

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CAMPUS DE FREDERICO WESTPHALEN - RS  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL  
CURSO DE ENGENHARIA AMBIENTAL E SANITÁRIA

Ubiratan Alegransi Bones

**BIOTECNOLOGIA: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE AMIOLÍTICA DE  
BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS**

Frederico Westphalen, RS  
2021

**Ubiratan Alegransi Bones**

**BIOTECNOLOGIA: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE AMIOLÍTICA DE BACILLUS  
AMYLOLIQUEFACIENS**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Curso de Engenharia  
Ambiental e Sanitária da Universidade  
Federal de Santa Maria (UFSM, RS),  
como requisito parcial para obtenção do  
grau de **Engenheiro Sanitarista e  
Ambiental**.

Orientador: Prof. Dr. Jefferson Alves da Costa Júnior

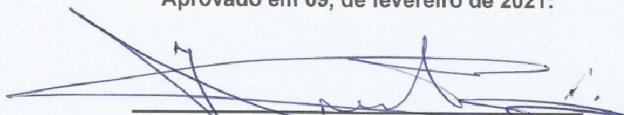
Frederico Westphalen, RS  
2021

**Ubiratan Alegransi Bones**

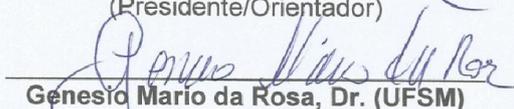
**BIOTECNOLOGIA: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE AMIOLÍTICA DE  
BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Curso de Engenharia  
Ambiental e Sanitária da Universidade  
Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como  
requisito parcial para obtenção do grau de  
**Engenheiro Sanitarista e Ambiental.**

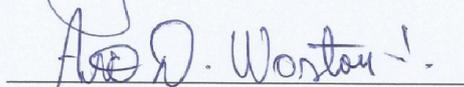
Aprovado em 09, de fevereiro de 2021:



**Jefferson Alves da Costa Júnior, Dr.**  
(Presidente/Orientador)



**Genesio Mario da Rosa, Dr. (UFSM)**



**Arci Dirceu Wastowski, Dr. (UFSM)**

Frederico Westphalen/RS  
2021

## AGRADECIMENTOS

Estar vivo é uma possibilidade de construir um novo mundo. Quanto mais estudo, começo acordar para a realidade e entender o quanto sou e somos pequenos diante daquilo que conhecemos por universo ou mundo. Nossa realidade é construída conforme o nosso próprio sistema de crenças e, por consequência, moldado pelo Consciente (EGO). Não sei se vivo a realidade ou se estou dormindo dentro do sistema e vivendo o que me apresentaram como real, mas enquanto estiver vivo cavarei cada vez mais fundo para talvez um dia saber até onde vai a toca do coelho.

Sou grato ao suposto ser que me criou e me permite estar vivo. Acredito que seria muita audácia de minha parte nomeá-lo ou tentar dizer quem ele é, mas agradeço a oportunidade de poder pensar. Sinto que sou apenas o instrumento para que alguns feitos sejam realizados aqui, em nome dele. Por isso, me dedico ao máximo quando sinto meu coração pulsar.

Agradeço às pessoas que me carregaram e carregam nos ombros até aqui, pois acredito que não há, literalmente, nada que façamos com mérito próprio. É um conjunto de acontecimentos e contribuições, ao acaso ou não, que cruzam os caminhos de seres dentro dessa linha de realidade na qual estamos imersos.

Tenho um apreço muito grande por meu orientador, Professor Jefferson. Um gigante em humildade e conhecimento que me ofereceu o que pode de melhor, pôs-se em meu lugar para que eu pudesse ter uma experiência única do que significa importar-se com o outro. É um amigo que jamais sairá de minha lembrança, gostaria de mais pessoas assim no mundo. Certamente, haveriam mais sorrisos, gentilezas, sinceridade, carinho, ações corretas, pensando na evolução do Todo.

Minha mãe, um ser que me ensinou antes de mais ninguém o que é o amor e o quanto ele transforma tudo para algo esplêndido. Me ensinou que não há sentido em uma vida mundana, que precisamos plantar paz, cuidar e sempre nos tornarmos melhores do que nós mesmos.

Desejo fazer parte da mudança desse mundo, deixando aqui o melhor de mim, sendo íntegro, justo e um eterno aprendiz.

Por fim, deixo minha satisfação em ter conhecido seres iluminados por toda minha vida, desde que me tornei um indivíduo até hoje. Com eles aprendi que independente de qualquer fato, somos um só, na verdade nunca nos separamos do criador, apenas nos afastamos em alguns momentos. Se vi ou vejo mais longe, assim como disse Isaac Newton, é porque estive sobre ombros de gigantes.

## RESUMO

### BIOTECNOLOGIA: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE AMIOLÍTICA DE BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS

AUTOR: Ubiratan Alegransi Bones  
ORIENTADOR: Jefferson Alves da Costa Junior

A biotecnologia é o ramo da ciência que utiliza moléculas, vírus, microrganismos, células, animais, plantas ou parte deles em processos tecnológicos para gerar benefícios para o ser humano e o meio ambiente. Neste contexto, as enzimas são biocatalisadores naturais e extremamente importantes aos processos vitais, uma vez que desenvolvem funções indispensáveis nas reações bioquímicas do metabolismo celular. Estão presentes e ativas nos organismos vivos possuindo especificidades de reação em conformidade aos substratos, a fim de gerar os produtos principais e subprodutos das rotas metabólicas. Sabendo das necessidades humanas para uma população mundial com cerca de 7,7 bilhões de pessoas e a utilidade funcional das enzimas, observa-se de um lado uma gigantesca demanda pelo consumo de diversos produtos do setor agrícola, beneficiados e industrializados, como os alimentos e bebidas; vestuário no setor têxtil; remédios, medicamentos e cosméticos do setor químico-farmacêutico; produção de papel e celulose, nos quais as enzimas, principalmente amilases, têm sido largamente utilizadas nos processos de produção, para viabilizar os custos de fabricação e favorecer economicamente a demanda mundial. Dessa maneira, conforme os experimentos realizados nesse trabalho, a utilização da bactéria *Bacillus amyloliquefaciens*, para produção de amilases, demonstrou ser uma alternativa viável, considerando que os resultados obtidos na eficiência da degradação do substrato amido por estas amilases foram superiores à 90%.

**Palavras-chave:** Amilases, Biotecnologia, Enzimas; Microrganismos

## ABSTRACT

### BIOTECHNOLOGY: EVALUATION OF BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS AMYLOLYTIC ACTIVITY

AUTHOR: Ubiratan Alegransi Bones  
ADVISOR: Jefferson Alves da Costa Júnior

Biotechnology is the branch of science that uses molecules, viruses, microorganisms, cells, animals, plants or part of them in technological processes to generate benefits for humans and the environment. In this context, enzymes are natural biocatalysts and extremely important to vital processes, since they perform essential functions in the biochemical reactions of cellular metabolism. They are present and active in living organisms having specific reaction characteristics in compliance with the substrates, in order to generate the main products and by-products of the metabolic routes. Knowing the human needs for a world population of about 7.7 billion people and the functional utility of enzymes, on the one hand there is a huge demand for the consumption of various products from the agricultural sector, processed and processed, such as food and drinks ; industry in the textile sector; medicines, medicines and cosmetics from the chemical-pharmaceutical sector; production of paper and cellulose, in which enzymes, mainly amylases, have been widely used in production processes, to make manufacturing costs viable and economically favor world demand. Thus, according to the experiments carried out in this work, the use of the bacterium *Bacillus amyloliquefaciens*, for the production of amylases, altered is a viable alternative, considering that the results obtained in the efficiency of the degradation of the starch substrate by these amylases were greater than 90%.

**Key words:** Amylases, Biotechnology, Enzymes; Microorganisms

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura da Enzima e substrato formando o conjugado “Enzima-Substrato” .....	14
Figura 2 - Esquema geral de hidrólise do amido por enzimas amilolíticas.....	19
Figura 3 - Visualização de estruturas similares a hifas em placas com meio de cultivo. ....	31
Figura 4 - Bactérias do tipo bacilos vistas em microscópio, imagem capturada com projeção em tela de notebook. ....	32
Figura 5 - Halos de amilolise no entorno das colônias do microrganismo que degradou o amido presente na placa. ....	33
Figura 6 - Imagem ilustrativa de tubos Falcon contendo a mistura de reação, solução de amido + solução de Lugol, em concentrações decrescentes de amido (menor concentração = solução mais clara). ....	35

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Curva de crescimento do microrganismo. ....	34
Gráfico 2 - Curva Padrão do Amido - Transmitância .....	35
Gráfico 3 - Curva Padrão do Amido - Absorbância . ....	36
Gráfico 4 - Atividade enzimática pela degradação do substrato amido x tempo. ....	36
Gráfico 5 - Atividade enzimática na degradação em gramas de amido x tempo (10 minutos), comparativos de Tratamentos T1 e T2. ....	37
Gráfico 6 - Atividade enzimática na degradação em gramas de amido x tempo (10 minutos), comparativo de Tratamentos T3 e T4. ....	37
Gráfico 7 - Atividade enzimática na degradação em gramas de amido x tempo (10 minutos), comparativo de Tratamentos T1, T2, T3 e T4. ....	38

