



**CENTRO UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA - UnICEUB**  
**PROGRAMA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA**

**DIMITRI SOKOLOWSKEI**  
**EDVAR CARNEIRO DA SILVA JUNIOR**

**PROSPECÇÃO *IN SILICO* DE ENZIMAS DO COMPLEXO LIGNINOCELULOLÍTICO**  
**EM *Bacillus thuringiensis***

**BRASÍLIA**  
**2020**



**DIMITRI SOKOLOWSKEI**  
**EDVAR CARNEIRO DA SILVA JÚNIOR**

Relatório final de pesquisa de Iniciação Científica  
apresentado à Assessoria de Pós-Graduação e Pesquisa.

Orientador: Paulo Roberto Martins Queiroz

**BRASÍLIA**

**2020**

**PROSPECÇÃO *IN SILICO* DE ENZIMAS DO COMPLEXO LIGNINOCELULOLÍTICO  
EM *Bacillus thuringiensis***

**Dimitri Sokolowski – UniCEUB, PIC Institucional, aluno bolsista**

*dimitri.sokolowski@sempreceub.com*

**Edvar C. S. Junior - UniCEUB, PIC Institucional, aluno voluntário**

*edvar.junior@sempreceub.com*

**Paulo Roberto Martins Queiroz – UniCEUB, professor orientador**

*paulo.silva@ceub.edu.br*

A busca por fontes de energia alternativa avançam a medida que a disponibilidade de recursos petróleo dependentes diminuem. As biomassas são matrizes orgânicas capazes de serem convertidas em energia. Bactérias do gênero *Bacillus spp.* são produtoras de enzimas do complexo ligninocelulolítico e apresentam grande potencial de uso na produção de biocombustíveis. Algumas espécies do gênero ainda carecem de maiores investigações na busca destas enzimas, como é o caso do *Bacillus thuringiensis*. Portanto, o objetivo do presente trabalho é identificar e descrever a presença de enzimas do complexo ligninocelulolítico em *B. thuringiensis*. Os proteomas das bactérias utilizadas no estudo foram coletados no banco de dados NCBI e os dados foram pré-tratados utilizando linguagem de programação *Python*. Um *script* em VBA foi escrito para semi automatizar a procura das enzimas desejadas nos proteomas das bactérias via interface gráfica *Excel*. Por fim, foi utilizado o programa Clustal Omega para construção de árvore filogenética das espécies coletadas. Foram encontradas 4 diferentes enzimas no proteoma de *B. Thuringiensis*: 6-phospho- $\beta$ -glucosidase,  $\alpha$ -glucosidase,  $\alpha$ -amilase e laccase. Todas estas com potencial de degradação de biomassa, principalmente amido e lignina. Ao analisar outras espécies do gênero, foi indenticado um maior número e diversidade de enzimas do complexo ligninocelulolítico principalmente em *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. velezensis* e *B. subtilis*. Conclui-se que apesar de *B. thuringiensis* apresentar um potencial na degradação de biomassa, outras espécies do gênero podem ser mais eficientes em aplicações reais. Esses achados ampliam o potencial biotecnológico de *B. thuringiensis*, antes restrito à produção de bioinseticidas e plantas resistentes à praga.

**Palavras chave: Biomassa; *Bacillus*; *Bacillus thuringiensis*; Biocombustíveis.**

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	2
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	3
3. METODOLOGIA.....	5
3.1 COLETA DE DADOS.....	5
3.2 TRATAMENTO DE DADOS.....	6
3.3 IDENTIFICAÇÃO DAS ENZIMAS.....	6
3.4 FILOGENIA.....	6
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	7
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	14
6. REFERÊNCIAS.....	14

## 1. INTRODUÇÃO

O amplo uso e queima de derivados do petróleo representa grande parte da matriz energética consumida mundialmente. O diesel, por exemplo, é um combustível muito utilizado na movimentação de veículos, seja para o transporte ou para aplicações industriais. Esses combustíveis, de fontes não renováveis, possuem esgotamento premeditado para um futuro próximo, podendo colocar em risco grande parte da estrutura energética global (FERREIRA *et al.*, 2014).

A produção e pesquisa de vias energéticas alternativas vêm ganhando notoriedade devido ao potencial de menor produção de gases poluentes e contínuo esgotamento dos combustíveis fósseis (AKIA *et al.*, 2014). Todavia, dificuldades de implantação de matrizes energéticas “verdes” são consideráveis, em parte pelo alto custo da substituição da infraestrutura mundial petróleo-dependente e pelo baixo rendimento energético comparado às fontes fósseis em utilização atualmente (CARNEIRO *et al.*, 2017).

As biomassas são, potencialmente, todas e quaisquer formas de matéria orgânica capazes de serem convertidas em energia (BRACMORT, 2013). Devido a abundância de biomassas na natureza e nas formas artificialmente produzidas, a partir de resíduos de colheita, desperdício alimentar ou resíduos sólidos de esgoto, as biomassas tornaram-se uma fonte viável e importante na produção de energia pela conversão dessa matriz em biocombustíveis de segunda geração (TUCK *et al.*, 2012).

A descoberta de enzimas em microrganismos capazes de degradar biomassa possibilitou a aplicação de agentes biológicos no pré-tratamento da biomassa, e consiste numa abordagem promissora na produção de biocombustíveis (AGBOR *et al.*, 2011). Os fungos são excelentes produtores de celulases e enzimas degradadora de lignina, mas diversas bactérias produtoras de enzimas do complexo ligninocelulolítico já foram descritas na literatura e são importantes focos de estudo (MAKI; LEUNG; QIN, 2009).

Dentro desse contexto, várias espécies de bactérias do gênero *Bacillus spp.* foram descritas como produtoras de enzimas ligninocelulolíticas (RASTOGI *et al.*, 2010). Alguns membros, no entanto, ainda carecem de investigações mais aprofundadas a respeito do seu potencial enzimático quanto a degradação de biomassa como é o caso do *B. thuringiensis*. O estudo dessa bactéria específica em busca de enzimas do complexo ligninocelulolítico poderia, não somente ampliar o número de bactérias descritas com potencial degradador de

biomassa, mas também expandir as propriedades biotecnológicas já descritas nesses microrganismos (SANAHUJA *et al.*, 2011).

Com isso, o objetivo do presente trabalho foi identificar e descrever a presença de enzimas do complexo ligninocelulolítico em *B. thuringiensis*.

## 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

O gênero *Bacillus spp.* é constituído por bactérias, em sua maioria, Gram-positivas, aeróbicas e formadoras de esporos que podem garantir grande resistência e longa vida destes microrganismos em ambientes hostis. Esses microrganismos são encontrados em abundância na natureza como no solo, vegetação, águas, alimentos, insetos e, em determinadas situações, em seres humanos (FANGIO; ROURA; FRITZ, 2010; JAWETZ *et al.*, 2014).

Alguns membros do gênero *Bacillus* são particularmente de grande destaque. Determinadas espécies possuem grande relevância clínica especialmente *B. anthracis* e *B. cereus* causadores do antraz e intoxicação alimentar, respectivamente. Outras espécies como *B. thuringiensis* são de relevância biotecnológica e econômica significantes, sendo utilizadas amplamente como bioinseticida e no desenvolvimento de plantas resistentes à pragas (SANAHUJA *et al.*, 2011). Algumas outras ainda apresentam grande potencial em áreas de biodegradação, remediação e uso como probiótico (LATEEF; ADELERE; GUEGUIM-KANA, 2015).

