakasaki, K., Production of high concentrations of bioethanol from seaweeds that contain easily hydrolyzable polysaccharides, **Process Biochemistry**, Volume 46, n 11, 2011, Pages 2111-2116, ISSN 1359-5113, <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.08.001>

ZHANG, L., Zhou, R., Zhang, J.; Zhou, P. (2021). Heat-induced denaturation and bioactivity changes of whey proteins. **International Dairy Journal**, 123. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2021.105175>

ZHANG, X.-Z.; Zhang, Y.-H. P. (2013). Cellulases: Characteristics, Sources, Production, and Applications. In **Bioprocessing Technologies in Biorefinery for Sustainable Production of Fuels, Chemicals, and Polymers** (pp. 131–146). John Wiley; Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/9781118642047.ch8>

ZHANG, Y., Ding, Z., Shahadat Hossain, M., Maurya, R., Yang, Y., Singh, V., Kumar, D., Salama, E.-S., Sun, X., Sindhu, R., Binod, P., Zhang, Z; Kumar Awasthi, M. (2023). Recent advances in lignocellulosic and algal biomass pretreatment and its biorefinery approaches for biochemicals and bioenergy conversion. **Bioresource Technology**, 367, 128281. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.128281>

ANEXO A – VALORES DE ATIVIDADE PROTEOLÍTICA DOS EXTRATOS ENZIMÁTICOS PROVENIENTES DO CULTIVO DE *Bacillus subtilis* EM MEIOS DE CULTURA FORMULADOS COM O HIDROLISADO DE *Solieria filiformis* E COM GLICOSE

Amostra (t)	Dosagem de Proteínas (mg/mL)	Atividade Enzimática (U/mL)	Atividade Enzimática Específica (U/mgP)
H _{1:1} (0)	0,005	2,70	538,11
H _{1:1} (10)	0,004	2,05	544,75
H _{1:1} (24)	0,030	2,10	69,75
H _{1:1} (48)	0,047	0,55	11,61
H _{1:1} (58)	0,054	4,90	90,32
H _{1:1} (72)	0,058	1,80	31,03
HID (0)	0,004	8,10	1.844,93
HID (10)	0,008	14,60	1.939,84
HID (24)	0,004	28,05	7.453,76
HID (48)	0,009	12,30	1.400,78
HID (58)	0,024	7,05	295,80
HID (72)	0,060	21,80	363,95
CN _{glic} (0)	0,003	0,43	155,79
CN _{glic} (10)	0,004	0,30	80,89
CN _{glic} (24)	0,022	2,90	130,32
CN _{glic} (48)	0,031	45,20	1470,74
CN _{glic} (58)	0,064	43,90	689,59
CN _{glic} (72)	0,057	9,10	158,57

Fonte: Elaborada pela autora.

ANEXO B – VALORES DE ATIVIDADE CELULOLÍTICA DOS EXTRATOS ENZIMÁTICOS PROVENIENTES DO CULTIVO DE *Bacillus subtilis* EM MEIOS DE CULTURA FORMULADOS COM O HIDROLISADO DE *Solieria filiformis* E COM GLICOSE

Amostra (t)	Dosagem de Proteínas (mg/mL)	Atividade Enzimática (U/mL)	Atividade Enzimática Específica (U/mgP)
H _{1:1} (0)	0,005	0,015	2,98
H _{1:1} (10)	0,004	0,006	1,67
H _{1:1} (24)	0,030	0,013	0,43
H _{1:1} (48)	0,047	0,011	0,23
H _{1:1} (58)	0,054	0,012	0,22
H _{1:1} (72)	0,058	0,017	0,30
HID (0)	0,004	0,042	9,62
HID (10)	0,008	0,034	4,56
HID (24)	0,004	0,019	5,08
HID (48)	0,009	0,019	2,13
HID (58)	0,024	0,038	1,59
HID (72)	0,060	0,050	0,83
CN _{glic} (0)	0,003	0,0	0,0
CN _{glic} (10)	0,004	0,001	0,0
CN _{glic} (24)	0,022	0,001	0,0
CN _{glic} (48)	0,031	0,019	0,61
CN _{glic} (58)	0,064	0,004	0,07
CN _{glic} (72)	0,057	0,004	0,08

Fonte: Elaborada pela autora.