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>11</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>11</b>
2.1. OBJETIVO GERAL.....	11
2.2. OBJETIVO ESPECÍFICO.....	11
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>12</b>
3.1. ENZIMAS.....	13
3.2. AMILASES.....	17
<b>3.2.1. Efeito do íon cálcio Ca<sup>+2</sup>.....</b>	<b>20</b>
<b>3.3.1. Tipo de Cultivo de Bacillus amyloliquefaciens.....</b>	<b>22</b>
<b>3.3.2. Fatores que afetam o crescimento e atividade do Bacillus amyloliquefaciens .....</b>	<b>23</b>
<b>3.4.1. Fontes de carbono .....</b>	<b>23</b>
<b>3.4.2. Fontes de Nitrogênio.....</b>	<b>24</b>
<b>3.4.3. Potencial Hidrogeniônico .....</b>	<b>24</b>
<b>3.4.4. Temperatura.....</b>	<b>24</b>
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>25</b>
4.1. MATERIAL BIOLÓGICO .....	25
<b>4.1.1. Identificação morfológica do Material Biológico .....</b>	<b>25</b>
<b>4.3.1 Crescimento em Meio Sólido com Amido .....</b>	<b>26</b>
<b>4.3.2. Análise Qualitativa de Consumo do Substrato Amido.....</b>	<b>26</b>
<b>4.3.3. Construção da curva de crescimento do microrganismo por Densidade Ótica .....</b>	<b>26</b>
<b>4.7.1. Construção da curva de Atividade Enzimática conforme os tratamentos .....</b>	<b>28</b>
<b>4.7.2. Análise da atividade de amilases.....</b>	<b>29</b>
4.7.2.1. <i>Protocolo para a determinação da atividade da amilase.....</i>	29
4.7.2.2. <i>Reagentes, soluções, vidrarias e utensílios .....</i>	30
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>31</b>
5.1. IDENTIFICAÇÃO DO BACILO POR COLORAÇÃO DE GRAM.....	31
5.2. TESTE DE AMILOLISE.....	32
5.3. CURVA DE CRESCIMENTO.....	33
5.4. CURVA PADRÃO DE AMIDO.....	34

5.5. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DAS AMILASES SOBRE O SUBSTRATO AMIDO .....	36
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>39</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>41</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A biotecnologia é o ramo da ciência que utiliza moléculas, vírus, microrganismos, células, animais, vegetais, ou parte destes em processos tecnológicos na produção tradicional de alimentos (pães, cervejas, vinhos, vinagres, derivados fermentados do leite, iogurtes e queijos), bem como em outros bioprocessos para elaboração ou fabricação de novos produtos, tais como: antibióticos, vacinas, insulina recombinante, interferons e enzimas. Estas são biocatalisadores naturais e extremamente importantes aos processos vitais, pois desenvolvem funções indispensáveis nas reações bioquímicas do metabolismo celular. As enzimas estão presentes e ativas nos organismos vivos contendo estruturas moleculares específicas se ligarem aos substratos a fim de promover as reações e, desta forma, gerar os produtos principais e subprodutos das rotas metabólicas.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

O propósito deste Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) é apresentar o potencial biotecnológico da bactéria *Bacillus amyloliquefaciens* para produção de enzimas amilases, bem como o potencial amilolítico dessas enzimas para degradar o substrato amido. Utilizou-se da metodologia descritiva com base em publicações científicas e experimentos laboratoriais práticos para trazer uma noção melhor dos dados abordados e discutidos.

### 2.2. OBJETIVO ESPECÍFICO

- a) Aprofundar o conhecimento científico das enzimas amilolíticas;
- b) Aprofundar o conhecimento em microrganismos amilolíticos, especificamente do gênero *Bacillus*;
- c) Desenvolver Ensaio Biotecnológico com o microrganismo *Bacillus amyloliquefaciens*, visando analisar o crescimento e a atividade amilolítica das enzimas secretadas por este microrganismo;

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A biotecnologia tem sido uma ferramenta fundamental na busca de soluções e na otimização de bioprocessos relacionados às questões de saúde humana, vegetal, animal, energia e também ao próprio equilíbrio de ecossistemas do nosso planeta (COSTA JUNIOR, et al., 2020, no prelo).

Na busca incessante de soluções, a biotecnologia surge como uma ferramenta de múltiplas funções e possibilidades na melhoria e geração de novos produtos, bem como ao estabelecimento de novos mercados, uma vez que pode fazer o uso de sistemas celulares para o desenvolvimento e aperfeiçoamento de processos e de produtos de interesse econômico e social.

Dentre os sistemas celulares bem conhecidos, como as bactérias lácticas e a tradicional levedura de panificação (*Saccharomyces cerevisiae*), o reino dos fungos é de grande interesse biotecnológico, uma vez que constituem os seres vivos que mais geram produtos e processos de importância fundamental para o bem-estar da população (AZEVEDO, 2002). Abreu et al, (2015), enfatiza a importância da biotecnologia como instrumento na obtenção e produção de diversas substâncias metabólicas úteis ao ser humano e ao equilíbrio ambiental que são provenientes da manipulação dos fungos.

Beattie et al., (2011), destacam a importância da biotecnologia através da prospecção microbiana que corresponde aos métodos e ensaios utilizados na descoberta de novos compostos bioativos, a partir de fontes biológicas como fungos e bactérias, capazes de secretar substâncias de interesse nas mais diversas áreas da atividade e necessidade humana, tais como: agricultura, farmacêutica, aquicultura, biorremediação, bioenergia e nanotecnologia.

Na bioprospecção de microrganismos produtores de enzimas de interesse biotecnológico, o solo tem sido um ambiente ideal para a coleta e isolamento de microrganismos devido à grande biodiversidade bacteriana presente naturalmente, embora também se possa prospectar em outros compartimentos ambientais (SINGH, et al., 2011).

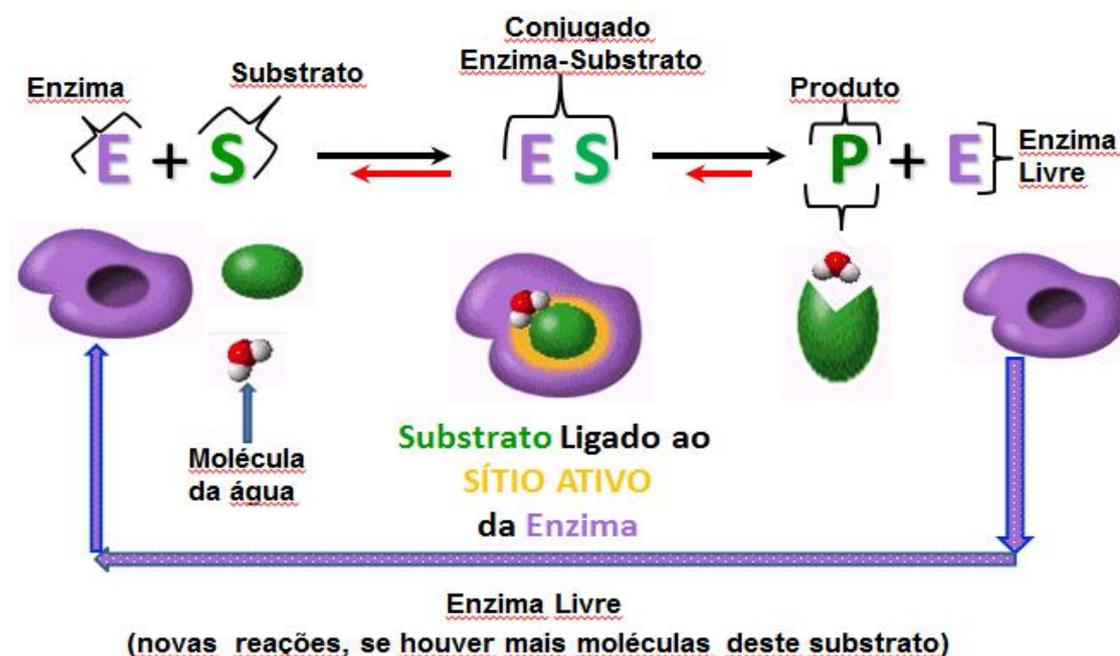
### 3.1. ENZIMAS

Enzimas são substâncias naturais de origem proteica associada a cofatores orgânicos ou inorgânicos, vitaminas e sais minerais, respectivamente, envolvidas em todos os processos bioquímicos celulares de síntese e catálise, ou seja, ora compondo moléculas simples em complexas e decompondo moléculas complexas em unidades menores (monômeros), como ocorre nas reações de síntese de polissacarídeos (amido) a partir da glicose e sua decomposição em hidratos de carbono simples (trioses) até a sua completa oxidação em  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$  com a liberação de energia (OLIVEIRA, et al., 2004).

Como macromoléculas biologicamente ativas, conforme o conceito de Holoenzima (holo é um prefixo de origem grega: inteiro, completo) as enzimas atuam com especificidade aos substratos para gerar as reações bioquímicas específicas, desde que existam condições satisfatórias e adequadas de pH, temperatura, concentração, osmolaridade, energia no ambiente de reação. Desta maneira, as enzimas catalisam as reações pela conversão dos diversos substratos em produtos de modo eficaz e rapidamente ( $10^8$  a  $10^{11}$  vezes mais rápido), uma vez que reduzem a energia de ativação no sistema catalítico. Portanto, sem a existência das enzimas, a maioria das reações bioquímicas não poderiam ocorrer, o que inviabilizaria a sustentação e a manutenção da vida (CUESTA et al., 2015).