A busca por fontes de energia alternativa e o desenvolvimento de tecnologias voltadas para a maximização energética e produção de biocombustíveis, tem sido impulsionada nas últimas décadas em decorrência do esgotamento de combustíveis fósseis e pelo aquecimento global (CHUNDAWAT *et al.*, 2011). A queima de derivados do petróleo é uma das principais e mais importantes causas da poluição do ar, estando associadas à danos ao meio ambiente e a saúde humana (ANDERSON; THUNDIYIL; STOLBACH, 2011; XUE *et al.*, 2015).

Os recursos e matérias-primas utilizadas para produção de biocombustíveis são derivados principalmente da cana de açúcar (GOLDEMBERG, 2009). No entanto, discussões quanto a sustentabilidade dessa abordagem quanto aos impactos ambientais e segurança alimentar mundial tem levantado grandes questionamentos sobre a relevância e reais benefícios dos biocombustíveis de primeira geração (G1) atualmente (MOHR; RAMAN,

2013). O potencial uso de resíduos orgânicos alternativos, também chamados de biomassa, tem ganhado grande relevância. Os grandes volumes de biomassa produzidos como resíduos, por exemplo, pelo agronegócio, fornecem uma fonte enorme de matéria-prima e a matriz rica em açúcares e carbono das biomassas favorecem a fermentação para produção de biocombustíveis de segunda geração (G2) (GRAÇA *et al.*, 2012; ANWAR; GULFRAZ; IRSHAD, 2014).

As matrizes estruturais básicas das paredes celulares das biomassas são muito similares, apesar da proporção de cada componente variar dependendo da origem e do tipo do substrato orgânico (STEFANIDIS *et al.*, 2013). Três principais componentes formam a biomassa: celulose, hemicelulose e lignina. O entendimento da organização e composição primordial das biomassas ligninocelulolíticas são essenciais para o *design* de métodos de degradação e reaproveitamento eficazes e inteligentes, e influenciam o grau de degradação da biomassa (JIMENEZ-FLORES *et al.*, 2010; CHEN, 2014).

A celulose é o principal polissacarídeo de parede celular de plantas e consiste na porção mais abundante da biomassa, representando até 50% do peso seco total de plantas (XU *et al.*, 2013). A organização estrutural da celulose é complexa, sendo formada por centenas de resíduos glicolíticos, altamente polimerizados, ligados entre si por ligações  $\beta$ -1,4-glicosídicas e que formam agregados de microfibrilas estabilizados via interações intra e extramoleculares (GUERRIERO *et al.*, 2016).

A hemicelulose pertence a um grupo de polissacarídeos que apresenta uma elevada diversidade de composições e estruturas dependendo da planta e tecido onde é extraída (WAYMAN, 2013). Comumente são divididas em quatro principais grupos como xilose, manose, arabinose e galactose, além de muitos outros derivados. Por fim, a lignina é um polímero fenilpropanóide complexo derivado de estruturas pertencentes aos alcoóis, que interage e se entrelaça com a celulose e hemicelulose formando paredes celulares firmes e resistentes a biodegradação, tornando-se portanto, um dos maiores empecilhos para degradação da biomassa (MARTINEZ *et al.*, 2009; CHEN, 2014).

O uso de biomassas como matéria básica para produção de biocombustível requer alguns processos básicos de tratamento. O pré-tratamento inicial da biomassa é conduzido com o objetivo de modificar características físico-químicas da biomassa e dos componentes ligninocelulolíticos, a fim de facilitar a hidrólise dos grupos carboidrato para geração de monômeros de açúcar, capazes de serem fermentados para produção de biocombustíveis

(ZHENG; PAN; ZHANG, 2009). Tratamentos físicos como a moagem e fragmentação da biomassa, aplicação de altas temperaturas e abordagens químicas como indução de hidrólise por ácidos concentrados, são abordagens viáveis como via de pré-tratamento, todavia muitas vezes são caras, ineficientes, energeticamente custosas e podem levar a degradação de açúcares durante o processo (KUMAR *et al.*, 2009; ZHU; PAN; ZALESNY, 2010).

Amplios estudos e investigações possibilitaram a identificação de agentes biológicos produtores de enzimas do complexo ligninocelulolítico capazes de degradar biomassa, tais como celulasas, hemicelulasas e enzimas degradadoras de lignina. Fungos do gênero *Trichoderma* e *Aspergillus* sp. são particularmente conhecidos como microrganismos modelo na produção de celulasas (SRIVASTAVA *et al.*, 2017) e, ainda, bactérias do gênero *Clostridium* (DESVAUX, 2005), *Acinetobacter* (EKPERIGIN, 2007), *Streptomyces* (VINHA *et al.*, 2011) e diversos outros gêneros de bactérias (LIANG *et al.*, 2014) foram identificados como produtores de uma vasta diversidade de enzimas do complexo ligninocelulolítico.

Esses microrganismos ganharam grande notoriedade no contexto de degradação de biomassa, pois são uma alternativa economicamente viável em relação a métodos físico-químicos de degradação, são ecologicamente corretos pela diminuição do custo energético envolvidos no processo e pela diminuição da produção de rejeitos finais (WAN, LI, 2012).

Membros do gênero *Bacillus* spp. têm sido citadas como importante fonte de enzimas ligninocelulolíticas, como *B. subtilis* (BIEN *et al.*, 2014), *B. pumilus* (BALASUBRAMANIAN; SIMOES, 2014) e *B. amyloliquefaciens* (AMORE *et al.*, 2015). A descrição de celulasas em *B. thuringiensis* também já foi demonstrada (LIN *et al.*, 2012), no entanto mais investigações ainda são necessárias para identificar o real potencial de produção de enzimas por *Bacillus thuringiensis*.

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1 Coleta dos dados

Os dados utilizados para realização do presente trabalho foram coletados do banco de dados *Assembly* administrado pelo NCBI (do inglês, *National Center for Biotechnology Information*). Essa base de dados provê informações básica a respeito de genomas montados e proteomas elucidados de diferentes organismos. Após o *download* dos proteomas das bactérias desejadas, os arquivos foram convertidos do formato .faa para .txt.



### 3.2 Tratamento de dados

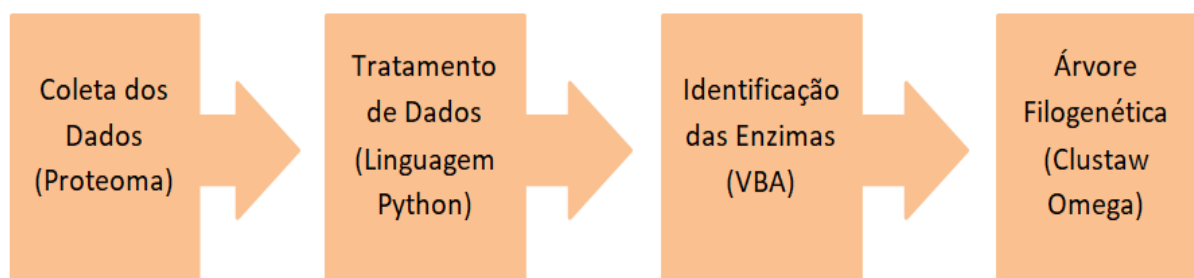
O grande volume de dados obtidos requisitou um pré-tratamento básico. Foi utilizado um *script* em linguagem python (versão 3.6.9) utilizando o IDE (do inglês, *Integrated Development Environment*) Atom (versão 1.50), para conversão e formatação dos arquivos dos proteomas completos em outros arquivos .txt separados e menores.