A maioria das enzimas possuem a constituição proteica, com exceção das riboenzimas (ácidos ribonucleicos), apresentam uma região (sítio) catalítico, denominado de sítio ativo, estrutura molecular da enzima que se liga ao substrato para promover a reação. Deste modo, a ligação denominada de conjugado (enzima-substrato, figura 1) - ou complexo enzima-substrato - é dependente da estrutura tridimensional dos aminoácidos que compõem a cadeia polipeptídica da enzima, bem como pela conformação molecular da estrutura do substrato (GURUNG et al., 2013; SINGH et al., 2016).

Figura 1 - Estrutura da Enzima e substrato formando o conjugado “Enzima-Substrato”.



Fonte: Adaptado de (SLIDEPLAYER, 2016).

De modo geral, admite-se que os organismos vivos que se estabeleceram no planeta Terra ao longo dos bilhões de anos de formação do planeta são dotados de certas faculdades adaptativas, podendo se adaptar às diversas mudanças e alterações que possam ocorrer nos compartimentos ambientais, a fim de garantir a sobrevivência, reprodução e perpetuação da espécie. Assim, se houver sucesso no processo bioquímico de adaptação do organismo às variações físico-químicas, ambientais, neste poderão ocorrer alterações genotípicas, modificações fenotípicas, trocas ou transferência de funções das enzimas, acarretando em inovações biológicas em decorrência da multidiversidade enzimática gerada (CUESTA et al., 2015).

O uso das enzimas como biocatalisadores em processos industriais têm recebido destaque quando comparado aos catalisadores químicos, devido aos fatores de: segurança bioquímica, não toxicidade, redução de energia no sistema, redução do tempo de produção, redução do custo da energia na produção de produtos, viabilidade econômica e pelo fato das enzimas não poluírem o meio ambiente (WOHLGEMUTH, 2010).

Para Gopinath et al., (2017); as enzimas de origem microbiana têm sido as mais utilizadas nas indústrias devido: a facilidade de manipulação, a capacidade de produção em grandes volumes, a capacidade de liberação para o meio extracelular, ao baixo custo de produção, reduzido tempo de reação, estabilidade em condições extremas e possibilidade de expressão e produção de enzimas recombinantes em células hospedeiras.

Segundo dados do Ministério da Indústria, Comércio Exterior e Serviços do Brasil (2018), o Brasil tem sido um país essencialmente importador de enzimas as quais são utilizadas na pesquisa e na indústria nacional. No período de 2016/2017 o Brasil gastou 164,41 milhões de dólares com a importação de enzimas e obteve apenas 58,93 milhões com sua exportação. Conforme Pandey, et al. (2000), embora o Brasil possua um potencial elevado para a produção de enzimas, pois contém uma vasta biodiversidade microbiana em seu território nacional e dispõe de grandes quantidades de substratos de baixo custo para os bioprocessos - como os resíduos agrícolas – o país ainda não é autossuficiente na produção de enzimas, ou seja, 73,61 % das enzimas utilizadas são importadas e apenas 26,39% são de origem nacional.

Dentre as principais enzimas utilizadas nos bioprocessos, destacam-se as amilases pela capacidade de realizar a hidrólise do amido, polissacarídeo composto pelos polímeros de amilose e amilopectina. A amilose é um polímero linear, que contém mais de 6000 monômeros de glicose unidas por ligações  $\alpha$ -1,4-glicosídicas, enquanto a amilopectina consiste de cadeias lineares de 10-60 unidades de glicose, unidas pelas ligações  $\alpha$ -1,4, e cadeias ramificadas de 15-20 unidades de glicose, unidas por ligações  $\alpha$ -1,6 (SOUZA e MAGALHÃES, 2010).

Conforme Pandey et al (2005), as amilases podem ser divididas em quatro grupos: o primeiro são as endo-hidrolases, como a  $\alpha$ -amilase (EC 3.2.1.1./União Internacional de Bioquímica) 1,4- $\alpha$ -D-Glucan-glucano hidrolase que é responsável pela hidrólise das ligações  $\alpha$ -1,4-glicosídicas na região interna do amido, gerando a glicose e a maltose como produtos da reação. O segundo grupo são as exo-hidrolases que atuam sobre as extremidades não-redutoras da cadeia polissacarídica, as quais podem ser:  $\beta$ -amilase que hidrolisa as ligações  $\alpha$ -1,4-glicosídicas gerando dímeros de maltose;  $\alpha$ -glicosidase que hidrolisa as ligações  $\alpha$ -1,4-glicosídicas gerando unidades de glicose; amiloglicosidase (glicoamilase) que hidrolisa ligações  $\alpha$ -1,4 e  $\alpha$ -1,6 glicosídicas gerando unidades de glicose. O terceiro

grupo de amilases é composto pelas “desramificases”, enzimas responsáveis pela lise das ramificações do polissacarídeo, como as isoamilases e pululanases que hidrolisam as ligações  $\alpha$ -1,6 glicosídicas. O quarto grupo corresponde às transferases que clivam as ligações  $\alpha$ -1,4 glicosídica transferindo parte das molécula para um aceptor e formando uma nova ligação glicosídica, tais como as ciclodextrinas (SUNDARRAM e MURTHY, 2014).

As enzimas amilases podem ter várias origens, ou seja, produzidas naturalmente pelas plantas, pelos animais ou pelos microrganismos, deste último, destacando-se as enzimas microbianas que possuem maior demanda no mercado mundial, principalmente devido aos fatores de: fácil manipulação em laboratório, rápido crescimento dos organismos, alta produção em larga escala e pela maior estabilidade (GUPTA R et al., 2003).

O nível de produção das amilases microbianas é muito variável de um organismo para outro, depende da origem do microrganismo, do gênero, espécie e linhagem; sendo que as linhagens isoladas a partir de ambientes naturalmente fartos em amido produzem as maiores quantidades de enzimas. Além disso, agregam-se os fatores de pH, temperatura, fonte de carbono e de nitrogênio, os quais influenciam na produção de amilase em processos fermentativos (GOPINATH SCB et al., 2017).

No reino Monera são encontradas diversas espécies bacterianas capazes de produzir amilases de uso industrial, as quais tem sido obtidas principalmente de bactérias do gênero *Bacillus*, tais como: *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis*, *B. stearothermophilus* e *B. amyloliquefaciens*, uma vez que são capazes de produzir amilases termoestáveis (SOUZA e MAGALHÃES, 2010). Conforme a origem, as amilases também são capazes de reagir em variadas concentrações de sais, como as provenientes de linhagens de bactérias halofílicas isoladas de oceanos, tais como a *Marinobacter* sp. (KUMAR S, KHARE SK, 2015) e *Rhodothermus marinus* (SEONG Y et al., 2008).

É importante estabelecer a origem microbiana da amilase, assim como os padrões físico-químicos de pH, temperatura, fonte de carbono, fonte de nitrogênio e presença de íons (a maioria das amilases são metaloenzimas e necessitam de cofatores, como o  $\text{Ca}^{2+}$ ) a fim de otimizar os bioprocessos à produção de amilases industrialmente, tanto para aumentar a quantidade produzida como para reduzir o custo de fabricação (SIVARAM AKRISSHMAN S, et al., 2006).

Existem vários setores industriais que utilizam amilases em alguma etapa da fabricação, como na produção de glicose e frutose a partir da conversão de amido, por exemplo: na fabricação do xarope de glucose de milho. Conforme Vander Maarel et al., (2002), as amilases têm sido empregadas nas indústrias de papel, de detergentes (para potencializar a remoção de manchas), de amido (redução do peso molecular do polissacarídeo, para obter viscosidade e doçura), inclusive podendo atuar no processo de hidrólise conjuntamente com as celulases, proteases e lipases (coquetel enzimático), além de ser um composto orgânico que não polui o meio ambiente (HMIDET N et al., 2009).

As amilases também podem ser utilizadas para a produção de biocombustível, como o etanol, a partir do processo de hidrólise enzimática do substrato amido que é facilmente encontrado na natureza ou como em resíduos industriais alcançando baixo custo de produção (CHI Z et al., 2009). Na indústria de alimentos processados, as amilases também podem ser utilizadas durante as etapas de cozimento, como na produção de bolos, sucos de frutas e xarope de amido (COUTO SR, SANROMÁN MA, 2006), assim como na indústria têxtil para a remoção do amido, (DALVI P et al., 2007); ressalta-se que parte desses produtos industrializados têm sido destinados ao comércio de exportação (BRASIL MDIC, 2018).

### 3.2. AMILASES

As amilases estão entre as mais importantes enzimas industriais, apresentando grande importância biotecnológica. Apesar de serem provenientes de diversas origens, incluindo plantas, animais e micro-organismos, as enzimas microbianas geralmente atendem de maneira satisfatória a demanda industrial. Atualmente, grandes quantidades de amilases microbianas estão disponíveis comercialmente e têm aplicações no setor de alimentos, bebidas e produtos de limpeza, respondendo a 14% da demanda total de enzimas industriais (GUPTA et al., 2003; PANDEY et al., 2005). Conforme Politzer et al., (2006), os setores de alimentos e bebidas responderam por mais de 50% da demanda mundial de amilases.

As amilases constituem um dos mais importantes grupos de enzimas com aplicações em diferentes indústrias como as de alimentos, têxtil, química,

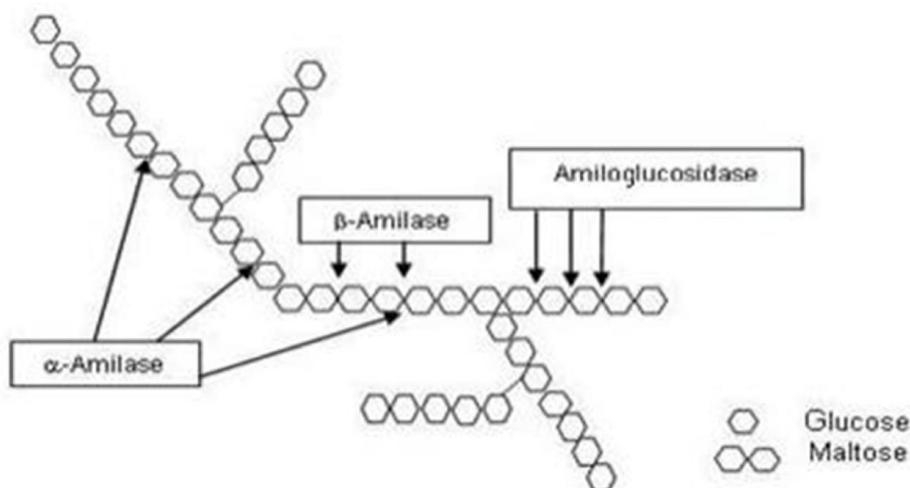
farmacêutica e de detergentes (NIELSEN e BORCHERT, 2000; GUPTA et al., 2003; SURMELY, 2003; DEMIRKAN et al., 2005; PANDEY et al., 2005; SOCCOL, 2005;).

Dentre as enzimas amilolíticas a  $\alpha$ -amilase é a mais importante, pois desempenha função fundamental na conversão do amido em produtos glicosídicos de baixo peso molecular, os quais podem ser utilizados por outras enzimas do mesmo grupo. Nos processos industriais, almeja-se que as  $\alpha$ -amilases sejam termofílicas, ou seja, possuam atividade hidrolítica em altas temperaturas, como na etapa de gelatinização: 70 - 90°C e de liquefação: 100 -110°C do amido (SIDHU et al., 1997; SARIKAYA et al., 2000; PEIXOTO et al., 2003;).

Dentre as  $\alpha$ -amilases termofílicas, industrialmente se destacam as produzidas por microrganismos termofílicos, como as bactérias do gênero *Bacillus* devido às seguintes características: estabilidade à temperatura elevada e ao pH. Das 48 espécies de *Bacillus* já descritas, 32 produzem  $\alpha$ -amilase, mas apenas poucas destas são capazes de secretar enzimas ativas em altas temperaturas. No gênero *Bacillus*, as espécies: *B. amyloliquefaciens*, *B. stearothermophilus*, *B. subtilis* e *B. licheniformis* são as quatro espécies mais utilizadas na produção industrial de  $\alpha$ -amilases (SAJEDI et al., 2005). Dentre as principais vantagens no uso das  $\alpha$ -amilases termoestáveis em processos industriais, destacam-se a redução do risco de contaminações, o aumento da taxa de difusão dos reagentes e a diminuição dos custos com refrigeração externa (LIN; CHYAU; HSU, 1998).

As enzimas amilolíticas são classificadas como endoamilases ou exoamilases, dependendo do modo de ação na cadeia polissacarídica do amido, conforme apresentado na (Figura 2).

Figura 2 - Esquema geral de hidrólise do amido por enzimas amilolíticas.



Fonte: (VAN DER MAAREL et al., 2002).

Assim, as endoamilases, como as  $\alpha$ -amilases, são capazes de hidrolisar as ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4, posicionadas nas partes internas das cadeias de amilose ou amilopectina. Seus produtos de reação são oligossacarídeos de diferentes tamanhos e dextrinas limites que apresentam a porção ramificada da cadeia de amilopectina. Já as exoamilases hidrolisam as ligações  $\alpha$ -1,4 - como no caso das  $\beta$ -amilases - ou  $\alpha$ -1,4 e  $\alpha$ -1,6 - como ocorre com a glicoamilases, mas sempre iniciando as reações hidrolíticas a partir das extremidades das cadeias de amilose ou da amilopectina.

Na produção industrial, de modo geral, as enzimas de origem microbianas são obtidas por meio de processos fermentativos, podendo ser obtidas tanto por cultivo superficial ou por cultivos submersos de microrganismos. As culturas submersas têm sido tradicionalmente utilizadas para a produção industrial de enzimas devido à facilidade no controle de parâmetros biológicos, tais como: pH, temperatura, aeração e umidade tão importantes na bioquímica dos microrganismos.

Os sistemas de cultivo superficial se mostraram promissores na produção de enzimas de origem fúngica, devido ao crescimento microbiano ocorrer em condições mais próximas ao habitat natural, bem como pela formação de estruturas filamentosas nesses microrganismos. Atualmente, um grande número de amilases microbianas está disponível comercialmente, substituindo quase completamente a hidrólise química do amido nos processos industriais (SOUZA e MAGALHÃES,

2010).

Assim, as amilases microbianas podem ser produzidas por bactérias e fungos filamentosos. Cada microrganismo apresenta um comportamento de produção enzimática relacionado às condições ótimas de crescimento. Dentre as bactérias, destacam-se algumas espécies do gênero *Bacillus*, tais como: *Bacillus subtilis*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens* e *B. licheniformis*, conhecidos como ótimos produtores industriais de  $\alpha$ -amilases e, dentre os fungos filamentosos, as espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* se destacam (SOUZA e MAGALHÃES, 2010).

A  $\alpha$ -amilase produzida por *Bacillus amyloliquefaciens* possui peso molecular aparente de 50kDa, é estável numa faixa de pH de 5,5 a 9,0 e em temperaturas elevadas de 80 – 90 °C. Sua biossíntese é controlada tanto pela indução por substratos quanto pela repressão catabólica e produzida no final da fase de crescimento exponencial e no começo da fase estacionária. Apresenta-se como enzima extracelular, mas pequenas quantidades da enzima podem permanecer ligado à membrana (MORCEL; BIEDERMANN, 1994).

### 3.2.1. Efeito do íon cálcio $Ca^{+2}$

A maioria das alfa-amilases produzidas por linhagens do gênero *Bacillus* têm se mostrado dependentes de íons cálcio para sua atividade em temperaturas elevadas. Diversos pesquisadores já relataram as necessidades desta enzima com relação ao íon cálcio; Vallee et al., (1959), descreveu que as alfa-amilases são metaloenzimas contendo íons  $Ca^{2+}$  que ativam e estabilizam a molécula, sendo que a quantidade destes íons ligados à estrutura pode variar de um a dez.

As amilases de *B. subtilis* e *B. stearothermophilus* contêm em sua estrutura quatro íons  $Ca^{+2}$ , os quais são essenciais à atividade da enzima (VIHINEN; MÄNTSÄLÄ, 1989).

Na enzima alfa-amilase de *B. amyloliquefaciens* aparecem quatro íons cálcio ligados firmemente à molécula, sendo que apenas um deles exerce maior efeito na estabilidade e conformação da proteína (HSIU et al., 1964). Normalmente, apenas um íon é suficiente para estabilizar as enzimas de *Aspergillus oryzae* e *B. subtilis* var. *amylosacchariticus* (YUTANI et al., 1969).

A enzima alfa-amilase de *B. subtilis*, por exemplo, requer quatro gramas de

cálcio por mol de enzima para sua atividade ótima (HSIU et al., 1964). Concentrações de íons cálcio superiores a 150 ppm conferem estabilidade a alfa-amilase de *B. Licheniformis* (FOGARTY, 1983).

Saha e Zeikus (1987), verificaram a necessidade 50 ppm de cálcio para a estabilização das alfa-amilases termoestáveis de *B. subtilis* e *B. licheniformis* durante a liquefação do amido na produção de xarope de maltose.

Crabb e Mitchinson (1997) utilizaram 30 ppm de  $\text{Ca}^{+2}$  no processo de liquefação do amido com a enzima alfa-amilase de *Bacillus licheniformis* na obtenção de açúcares.

Acredita-se que o papel do cálcio esteja relacionado à ligação entre os domínios da alfa-amilase, sugerindo que uma das regiões conservadas dessas enzimas seja responsável pela ligação desse íon. Estudos da estrutura das alfa-amilases no gênero *Bacillus* também indicaram a presença de alguns resíduos peptídicos envolvidos na ligação do cálcio à enzima (VIHINEN; MÄNTSÄLÄ, 1989).

Brohun e Kelly (1993), constataram que a adição de 5 mM de íons  $\text{Ca}^{2+}$  provocou efeito positivo nas atividades enzimáticas das amilases de *Pyrococcus furiosus* e *Thermococcus litoralis* em temperaturas superiores a 120 °C.

Guzmán-Maldonado e Paredes-López (1995) relataram que a quantidade de cálcio requerida para a estabilização de cada enzima varia entre 30 e 250 ppm, sendo que a estabilização total das amilases na espécie *B. subtilis* requer cerca de 150 ppm para alcançar o nível de saturação.

### 3.3. BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS

*Bacillus amyloliquefaciens* é uma bactéria gram-positivo, em forma de bastonete, móveis por flagelos peritricos e esporogênicos (WELKER; CAMPBELL, 1967). A espécie foi originalmente isolada de solos e obteve essa classificação por sua habilidade de secretar grande quantidade de amilases. Devido a sua semelhança com a espécie *Bacillus subtilis*, outra espécie grande produtora de amilases, durante muito tempo essas duas espécies foram consideradas uma só, no entanto, esses dois microrganismos são distintos genética e fisiologicamente, principalmente pelas diferenças moleculares e sorológicas nas  $\alpha$ -amilases (MILNER; MARTIN; SMITH, 1997).