### 3.3 Identificação de enzimas

Para busca das enzimas desejadas no proteoma das estirpes de cada espécie, foi escrito um *script* em VBA (do inglês, *Visual Basic Applications*) que possibilitou a automatização da procura das enzimas nos arquivos dos proteomas via interface gráfica Excel. A procura das enzimas desejadas se deu pela inserção dos nomes das enzimas, no programa, descritas pela literatura e associadas a degradação de biomassa (JORGENSEN; KRISTENSEN; FELBY, 2007; SAINI; SAINI; TEWARI, 2015; GONG *et al.*, 2017; CHEN *et al.*, 2018). As enzimas que, eventualmente, possam ter sido selecionadas, mas que não tenham correlação ao propósito da pesquisa foram excluídas.

### 3.4 Construção da Árvore Filogenética

A inferência de relações evolutivas entre as diferentes espécies e estirpes coletadas foi realizada pelo programa Clustal Omega (SIEVERS *et al.*, 2011) utilizando o gene *gyrA*. As enzimas mais abundantes e frequentes entre as espécies também foram avaliadas para análise de possível correlação e homologia. O fluxograma 1 esquematiza as etapas do trabalho.



**Fluxograma 1.** Metodologia de trabalho empregada.

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No total foram coletadas nove diferentes espécies de *Bacillus* e para cada espécie foram estudadas três estirpes cada, resultando no estudo total de vinte e sete proteomas diferentes (**tabela 1**).

Espécie de <i>Bacillus</i> spp.	Estirpe 1	Estirpe 2	Estirpe 3
<i>B. amyloliquefaciens</i>	FS1092	KC41	Y2
<i>B. anthracis</i>	2000013094	2000031021	AFS072084
<i>B. cereus</i>	ATCC14579	MLY1	SB1
<i>B. licheniformis</i>	BL1202	DSM13	SCDB34
<i>B. megaterium</i>	AFS057444	ATCC14581	M4
<i>B. pumilus</i>	145	SH-B9	SH-B11
<i>B. subtilis</i>	168	MB9_01	PY79
<i>B. thuringiensis</i>	ATCC35646	ATCC 10972	C15
<i>B. velezensis</i>	9912D	CBMB205	FZB42

**Tabela 1.** Relação de espécies e estirpes coletadas para estudo.

Em todas as espécies e estirpes, investigadas no presente trabalho, foram encontradas enzimas descritas na literatura com potencial de degradação de biomassa (JORGENSEN; KRISTENSEN; FELBY, 2007). A produção de enzimas ligninocelulolíticas por *Bacillus* não é novidade. Estudos conduzidos por Jones e colaboradores (2012) permitiram a identificação de complexos multienzimáticos em *B. subtilis* capazes de degradar xilana, um importante componente da hemicelulose de biomassas. Ainda, a identificação de novas enzimas, como endo-1,4- $\beta$ -xylanase, em *B. amyloliquefaciens* propicia novas aplicações desse microrganismo na sacarificação de grãos de interesse na produção de biocombustíveis (AMORE *et al.*, 2015).

Apesar da grande relevância biotecnológica de *B. thuringiensis* na produção de bioinseticidas e criação de plantas resistentes a pragas (SANAHUJA *et al.*, 2011), seu potencial na produção de enzimas ligninocelulolíticas ainda não é totalmente conhecido. Lin e colaboradores (2012) reportaram a produção de celulases de *B. thuringiensis* com potencial hidrolítico contra carboximetil celulose (CMC). Apesar disso, a identificação e caracterização estrutural das enzimas não foi realizada. As análises de bioinformática conduzidas no presente estudo identificaram no total quatro classes distintas de enzimas em

*B. thuringiensis* capazes de degradar biomassa. São essas: 6-phospho- $\alpha$ -glucosidase,  $\alpha$ -glucosidase,  $\alpha$ -amilase e lacase (**tabela 2**).

Enzimas identificadas	<i>B. thuringiensis</i>		
	ATCC 35646	ATCC 10972	C15
endoglucanase	X	X	X
$\beta$ -glucanase	X	X	X
glucohydrolase	X	X	X
glucohydrolase	X	X	X
6-phospho- $\alpha$ -glucosidase	X	X	X
6-phospho- $\beta$ -glucosidase	O	O	O
$\alpha$ -glucosidase	X	O	O
aryl-phospho- $\beta$ -D-glucosidase	X	X	X
$\alpha$ -amilase	O	O	O
glycoside hydrolase 43	X	X	X
arabinoxylan	X	X	X
arabinofuranohydrolase	X	X	X
glucuronoxylanase	X	X	X
arabinan endo-1,5- $\alpha$ -L-arabinosidase	X	X	X
Endo- $\alpha$ -(1-5)-L-arabinanase	X	X	X
$\alpha$ -N-arabinofuranoside	X	X	X
$\beta$ -mannosidase	X	X	X
endo-1,4- $\beta$ -galactanase	X	X	X
6-phospho- $\beta$ -galactosidase	X	X	X
laccase	X	O	O
sucrose-6-phosphate hydrolase	X	X	X
pectate lyase	X	X	X
endo-1,4-beta-xylanase	X	X	X
alpha-N-arabinofuranosidase	X	X	X
acetylxylyl esterase	X	X	X

**Tabela 2.** Enzimas presentes no proteoma de *B. thuringiensis*. O - Enzimas encontradas, X - Enzimas não encontradas.

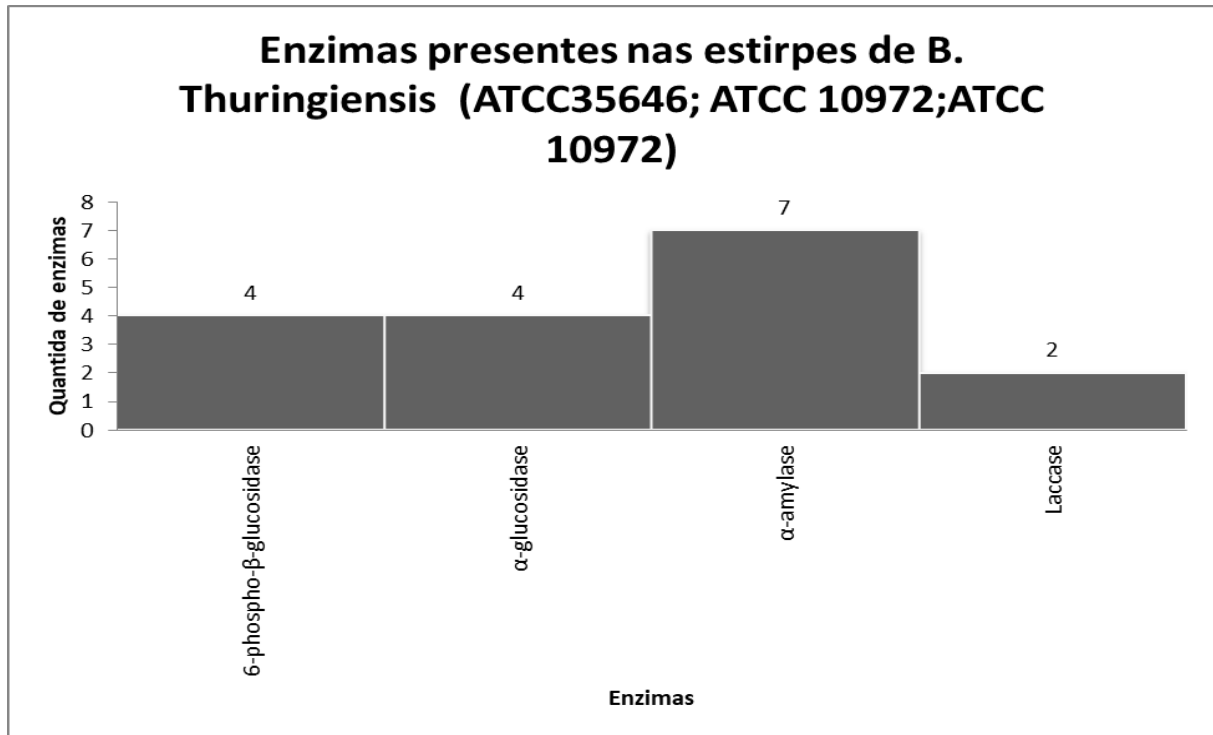
As  $\alpha$ -amilases, assim como,  $\alpha$ -glucosidases, são consideradas enzimas degradadoras de amido (MARQUES *et al.*, 2018). As macromoléculas de amido são polímeros de carboidratos de plantas que atuam como reservas de carboidratos e são formados por monômeros de açúcar conectados por ligações  $\alpha$ -1,4-glicosídicas e ramificados por ligações  $\alpha$ -1,6-glicosídicas (BERTOFT, 2017). A grande abundância de açúcares presentes no amido, o faz um substrato viável e factível para produção de biocombustível (MARQUES *et al.*, 2018).

O uso de  $\alpha$ -amilases de microrganismos para degradação de amido já foi amplamente descrito na literatura, sendo essa enzima responsável pela hidrólise das ligações  $\alpha$ -1,4-glicosídicas liberando produtos como glicose e maltose, açúcares esses importantes para processo de sacarificação e para produção de biocombustíveis (RUIZ *et al.*, 2011; SOUSA *et al.*, 2017). As  $\alpha$ -glucosidases promovem o rompimento tanto das ligações  $\alpha$ -1,4-glicosídicas quanto  $\alpha$ -1,6-glicosídicas dos açúcares não redutores do amido para produção de glicose (HII *et al.*, 2012). Ainda, as enzimas da família glicosil hidrolases (GH4), na qual a 6-phospho-glucosidase incluem-se, também são relacionadas a ruptura de ligações Beta de dissacarídeos naturalmente fosforilados (YIP; WITHERS, 2004). As lacases são enzimas polifenoloxidasas capazes de promover a oxidação de componentes aromáticos de substratos orgânicos, tendo como oxigênio o aceptor de elétrons final (MADHAVI; LELE, 2009).

Após a identificação das classes enzimáticas encontradas no proteoma de *B. thuringiensis* foram investigadas a quantidade total de enzimas ligninocelulolíticas. O *script* desenvolvido identificou no total 17 enzimas, produzidas pelas 3 estirpes coletadas, sendo estas, sete são  $\alpha$ -amilases, quatro são  $\alpha$ -glucosidases, quatro 6-phospho- $\beta$ -glucosidase e duas lacases. Não houve diferenças significativas quanto ao total produzidos por cada estirpe. No entanto, a ATCC 10972 possui uma  $\alpha$ -amilase a mais que as demais, e a ATCC 35646 apresenta uma 6-phospho- $\beta$ -glucosidase adicional (**gráfico 1**).

Devido a sua complexidade e abundância de polímeros aromáticos, oriundas da polimerização de monolignóis, a lignina é uma fração da biomassa muito suscetível a ação das lacases (VANHOLME *et al.*, 2010; RALPH; LAPIERRE; BOERJAN, 2019). A identificação de lacases em diferentes membros do gênero *Bacillus* já foi muito bem descrita na literatura (MIN ZHAO *et al.*, 2010; SONDHII *et al.*, 2014; RAJESWARI; BHUWANESVARI, 2016). No entanto, apesar das descrições de lacases em *B. thuringiensis* não serem consideráveis,

Olukanni e colaboradores (2013) indicaram a possível produção de lacases em *B. thuringiensis* estirpe RUN1 e seu envolvimento na degradação de corantes industriais.



**Gráfico 1.** Número total das enzimas mais abundantes em *B. thuringiensis*.

A avaliação do potencial total de degradação de biomassa em *B. thuringiensis* é difícil principalmente pela falta de dados e estudos na literatura. O número considerável de  $\alpha$ -amilases pode indicar capacidade considerável na degradação de substratos de amido. Estudo conduzido por Bozic e colaboradores (2011) apontaram  $\alpha$ -amilase termoestável altamente eficiente na degradação de amido bruto em *B. licheniformis*. A eficácia das  $\alpha$ -amilases, quanto a degradação de biomassa, de *B. thuringiensis* ainda deve ser avaliada. A presença de lacases em *B. thuringiensis* amplia o potencial da bactéria em processos de deslignificação (ROTH; SPIESS, 2015), podendo favorecer a produção de monômeros de açúcar de biomassa total, e amplia o potencial biotecnológico da bactéria na degradação de poluentes e descoloração de rejeitos industriais (GUAN *et al.*, 2018)

A identificação das enzimas do complexo lignocelulolítico nas várias espécies de *Bacillus* identificou uma grande diversidade entre as espécies (**Tabela 3**). As espécies *B. amyloliquefaciens*, *B. velezensis*, *B. Subtilis*, *B. licheniformes* e *B. pumilus* foram as espécies nas quais foram identificadas o maior número de enzimas hidrolíticas. As enzimas mais

comuns que foram encontradas em todas as espécies foram a glucohydrolase, arabinoxilanase, arabinan endo-1,5- $\alpha$ -L-arabinosidase, Endo- $\alpha$ -(1-5)-L-arabinanase e endo-1,4- $\beta$ -galactanase.