Além das amilases, a espécie *Bacillus amyloliquefaciens* é capaz de produzir uma diversidade de outras enzimas, tais como: galactanase, isoamilase, mananase, xilanase, metal-protease, serina-protease, fosfatase alcalina e ribonuclease (PRIEST, 1977).

A gama de enzimas produzidas pelas espécies *Bacillus amyloliquefaciens* e por *B. licheniformis* correspondem cerca de 50% das enzimas bacterianas produzidas comercialmente. A ampla utilização do *B. amyloliquefaciens* na indústria se deve à facilidade de crescimento dessas espécies, como a faixa de temperatura que varia de 30 a 40 °C e pH 7,0 para o ótimo crescimento; ainda por apresentarem, naturalmente, níveis elevados de enzimas extracelulares e por ser considerada uma espécie não patogênica (VERMAANPERÄ, STEINBORN e HOFEMEISTER, 1991; SHIMADA et al., 1985).

### **3.3.1. Tipo de Cultivo de *Bacillus amyloliquefaciens***

A fermentação submersa tem como principal característica a utilização de um meio fermentativo líquido com nutrientes solúveis. Constitui-se em uma técnica de relativa facilidade de cultivo em grande escala, uma vez que garante a homogeneidade do meio e facilidade no controle dos parâmetros do processo, principalmente quando monitorados por sensores. A fermentação pelo método de cultura submersa é executada em fermentadores fechados, equipados com agitadores, dispositivos de aeração para a introdução de ar estéril e 12 camisas e serpentinas para o controle de temperatura. Os substratos a serem utilizados podem estar tanto na forma natural como na forma sintética, dependendo do processo que se deseje realizar, da facilidade de se obter a matéria-prima ou dos resultados que se desejam obter (SILVA, 2012).

Assim, a fermentação submersa tem sido amplamente utilizada, pois permite o controle dos parâmetros físico-químicos do processo e apresenta fácil recuperação das enzimas extracelulares, micélio ou esporos. No entanto, como desvantagens, apresenta: produtos diluídos no meio, extratos enzimáticos menos estáveis, volumes significativos de resíduos (PANDEY et al., 2000; ELLAIAH et al., 2002; SANDHYA et al., 2005).

### **3.3.2. Fatores que afetam o crescimento e atividade do *Bacillus amyloliquefaciens***

A produção de  $\alpha$ -amilase de origem microbiológica pode ocorrer de várias formas de processos, tais como nas fermentações sólidas ou submersas, cuidando-se as condições do bioprocessos, como o tipo de fermentação, a concentração de nutrientes, a velocidade de agitação/aeração, pH e temperatura, as quais podem ser modificadas a fim de se otimizar o crescimento microbiano e a produção de enzimas (MILNER, MAETIN e SMITH, 1997).

O primeiro fator de influência para a produção de enzimas de origem microbiana é a cepa, a espécie, a linhagem e a cultura final de bactérias utilizadas. Culturas de bactérias velhas geralmente necessitam de períodos longos para se adaptarem ao meio fermentativo. Observou-se também que as culturas de *B. amyloliquefaciens* oriunda de processos fermentativos contínuos resultam em uma queda na produção de  $\alpha$ -amilase (MILNER, MAETIN e SMITH, 1997).

Na produção de amilases por *B. amyloliquefaciens*, deve-se cuidar a taxa de aeração, pois a quantidade de oxigênio dissolvido no meio é um fator importante no processo fermentativo. Em escala laboratorial, a taxa de aeração necessária para manter o nível adequado de oxigênio dissolvido fica na ordem de um volume de ar por volume de meio de fermentação por minuto; outros estudos demonstraram que a aeração do sistema pode ser interrompida na fase estacionária, controlando-se o pH, sem que ocorra perdas significativas no rendimento em enzima (MILNER, MAETIN e SMITH, 1997).

## **3.4. ASPECTOS GERAIS NA PRODUÇÃO DE AMILASES DO GÊNERO BACILLUS**

### **3.4.1. Fontes de carbono**

Em relação à fonte de carbono, a produção de  $\alpha$ -amilase pela bactéria geralmente é induzida pela presença do substrato amido ou de seu produto hidrolítico, a maltose. Vários estudos demonstram que o amido e a maltose funcionam como indutores da atividade de  $\alpha$ -amilase. Por outro lado, a presença de açúcares, como xilose e frutose, age como repressores da síntese da enzima, reduzindo a sua produção (GUPTA et al., 2003).

### 3.4.2. Fontes de Nitrogênio

A disponibilidade de nitrogênio é fundamental no meio de cultivo para o crescimento microbiano das espécies de *Bacillus* e, conseqüentemente, na produção de enzimas. Em meios de cultura sintéticos, a adição de nitrogênio orgânico, como extrato de carne e peptona, tem sido preferida para produção de amilases bacterianas. Entretanto, várias fontes de nitrogênio inorgânico têm sido relatadas para melhor produção de amilase por fungos, como por exemplo, sulfato de amônio, nitrato de amônio (GUPTA et al., 2003).

### 3.4.3. Potencial Hidrogeniônico

O pH é outro fator de forte influência na produção de amilases. A maioria das linhagens de *Bacillus* usadas comercialmente na produção de  $\alpha$ -amilases bacterianas, por fermentação submersa, apresentam ótimo crescimento na faixa de pH entre 6 e 7, podendo variar de acordo com o gênero e a espécie da bactéria produtora (GUPTA et al., 2003).

### 3.4.4. Temperatura

A temperatura também é um dos fatores mais importantes na produção de enzimas, pois atua no sistema ambiental de crescimento do microrganismo de maneira decisiva nas funções das biomoléculas, na estabilidade e manutenção das estruturas biológicas. Assim, as Amilases bacterianas de *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, *B. licheniformis* e *B. stearothermophilus* são produzidas industrialmente em temperaturas que variam de 37 a 60 graus Celsius (SIVARAMAKRISHNAN et al., 2006).

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. MATERIAL BIOLÓGICO

Os experimentos foram desenvolvidos no laboratório de microbiologia, bloco 7 da Universidade Federal de Santa Maria, *campus* de Frederico Westphalen (UFSM – FW). microrganismo foi isolado a partir do rizoma da planta *Edychiium choronarium*, coletada próximo à mata de um condomínio no Município de Frederico Westphalen, sendo inoculado em placas de Petri contendo o meio Muller Hinton Ágar e crescido por 24 horas em Incubadora B.O.D. SL 200.

#### 4.1.1. Identificação morfológica do Material Biológico

O microrganismo foi identificado através da visualização da sua estrutura morfológica, em placa de Petri, meio sólido Muller Hinton Ágar, com o auxílio do equipamento Estereomicroscópio Binocular OPTON TIM - 30.

### 4.2. COLORAÇÃO DE GRAM

A técnica de coloração de GRAM foi utilizada para caracterizar o microrganismo, sendo o mesmo observado posteriormente em Microscópio Biológico Trinocular Planacromático Digilab.

Procedimento: Em uma lâmina de microscópio se fez o esfregaço de uma colônia do material biológico crescido 24 horas em meio Tryptic Soy Broth (TSB), seguido de um processo simples de fixação do material biológico com o calor proveniente da chama de lamparina, posteriormente, o material é coberto com a solução de cristal violeta padrão 2% por 1 minuto; retirando-se o excesso e adicionando-se a solução de lugol 5% por 1 minuto; lavando-se em seguida com solução alcoólica com álcool (96%) por 5 segundos; lava-se com água corrente de baixa pressão e adiciona-se a solução de safranina padrão 2,5% por um minuto; promovendo-se nova lavagem com água corrente de baixa pressão, cobre-se o material com a lamínula para realizar a identificação do microrganismo, forma e arranjo pela observação microscópica.

### 4.3. CRESCIMENTO DO MICRORGANISMO EM MEIO LÍQUIDO

O microrganismo obtido das placas de isolamento foi inoculado em meio Tryptic Soy Broth com pH 7,3 em Erlenmayer de 250 mL. O Inóculo foi crescido por 24 horas em Incubadora Shaker Luca 220 – Lucadema, regulada em 140 rpm, com temperatura constante de 37 °C.

#### 4.3.1 Crescimento em Meio Sólido com Amido

O microrganismo foi inoculado em placas de Petri contendo o meio de crescimento Tryptic Soy Ágar adicionado de amido (1%) durante 24 horas em estufa incubadora com temperatura de 37 °C.

#### 4.3.2. Análise Qualitativa de Consumo do Substrato Amido

Inóculos do microrganismo foram crescidos em placas de Petri contendo o meio Tryptic Soy Ágar adicionado de amido (1%) durante 24 horas em estufa incubadora com temperatura de 37 °C. Após o período de crescimento foi possível verificar o consumo do substrato amido pelo microrganismo devido a observação da formação de halos de amilólise ao redor das colônias quando a placa de Petri era submetida ao vapor de iodo, caracterizando a atividade amilolítica da bactéria.

#### 4.3.3. Construção da curva de crescimento do microrganismo por Densidade Óptica

Inóculos do microrganismo foram crescidos em meio líquido contendo Tryptic Soy Broth, em pH 7,3, em Erlenmeyers de 500 mL, em Incubadora Shaker Luca 220 – Lucadema, regulada em 140 rpm, com temperatura constante de 37 °C. Os frascos de Erlenmayer foram postos na incubadora pelos primeiros 30 minutos para aguardar a fase lag de crescimento. Depois desse período, iniciou-se a coleta de 1mL de amostras do meio a cada 10 minutos para medir a absorbância em comprimento de onda de 620 nm no aparelho Espectrofotômetro Nanocolor VIS MN Since 1911. O teste durou 330 minutos até a estabilização dos valores de Densidade Óptica (DO).