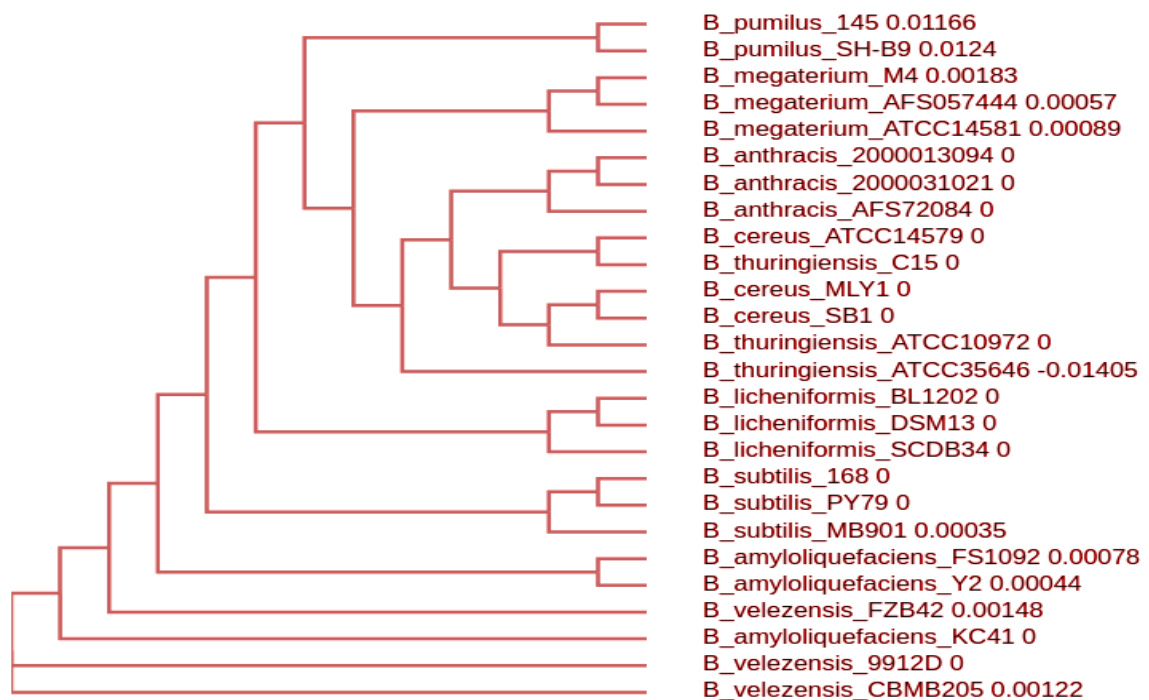
Enzimas	Espécies de <i>Bacillus</i>								
	Amylo-quefaciens	anthracis	cereus	licheniformis	mega-terium	pumilus	subtilis	thuringiensis	Velezensis
endoglucanase	X	X	X	O	X	O	X	X	X
$\beta$ -glucanase	X	X	X	X	X	X	O	X	X
glucohydrolase	X	X	X	X	X	X	X	X	X
glucohydrolase	X	X	X	X	X	X	X	X	X
6-phospho- $\alpha$ -glucosidase	X	X	X	O	X	X	O	X	O
6-phospho- $\beta$ -glucosidase	O	O	O	O	O	O	O	O	O
$\alpha$ -glucosidase	O	O	O	O	O	O	X	X	O
aryl-phospho- $\beta$ -D-glucosidase	X	X	X	X	X	X	O	X	X
$\alpha$ -amylase	X	O	O	O	O	X	O	O	X
glycoside hydrolase 43 family	O	X	X	X	X	O	X	X	O
arabinoxylan	X	X	X	X	X	X	X	X	X
arabinofuranohydrolase	X	X	X	X	X	X	O	X	X
glucuronoxylanase	O	X	X	X	X	O	X	X	O
arabinan endo-1,5- $\alpha$ -L-arabinosidase	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Endo- $\alpha$ -(1-5)-L-arabinanase	X	X	X	X	X	X	X	X	X
$\alpha$ -N-arabinofuranoside	X	X	X	X	X	O	X	X	X
$\beta$ -mannosidase	O	X	X	O	X	X	O	X	O
endo-1,4- $\beta$ -galactanase	X	X	X	X	X	X	X	X	X
6-phospho- $\beta$ -galactosidase	O	X	X	X	X	X	X	X	X
laccase	O	O	O	O	O	O	O	X	O
sucrose-6-phosphate hydrolase	O	X	X	O	O	O	O	X	O
pectate lyase	O	X	X	O	X	O	O	X	O
endo-1,4-beta-xylanase	O	X	X	X	X	X	O	X	O
alpha-N-arabinofuranosidase	O	X	X	O	X	X	X	X	O
acetylxytan esterase	O	X	X	X	X	O	X	X	O

**Tabela 3.** Enzimas presentes no proteoma das várias espécies de *Bacillus*. **O** - Enzimas encontradas, **X** - Enzimas não encontradas.

A grande abundância de distintas espécies de *Bacillus* encontradas nos mais diversos ambientes é um indicativo da heterogeneidade e diversidade do gênero (OGUNTOYINBO, 2007; CIHAN *et al.*, 2012). A construção de árvore filogenética, com os dados coletados, apontou uma elevada proximidade evolutiva entre as espécies *B. cereus*, *B. thuringiensis* e *B.*

*anthracis*. Essa proximidade era esperada, pois tais bactérias são membros do grupo *B. cereus* apresentando entre 99.5% a 100% de similaridade genética, muitas vezes sendo necessários outros métodos de análise para diferenciação entre si (PORWAL *et al.*, 2009). Ademais, as outras espécies e suas respectivas estirpes permaneceram próximas entre si.

A **figura 1** mostra a relação filogenética das espécies e estirpes estudadas. A maior parte das espécies são mais próximas entre si do que de outras, com exceção da grande proximidade entre *B. cereus*, *B. thuringiensis* e *B. anthracis*.



**Figura 1.** Árvore filogenética das espécies e suas respectivas estirpes coletadas.

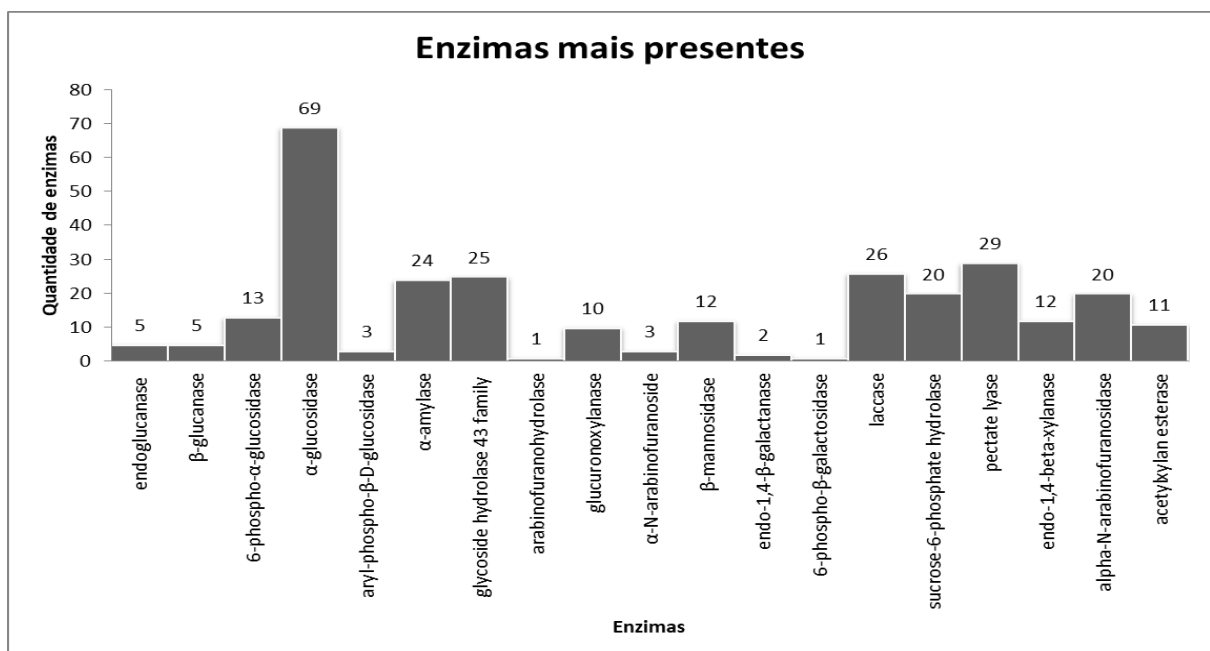
O uso do gene *gyrB* para construção da árvore filogenética foi preferido em relação ao gene 16S. Isso se deu pela baixa taxa de mutação evolutiva do gene 16S, podendo acarretar dificuldades na classificação e discriminação de espécies similares (NICHO *et al.*, 2009; TAKEDA *et al.*, 2010). Também presentes universalmente em espécies de bactérias gram negativas e positivas, o gene *gyrB* torna-se um alvo importante para condução eficiente de estudos taxonômicos em bactérias (TAKEDA *et al.*, 2010).