#### 4.4. CONSTRUÇÃO DA CURVA PADRÃO DO AMIDO

A curva padrão de amido foi construída através da técnica de espectrofotometria pela reação com o iodo em tubos Falcon (tubo de reação). No todo de reação, utilizaram-se: água destilada autoclavada, volumes de solução de amido (1%) e lugol. Com o auxílio de uma micropipeta de 1  $\mu$ L de volume regulável e uma micropipeta de 10  $\mu$ L de volume regulável. Desta forma, cada tubo Falcon recebeu os volumes das soluções de amido e lugo, completando-se com água destilada o volume final de reação de 10 mL. As concentrações de amido em 11 tubos Falcon foram crescentes, de 0 mL até 1 mL (solução a 1%). Além disso, em cada tubo foi acrescentado a quantidade de 1  $\mu$ l de solução padrão de Lugol para reagir com o substrato amido e corar a solução, possibilitando a leitura de transmitância no espectrofotômetro (Nanocolor Visível – Macherey Nagel). A leitura de transmitância foi realizada em cubetas de vidro (Glass), pela coleta de amostras de 2 mL de volume de cada tubo Falcon em  $\lambda$  620 nm.

#### 4.5. CRESCIMENTO DE MICRORGANISMO EM MEIO INDUTOR PARA PRODUÇÃO DE ENZIMAS AMILOLÍTICAS

Inóculos do microrganismo amilolítico foram crescidos em meio líquido com solução de amido (2%) como indutor da produção de enzimas amilases. A solução foi preparada pesando-se 2,0 g de amido de milho Yoki em 98 g de água e adicionado, posteriormente, ao meio líquido 0,2 g de Tryptic Soy Broth. Utilizou-se a Balança analítica Bioscale para pesar os solutos, os quais foram dissolvidos em água destilada (100mL de volume final). O meio foi esterilizado em autoclave Digitale AV 30, a 121 °C por 15 minutos. O meio de crescimento final apresentou pH de 7,3 medido em aparelho pHmêtro Akso. Os inóculos do microrganismo amilolítico foram obtidos de colônias estoques armazenadas em refrigeração a 4 °C. A inoculação do microrganismo em meio Tryptic Soy Broth + amido ocorreu em Câmara de fluxo laminar Lutech. O crescimento do microrganismo ocorreu em Incubadora Shaker Luca 220 – Lucadema, regulada em 140 rpm, em temperatura de 37 °C por 24 h.

#### 4.6. TRANSFERÊNCIA DO INOCULADO, CENTRIFUGAÇÃO E SEPARAÇÃO DO SOBRENADANTE DAS CÉLULAS

Após 24 horas de crescimento do microrganismo em meio Tryptic Soy Broth + amido em condições padronizadas, o meio líquido foi parcelado em volumes de 10 mL e acondicionados em 10 tubos Falcon estéreis. Estes, seguiram para centrifugação em aparelho centrífuga Daiki Spinplus em condições de 5.000 rpm por 15 minutos. Do material centrifugado, retirou-se o sobrenadante cuidadosamente, repassando-os para tubos de ensaio estéreis e fechados. Metade do material de sobrenadante centrifugado foi filtrado em membrana milipore 0,22 µm. O sedimento da centrifugação que ficou aderido no fundo dos tubos Falcon, foi lavado duas vezes com água destilada, refazendo o processo de centrifugação, descartando-se o sobrenadante e ressuspendendo-se as células com solução salina 0,3% (autoclavada), este novo sedimento formado foi levado à estufa (45 °C/ 2 horas), obtendo-se material celular seco para estocagem na forma de pó.

#### 4.7. ANÁLISE DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA (AE)

##### 4.7.1. Construção da curva de Atividade Enzimática conforme os tratamentos

###### Tratamentos:

- T1 (100 µL Enzima centrifugada);
- T2 (10 µL Enzima centrifugada);
- T3 (10 µL Enzima, filtrada em membrana de 0,22 µm - Milipore)
- T4 (100 µL Enzima, filtrada em membrana de 0,22 µm - Milipore)

\*Padrão: água destilada, lugol, solução de amido (1%p/v)

Equipamento utilizado para registro de absorvância/Transmitância: Aparelho Nanocolor Visível – Macherey Nagel,  $\lambda = 620 \text{ nm}$

#### 4.7.2. Análise da atividade de amilases

A solução enzimática estoque para as análises foi obtida do sobrenadante das culturas de *Bacillus* sp., por centrifugação a 5.000 rpm/15 min, o qual foi acondicionado em tubos de ensaio com tampa e armazenados sob refrigeração a 4 °C.

##### 4.7.2.1. Protocolo para a determinação da atividade da amilase

- a) Preparar uma solução de amido 1% em água, autoclavada 121 °C/15min;
- b) Repassar 1 mL da solução de amido para um Tubo de Ensaio (Tubo de Reação), Testemunha, + 11 Tubos de Reação. Cada Tubo de Reação (TR) foi identificado com o seu respectivo tempo (0 minutos, 1 minuto; 2 minutos; até 60 minutos);
- c) Os tubos de ensaio seguem para o banho-maria a 40 °C/ 5 minutos;
- d) Acrescentou-se aos tubos de ensaio (Tubo de Reação) 1 mL de solução lugol;
- e) Acrescentou-se aos tubos de ensaio (TR) 9 mL de água destilada.
- f) Homogeneizou-se a mistura de solução dos tubos de ensaio (TR) em agitador Vortex;
- g) Fazer a leitura de Absorbância de um dos TR como \*Branco (Testemunha, mistura de solução sem enzima) em espectrofotômetro em  $\lambda$  620 nm. Registrar;
- h) No tempo zero, acrescentar em cada um dos Tubos de Reação 0,1 mL (100  $\mu$ L/ micropipeta) da solução de enzima (sobrenante, homogeneizado no vortex). Homogeneizar a mistura de reação em agitador Vortex;
- i) Coletar 1 mL da solução do Tubo de Reação específico a cada 1 minuto, sendo a primeira coleta no “tempo 0” e depois nos respectivos tempos para cada TR, até o final de 60 minutos. \* (Sempre passar os TR no agitador Vortex antes de coletar a alíquota para a leitura de absorbância/transmitância);
- j) Fazer a leitura de Absorbância/Transmitância e Registrar os dados para a construção da Curva de Atividade Enzimática (AE). Repetir as análises (3x).

A análise da atividade da amilase (alíquotas de sobrenadantes do meio de crescimento microbiano) foi realizada pela reação de hidrólise do amido em tubos

Falcon ao longo do tempo e aferida em aparelho de espectrofotometria. A preparação das amostras foi feita em tubos Falcon contendo: 9 ml de água destilada autoclavada; 1 ml de solução de amido 1%; 1 µl de lugol; 100 µl de sobrenadante, onde cada tubo Falcon foi submetido a diferentes tratamentos de concentrações de enzima, sendo que a mistura de reação é agitada em aparelho Vortex QL – 901 BIOMIXER. A leitura da transmitância em cada tempo, em comprimento de onda de 620 µm, é obtida pela retirada da alíquota de 2 ml da solução de reação transferida em cubetas de vidro. O processo é repetido em vários períodos de tempo até o valor de transmitância ficar constante, ou seja, demonstrando que a reação de hidrólise tenha atingido sua velocidade máxima, finalizando a reação.

\* Definição da Unidade de Atividade Amilolítica (UA.mL<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>):

Definida como a quantidade de enzima que consome 1 µmol (ou miligramas) de substrato (amido) por mL de amostra por minuto, sob condições padrões.

#### *4.7.2.2. Reagentes, soluções, vidrarias e utensílios*

- Água destilada;
- Álcool 70%;
- Amido de milho Yoki 200 g;
- Autoclave Digitale AV 30;
- Balança analítica Bioscale;
- BRAIN-HEART INFUSION AGAR 500g acumedia LAB Neogen Culture Media;
- Béker (volumetrias – 25 ml, 50 ml, 100 ml, 250 ml, 500 ml e 1000 ml);
- Câmara de fluxo laminar Lutech;
- Centrífuga Daiki Spinplus;
- Cubeta (volumetrias – 10 ml e 50 ml);
- Iodo em grânulos;
- Incubadora Shaker Luca 220 – Lucadema;
- Incubadora B.O.D. SL 200;
- Isofilme;
- Erlenmayer (volumetrias – 250 ml e 500 ml);
- Espectrofotômetro Nanocolor Visível – Macherey Nagel;

- Estereomicroscópio Binocular OPTON TIM - 30;
- Micropipetas (volumetrias – 0.5-10 µl, 2-20 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl);
- Microscópio Biológico Trinocular Planacromático, da marca Digilab;
- pHmêtro Akso;
- Pipetas (volumetria – 1 mL);
- Solução Lugol 1%;
- Solução para coloração de GRAM (cristal violeta 2%; Safranina 2,5%; lugol 5%);
- Tubo de ensaio (volumetria 10 ml);
- Tubo Falcon (volumetria – 50 ml);
- TRYPTIC SOY BROTH 500 g acumedia LAB Neogen Culture Media
- Vortex QL – 901 BIOMIXER