Ao comparar as enzimas produzidas entre *B. anthracis*, *B. cereus* e *B. thuringiensis* pode-se observar que ambas as espécies produzem as mesmas classes e número total de enzimas lignocelulolíticas, um potencial similar, senão idêntico na degradação de biomassa. Se esses membros do gênero são uma única espécie e cada espécie na realidade é uma

variante, ainda há de ser esclarecido (RASKO *et al.*, 2005; PATINO-NAVARRETE; SANCHIS, 2017). Esse achado, todavia, é extremamente interessante pois mostra que mesmo bactérias, como *B. anthracis* e *B. cereus*, comumente relacionadas a doenças em humanos e animais (BOTTONNE, 2010; CARDOSO; VIEIRA, 2015), podem ser fontes de enzimas de potencial biotecnológico.

A investigação de enzimas do complexo ligninocelulolítico em outras espécies do gênero *Bacillus* também foi realizada. Em relação *B. anthracis*, *B. cereus* e *B. thuringiensis*, os demais membros apresentaram uma quantidade e variabilidade consideravelmente maior de enzimas do complexo ligninocelulolítico. No entanto, enzimas como 6-phospho-glucosidase,  $\alpha$ -glucosidase,  $\alpha$ -amilase e laccase foram encontradas em todas as espécies e praticamente todas as estirpes, indicando que essas enzimas são conservadas entre o gênero. Talvez a abundância de biomassa nos habitats naturais dos *Bacillus* possa ter impulsionado a manutenção de enzimas eficientes na degradação de plantas e extratos vegetais ao longo da história evolutiva do gênero.

A enzima mais presente nas espécies estudadas, e suas respectivas estirpes, apontam a  $\alpha$ -glucosidase como a mais comum e frequente dentro do gênero, seguida pelas pectato liase e lacase. No entanto, outras enzimas como  $\alpha$ -amilase e hidrolases da família 43 também são abundantes, como mostrado pelo **gráfico 2**.



**Gráfico 2.** Enzimas mais presentes em todas as espécies do gênero *Bacillus spp.*

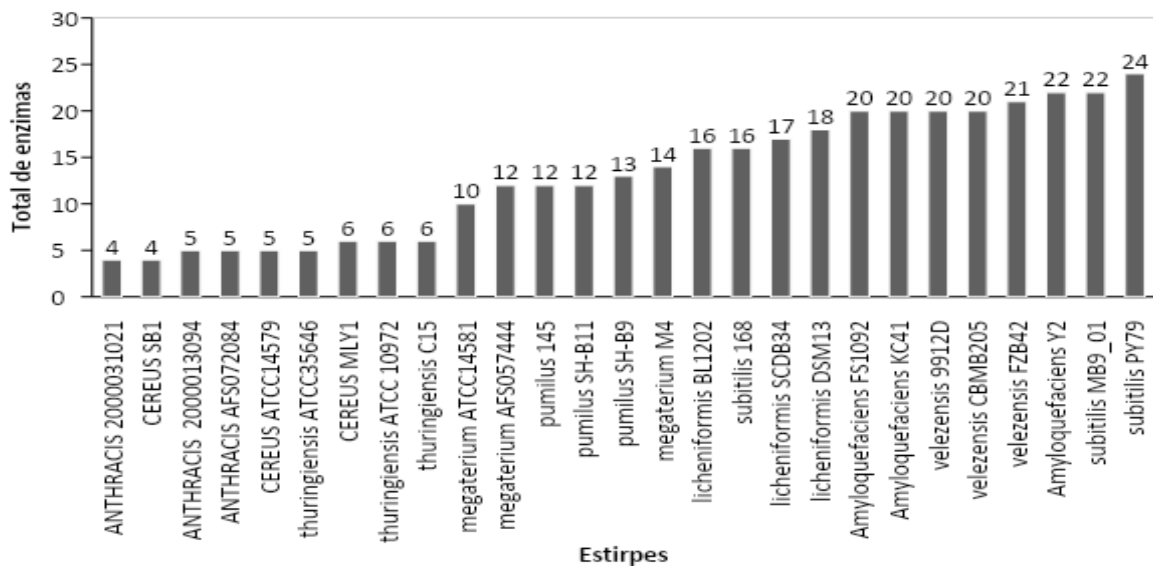


Esses dados corroboram com a literatura. Enzimas ligninocelulolíticas já foram descritas em *B. pumilus* (ARIFFIN *et al*, 2006), *B. licheniformis* (VAN DYK *et al*, 2009), *B. subtilis* (RAWAT; TEWARI, 2012) entre outros. Tais resultados mostram que grande parte, senão todo o gênero *Bacillus*, possui um enorme potencial biotecnológico na degradação de biomassa. Também, apesar de *B. thuringiensis* apresentar enzimas relevantes, essa espécie em particular provavelmente não é a mais promissora no uso biotecnológico na produção de biocombustíveis, tendo representantes como *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. velezensis* e *B. subtilis* com potencial muito maior. Isso pode explicar, em parte, o motivo de estudos sobre *B. thuringiensis* serem escassos quanto à capacidade da bactéria em produzir tais enzimas, e investigações em outras bactérias do gênero *Bacillus* serem mais abundantes e promissoras.

E, por fim, comparando a identificação das espécies usando-se o gene da girase A e o espectro de produção de enzimas foi possível observar a separação das Espécies em dois grupos. Um grupo foi constituído pelas espécies *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. megaterium*, *B. pumilus*, e *B. thuringiensis*. Nesse grupo estão as espécies nas quais foram encontradas as menores quantidade de genes codificadores de enzimas do complexo lignocelulolítico. Já no outro grupo composto pelas espécies *B. amyloquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. subtilis* e *B. velezensis* foram encontradas as espécies com a maior quantidade de genes codificadores das hidrolases analisadas.

O **gráfico 3** aponta o número total de enzimas do complexo ligninocelulolítico produzidos por cada espécie e suas estirpes, indicando o possível potencial biotecnológico na degradação de biomassa de cada uma. As espécies *B. amyloquefaciens*, *B. subtilis* e *B. velezensis* apresentam o maior número total de enzimas, sendo as estirpes Y2, PY79 e FZB42 mais promissoras na degradação de biomassa para cada espécie, respectivamente.

## Maior potencial biotecnológico na degradação de biomassa.



**Gráfico 3.** Espécies com o maior número de enzimas ligninocelulolíticas do gênero *Bacillus* spp.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conclui-se, com o presente trabalho, que *B. thuringiensis* é uma bactéria com capacidade em potencial em degradar biomassa, podendo, portanto, ser usado como agente biológico na produção de biocombustíveis. Todavia, se as enzimas sintetizadas pelo microrganismo são capazes de promover uma degradação eficiente, ainda deverá ser melhor avaliado em próximos estudos. Apesar de produzir enzimas do complexo ligninocelulolítico, *B. thuringiensis* possui uma diversidade e quantidade total de enzimas muito menor que outros membros do gênero, não sendo provavelmente a “primeira escolha” em possíveis aplicações reais. Finalmente, a identificação dessas enzimas propicia a ampliação do potencial biotecnológico da bactéria, não somente para combate de insetos e pragas, mas também no tratamento de rejeitos industriais e até mesmo poluição por resíduo ligninocelulolíticos.

## 6. REFERÊNCIAS

AGBOR, V.B. *et al.* Biomass pretreatment: Fundamentals toward application. **Biotechnology Advances**, Oxford, v. 29, n. 6, p. 675-685, dez, 2011.

AKIA, M. *et al.* A review on conversion of biomass to biofuel by nanocatalysts. **Biofuel Research Journal**, v. 1, n. 1, p. 16-25, jan. 2014.

AMORE, A. *et al.* Application of a new xylanase activity from *Bacillus amyloliquefaciens* XR44A in brewer's spent grain saccharification. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, Oxford, v. 90, n. 3, p. 573-581, mar. 2015.

ANDERSON, J.O.; THUNDIYIL, J.G.; STOLBACH, A. Clearing the Air: A Review of the Effects of Particulate Matter Air Pollution on Human Health. **Journal of Medical Toxicology**, Philadelphia, v. 8, n. 2, p. 166-175, jun. 2012.

ANDLAR, M. *et al.* Lignocellulose degradation: An overview of fungi and fungal enzymes involved in lignocellulose degradation. **Engineering in Life Sciences**, Weinheim, v. 18, n. 11, p. 768-778, jun. 2018.

ANWAR, Z.; GULFRAZ, M.; IRSHAD, M. Agro-industrial lignocellulosic biomass a key to unlock the future bio-energy: A brief review. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, Cairo, v. 7, n. 2, p. 163-173, abr. 2014.

ARIFFIN, H. *et al.* PRODUCTION AND CHARACTERISATION OF CELLULASE BY BACILLUS PUMILUS EB3. **International Journal of Engineering and Technology**, Gurpukur, v. 3, n. 1, p. 47-53, jan. 2006.

BALASUBRAMANIAN, N.; SIMÕES, N. *Bacillus pumilus* S124A carboxymethyl cellulase; a thermo stable enzyme with a wide substrate spectrum utility. **International Journal of Biological Macromolecules**, Guildford, v. 67, p. 132-139, jun. 2014.

BERTOFT, E. Understanding Starch Structure: Recent Progress. **Agronomy**, Basel, v. 7, n. 3, p. 1-29, ago. 2017.

BIEN, T.L.T. *et al.* Secretion of heterologous thermostable cellulases in *Bacillus subtilis*. **The Journal of General and Applied Microbiology**, Tokyo, v. 60, n. 5, p. 175-182, jul. 2014.

BOTTONE, E. *Bacillus cereus*, a Volatile Human Pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 23, n. 2, p. 382-398, abr. 2010.

BOZIC, N. *et al.* Production and properties of the highly efficient raw starch digesting  $\alpha$ -amylase from a *Bacillus licheniformis* ATCC 9945a. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 53, n. 2, p. 203-209, jan. 2011.

BRACMORT, K. Biomass: Comparison of Definitions in Legislation. **Congressional Research Service**, nov. 2013.

CARDOSO, T.B.O.; VIEIRA, D.N. *Bacillus anthracis* como ameaça terrorista. **Saúde Debate**, Rio de Janeiro, v. 40, n. 107, p. 1138-1148, dez. 2015.

CARNEIRO, M.L.N.M. *et al.* Potential of biofuels from algae: Comparison with fossil fuels, ethanol and biodiesel in Europe and Brazil through life cycle assessment (LCA). **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 73, p. 632-653, jun. 2017.

CHEN, H. *Biotechnology of Lignocellulose: Theory and Practice*. Londres: Springer, 2014.

CHEN, L. *et al.* Comparative genome analysis of *Bacillus velezensis* reveals a potential for degrading lignocellulosic biomass. **3 Biotech**, Berlim, v. 8, n. 5, p. 253 (1-5), maio. 2018.

CHUNDAWAT, S.P.S. *et al.* Deconstruction of lignocellulosic biomass to fuels and chemicals. **Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering**, Palo Alto, v. 2, p. 121-145. 2011.

DESVAUX, M. **Clostridium cellulolyticum: model organism of mesophilic cellulolytic clostridia.** **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 29, n. 4, p. 741-764, set. 2005.

EKPERIGIN, M.M. *et al.* Preliminary studies of cellulase production by *Acinetobacter anitratus* and *Branhamella* sp. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 6, n. 1, p. 28-33, jan. 2007.

FERREIRA, R.B. *et al.* TENDÊNCIAS NA LITERATURA CIENTÍFICA GLOBAL SOBRE O BIODIESEL: UMA ANÁLISE CIENCIOMÉTRICA. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 30, n. 2, p. 547-554, out. 2014.

GOLDEMBERG, J. BIOMASSA E ENERGIA. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 582-587, fev. 2009.

GONG, G. *et al.* Complete genome sequence of *Bacillus* sp. 275, producing extracellular cellulolytic, xylanolytic and ligninolytic enzymes. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 254, p. 59-62, jul. 2017.

GRAÇA, I. *et al.* Bio-oils Upgrading for Second Generation Biofuels. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, Washington, v. 52, p. 275-287, nov. 2012.

GUAN, Z.B. *et al.* Bacterial laccases: promising biological green tools for industrial applications. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 75, n. 19, p. 3569-3592, out. 2018.

GUERRIERO, G. *et al.* Lignocellulosic biomass: Biosynthesis, degradation, and industrial utilization. **Engineering in Life Sciences**, Weinheim, v. 16, n. 1, p. 1-16, jul. 2016.

HII, S.L. *et al.* Pullulanase: Role in Starch Hydrolysis and Potential Industrial Applications. **Enzyme Research**, London, v. 2012, n. 921362, set. 2012.

JIMENEZ-FLORES, R. *et al.* A novel method for evaluating the release of fermentable sugars from cellulosic biomass. **Enzyme and Microbial Technology**, Guildford, v. 47, n. 5, p. 206-11, out. 2010.

JONES, S.M.; VAN DYK, S.; PLETSCHKE, B.I. BACILLUS SUBTILIS SJ01 PRODUCES HEMICELLULOSE DEGRADING MULTI-ENZYME COMPLEXES. **BioResources**, Raleigh, v. 7, p. 1294-1309, jan. 2012.

JORGENSEN, H.; KRISTENSEN, J.B.; FELBY, C. Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities. **Biofuels, Bioproducts & Biorefining**, Chichester, v. 1, n. 2, p. 119-134, jun. 2007.

KUMAR, P. *et al.* Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, Washington, v. 48, n. 8, p. 3713-3729, mar. 2009.

LATEEF, A.; ADELERE, I.A.; GUEGUIM-KANA, E.B. The biology and potential biotechnological applications of *Bacillus safensis*. **Biologia**, v. 70, n. 4 p. 411-419, mar. 2015.