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. IDENTIFICAÇÃO DO BACILO POR COLORAÇÃO DE GRAM

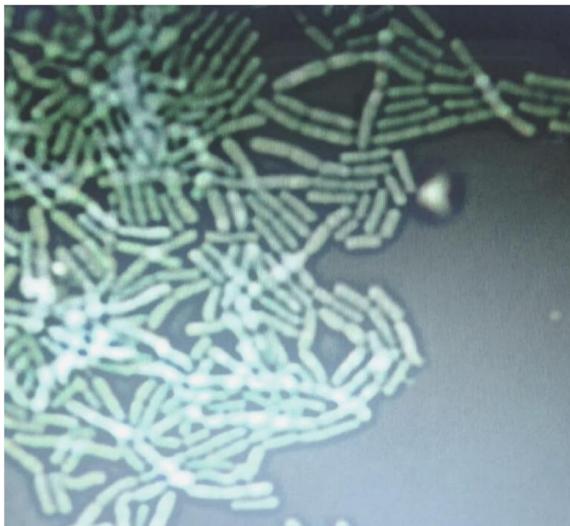
A primeira identificação do microrganismo - coletado das raízes da planta *Edyichium choronarium* – foi realizada por observação microscópica direta em Lupa OPTON TIM - 30, observando-se a formação de estruturas similares a hifas (Figura 3). Posteriormente, realizou-se a técnica de coloração de GRAM, que resultou em positiva (+), seguida da observação microscópica, identificando-se bactérias na forma de bacilos e com arranjo de estreptobacilos, retratados na imagem da figura 4.

Figura 3 - Visualização de estruturas similares a hifas em placas com meio de cultivo.



Fonte: Autor (2020).

Figura 4 - Bactérias do tipo bacilos vistas em microscópio, imagem capturada com projeção em tela de notebook.



Fonte: Autor (2020).

A visualização de estruturas similares a hifas, pela Lupa OPTON TIM - 30 e a visualização de bactérias na forma de bacilos, juntamente com o arranjo estreptobacilos, aliada pela definição da coloração de Gram (+), definiu que se tratava da bactéria do gênero *Bacillus* (*Bacillus* sp.).

## 5.2 TESTE DE AMILOLISE

Realizou-se o teste de amilolise da bactéria *Bacillus* sp. em placa de Petri cotendo o meio de crescimento acrescido de amido, a fim de poder verificar a formação de halos de amilolise ao redor das colônias da bactéria, uma vez que a degradação do amido seria dada em função da liberação de enzimas no meio por parte do microrganismo avaliado. O resultado obtido foi positivo, conforme está apresentado na figura 5.

Figura 5 - Halos de amilólise no entorno das colônias do microrganismo que degradou o amido presente na placa.



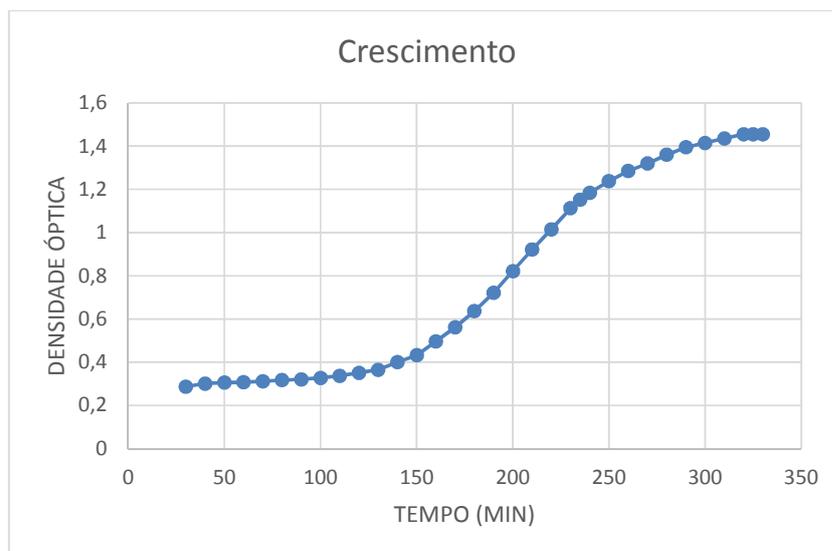
Fonte: Autor, 2020.

Com o apoio de referências bibliográficas, pelas observações morfológicas microscópicas, de GRAM e pela testagem positiva no teste de amilólise, reforçou que se tratava da espécie de bactéria "*Bacillus amyloliquefaciens*".

### 5.3. CURVA DE CRESCIMENTO

A curva de crescimento – Densidade Óptica (DO) x Tempo (minutos) - foi feita através de leituras de absorbância do meio de cultivo do microrganismo em intervalos de tempo de 10 minutos, durando 330 minutos. O gráfico 1 apresenta o comportamento detalhado de cada uma das fases de crescimento do microrganismo: Lag (adaptação); Log (crescimento exponencial) e estacionária.

Gráfico 1 - Curva de crescimento do microrganismo.



Fonte: Autor (2020).

Destaca-se que os fatores de crescimento não foram otimizados nessa análise, o que comprovou o longo período para a fase de adaptação do microrganismo, alcançando os primeiros 120 minutos do processo para, só assim, iniciar a fase de crescimento logarítmica (fase de aceleração, crescimento logarítmico específico e desaceleração em torno de 250 minutos), adentrando na fase estacionária do crescimento em torno de 300 minutos.

#### 5.4. CURVA PADRÃO DE AMIDO

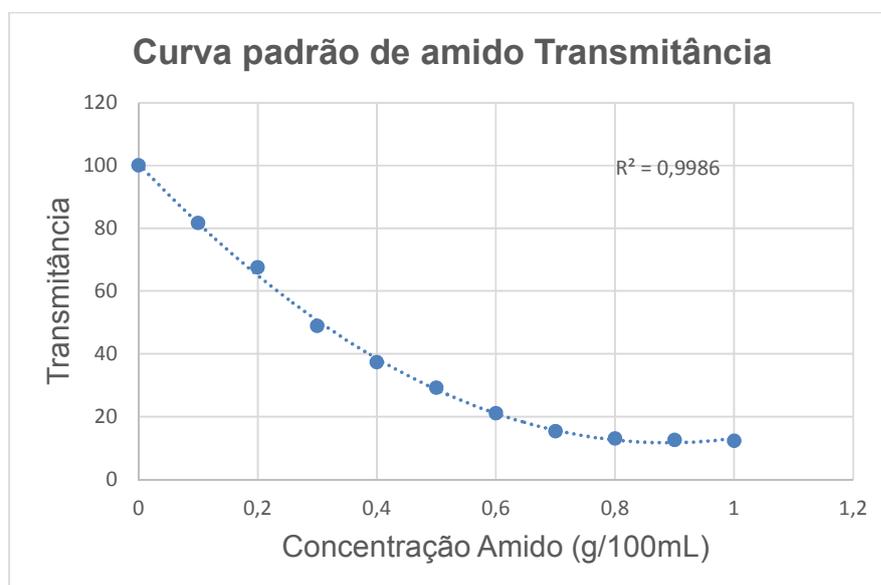
A curva padrão do amido (gráficos 2 e 3) foi obtida através das leituras de transmitância e absorbância de diferentes concentrações da solução de amido (1%p/v), a qual serviu como parâmetro básico para analisar o grau de degradação de amido nas reações enzimáticas (AE). A imagem dos tubos de reação (Tubos Falcon) contendo a solução reativa para a leitura espectrofotométrica na construção da curva padrão de amido está apresentada na figura 6.

Figura 6 - Imagem ilustrativa de tubos Falcon contendo a mistura de reação, solução de amido + solução de Lugol, em concentrações decrescentes de amido (menor concentração = solução mais clara).



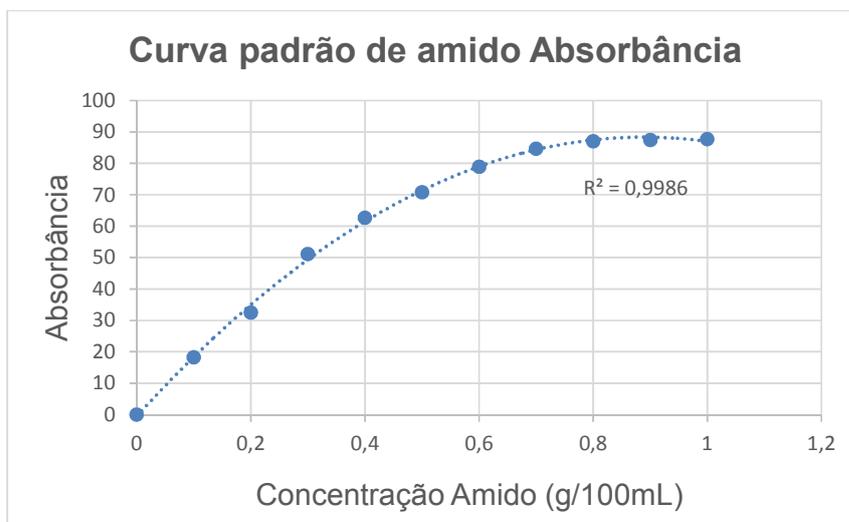
Fonte: Autor (2020).

Gráfico 2 - Curva Padrão do Amido - Transmitância.



Fonte: Autor (2020).

Gráfico 3 - Curva Padrão do Amido - Absorbância.