- LIN, L. *et al.* Characterization of extracellular cellulose-degrading enzymes from *Bacillus thuringiensis* strains. **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaiso, v. 15, n. 3, p. 1-7, maio. 2012.
- MADHAVI, V.; LELE, S.S. laccase: properties and applications. **BioResources**, Raleigh, v. 4, n. 4, p. 1694-1717, ago. 2009.
- MAKI, M.; LEUNG, K.T.; QIN, W. The prospects of cellulase-producing bacteria for the bioconversion of lignocellulosic biomass. **International Journal of Biological Sciences**, Lake Heaven, v. 5, n. 5, p. 500-516, jul. 2009.
- MARTINEZ, A.T. *et al.* Enzymatic delignification of plant cell wall: from nature to mill. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 20, n. 3, p. 348-357, jun. 2009.
- MOHR, A.; RAMAN, S. Lessons from first generation biofuels and implications for the sustainability appraisal of second generation biofuels. **Energy Policy**, Guildford, v. 63, n. 100, p. 114-122, dez. 2013.
- NICHO, Z. *et al.* Comparison of 16S rRNA, 23S rRNA and gyrB genes sequences in phylogenetic relationships of Shigella isolates from Iran. **Annals of Microbiology**, Milano, v. 59, n. 3, p. 615-622, ago. 2009.
- OGUNTOYINBO, F.A. *et al.* Monitoring of marine Bacillus diversity among the bacteria community of sea water. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 6, n. 2, p. 163-166, jan. 2007.
- OLUKANNI, O.D. *et al.* Biodegradation of Malachite Green by Extracellular Laccase Producing Bacillus thuringiensis RUN1. **Journal of Basic & Applied Sciences**, Karachi, v. 9, p. 543-549, set. 2013.
- PATINO-NAVARRETE, R.; SANCHIS, V. Evolutionary processes and environmental factors underlying the genetic diversity and lifestyles of Bacillus cereus group bacteria. **Research Microbiology**, Amsterdam, v. 168, n. 4, p. 309-318, maio. 2017.
- RAJESWARI, M.; BHUVANESWARI, V. Production of extracellular laccase from the newly isolated Bacillus sp. PK4. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 15, n. 34, p. 1813-1826, ago. 2016.
- RALPH, J.; LAPIERRE, C.; BOERJAN, W. Lignin Structure and its Engineering. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 59, p. 240-249, abr. 2019.
- RASKO, D.A. *et al.* Genomics of the Bacillus cereus group of organisms. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 29, n. 2, p. 303-329, abr. 2005.
- RASTOGI, G. *et al.* Characterization of thermostable cellulases produced by Bacillus and Geobacillus strains. **Bioresource technology**, Barking, v. 101, n. 22, p. 8798-8806, nov. 2010.
- RAWAT, R.; TEWARI, L. Purification and characterization of an acidothermophilic cellulase enzyme produced by Bacillus subtilis strain LFS3. **Extremophiles: life under extreme conditions**, Berlin, v. 16, n. 4, p. 637-644, jul. 2012.

ROTH, S.; SPIESS, A.C. Laccases for biorefinery applications: a critical review on challenges and perspectives. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, Berlin, v. 38, n. 12, p. 2285-2313, dez. 2015.

RUIZ, M.I. *et al.* Enzymatic hydrolysis of cassava starch for production of bioethanol with a colombian wild yeast strain. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 22, n. 12, p. 2337-2343, dez. 2011.

SAINI, J.K.; SAINI, R.; TEWARI, L. Lignocellulosic agriculture wastes as biomass feedstocks for second-generation bioethanol production: concepts and recent developments. **3 Biotech**, Berlin, v. 5, n. 4, p. 337-353, ago. 2015.

SANAHUJA, G. *et al.* Bacillus thuringiensis: a century of research, development and commercial applications. **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, v. 9, n. 3, p. 283-300, abr. 2011.

SIEVERS, F. *et al.* Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. **Molecular Systems Biology**, London, v. 7, n. 539, out. 2011.

SONDHI, S. *et al.* Purification and Characterization of an Extracellular, Thermo-Alkali-Stable, Metal Tolerant Laccase from Bacillus tequilensis SN4. **PLoS One**, San Francisco, v. 9, n. 5, p. e96951, maio. 2014.

SRIVASTAVA, N. *et al.* Applications of fungal cellulases in biofuel production: Advances and limitations. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 82, n. 3, p. 2379-2386, ago. 2017.

STEFANIDIS, S.D. *et al.* A study of lignocellulosic biomass pyrolysis via the pyrolysis of cellulose, hemicellulose and lignin. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, Amsterdam, v. 105, p. 143-150, jan. 2014.

SUKUMARAN, R.K. *et al.* Cellulase production using biomass feed stock and its application in lignocellulose saccharification for bio-ethanol production. **Renewable Energy**, Oxford, v. 34, n. 2, p. 421-424, fev. 2009.

TAKEDA, K. *et al.* Phylogenetic studies of Nocardia species based on gyrB gene analyses. **Journal of Medical Microbiology**, Edinburgh, v. 59, n. 2, p. 165-171, fev. 2010.

TUCK, C.O. *et al.* Valorization of Biomass: Deriving More Value from Waste. **Science**, Nova Iorque, v. 337, n. 6095, p. 695-699, ago. 2012.

VAN DYK, J.S. *et al.* The cellulolytic and hemi-cellulolytic system of Bacillus licheniformis SVD1 and the evidence for production of a large multi-enzyme complex. **Enzyme and Microbial Technology**, Guildford, v. 45, n. 5, p. 372-378, nov. 2009.

VANHOLME, R. *et al.* Lignin Biosynthesis and Structure. **Plant Physiology**, Painesville, v. 153, n. 3, p. 895-905, jul. 2010.

VINHA, F.N.M. *et al.* Cellulase Production by Streptomyces viridobrunneus SCPE-09 Using Lignocellulosic Biomass as Inducer Substrate. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 164, n. 3, p. 256-267, jun. 2011.

WAN, C.; LI, Y. Fungal pretreatment of lignocellulosic biomass. **Biotechnology Advances**, Oxford, v. 30, n. 6, p. 1447-1457, dez. 2012.

WYMAN, C.E. Aqueous Pretreatment of Plant Biomass for Biological and Chemical Conversion to Fuels and Chemicals. Londres: Wiley, 2013.

XUE, J. *et al.* Marine Oil-Degrading Microorganisms and Biodegradation Process of Petroleum Hydrocarbon in Marine Environments: A Review. **Current microbiology**, Nova Iorque, v. 71, n. 2, p. 220-228, ago. 2015.

YIP, V.L.Y.; WITHERS, S.G. Nature's many mechanisms for the degradation of oligosaccharides. **Organic & biomolecular chemistry**, Cambridge, v. 2, n. 19, p. 2707-2713, out. 2004.

ZHENG, Y.; PAN, Z.; ZHANG, R. Overview of biomass pretreatment for cellulosic ethanol production. **International Journal of Agricultural and Biological Engineering**, Roseville, v. 2, n. 3, p. 51-68, set. 2009.

ZHU, J.Y.; PAN, X.; ZALESNY, R.S. Pretreatment of woody biomass for biofuel production: energy efficiency, technologies, and recalcitrance. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 87, n. 3, p. 847-857, jul. 2010.