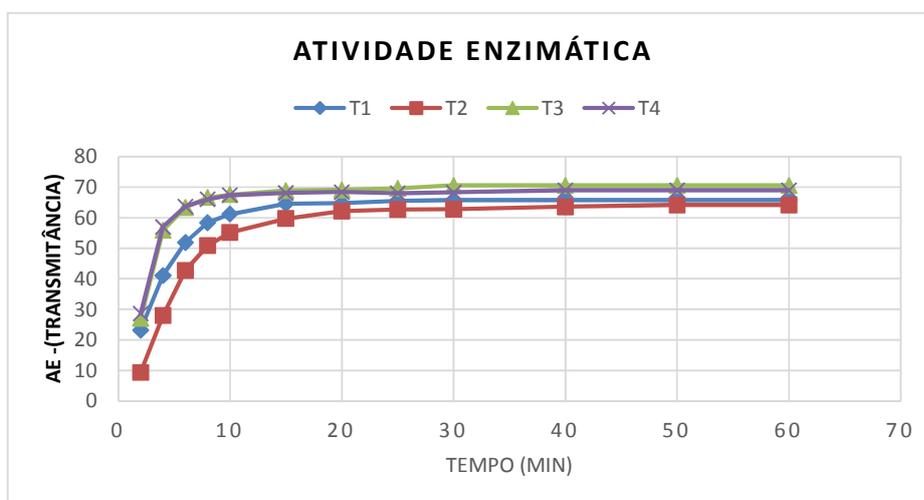


Fonte: Autor (2020).

#### 5.5. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DAS AMILASES SOBRE O SUBSTRATO AMIDO

O resultado da Atividade Enzimática (AE), das amilases sintetizadas pelo micorganismo *Bacillus ayiloliquefaciens*, nos diferentes tratamentos do sobrenadante (T1, T2, T3, T4), comprovaram a eficácia de ação desta enzima microbiana sobre o substrato amido, conforme apresentado nos gráficos 4, 5, 6 e 7 (Degradação do Amido ao longo do tempo), pelas leituras de transmitância e absorbância.

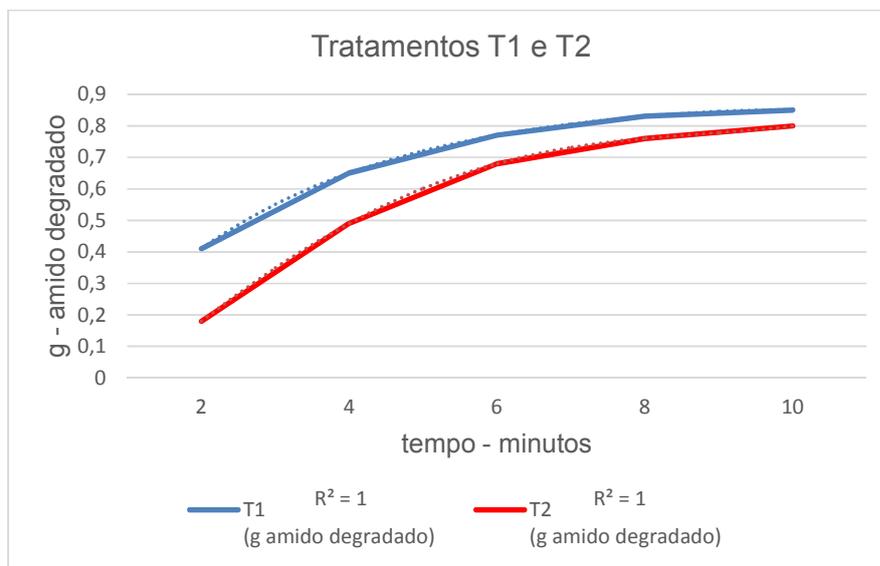
Gráfico 4 - Atividade enzimática pela degradação do substrato amido x tempo.



Fonte: Autor (2020).

Tratamentos: T1 (100  $\mu$ L Enzima centrifugada); T2 (10  $\mu$ L Enzima centrifugada); T3 (10  $\mu$ L Enzima, filtrada em membrana de 0,22  $\mu$ m - Milipore), T4 (100  $\mu$ L Enzima, filtrada em membrana de 0,22  $\mu$ m).

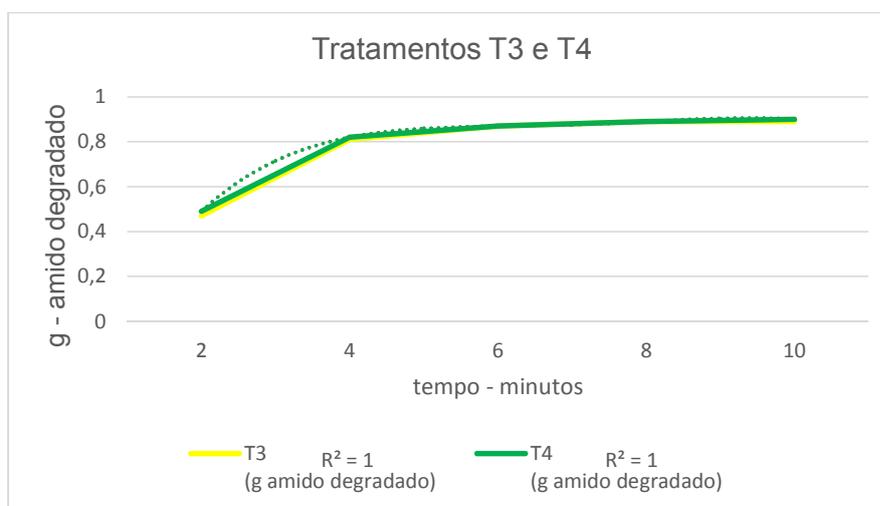
Gráfico 5 - Atividade enzimática na degradação em gramas de amido x tempo (10 minutos), comparativos de Tratamentos T1 e T2.



Fonte: Autor (2020).

Tratamentos: T1 (100  $\mu$ L Enzima centrifugada); T2 (10  $\mu$ L Enzima centrifugada).

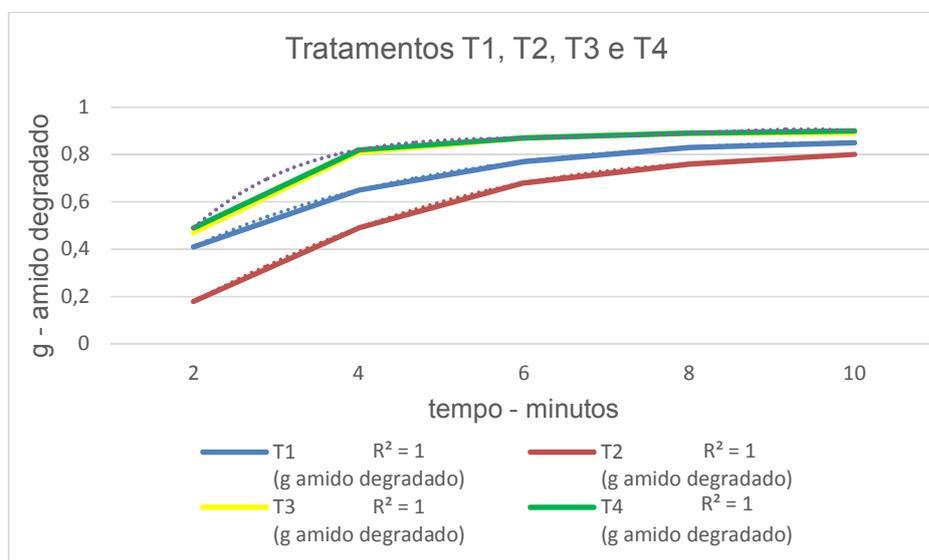
Gráfico 6 - Atividade enzimática na degradação em gramas de amido x tempo (10 minutos), comparativo de Tratamentos T3 e T4.



Fonte: Autor (2020).

Tratamentos: T3 (10  $\mu$ L Enzima, filtrada em membrana de 0,22  $\mu$ m - Milipore), T4 (100  $\mu$ L Enzima, filtrada em membrana de 0,22  $\mu$ m).

Gráfico 7 - Atividade enzimática na degradação em gramas de amido x tempo (10 minutos), comparativo de Tratamentos T1, T2, T3 e T4.



Fonte: Autor (2020).

Tratamentos: T1 (100  $\mu$ L Enzima centrifugada); T2 (10  $\mu$ L Enzima centrifugada); T3 (10  $\mu$ L Enzima, filtrada em membrana de 0,22  $\mu$ m - Milipore), T4 (100  $\mu$ L Enzima, filtrada em membrana de 0,22  $\mu$ m).

A partir do gráfico 7, que apresenta as curvas da Atividade Enzimática dos quatro tratamentos analisados, pode-se avaliar que a velocidade máxima de reação ocorreu em torno de 10 minutos para todos os tratamentos.

Com relação às atividades enzimáticas iniciais entre os tratamentos “centrifugado e filtrado” dos sobrenadantes, notou-se que a filtração em membrana milipore de 0,22  $\mu$ m (curva presente no gráfico 6) é mais eficiente para separar as enzimas de outros resíduos presentes no sobrenadante, os quais aparentaram interferir levemente no processo da reação. Entre as concentrações de cada tratamento, observou-se que não houve diferenças significativas entre os Tratamentos 3 e 4 (alíquotas de sobrenadantes submetidos à filtração em membrana milipore 0,22  $\mu$ m, curvas dispostas no gráfico 6). Contudo, entre os Tratamentos 1 e 2, segundo as curvas descritas no gráfico 5 (concentrações de

sobrenadantes apenas submetidos à centrifugação), observou-se uma demora no tempo de reação inicial do tratamento 2 em relação ao 1, uma vez que o tratamento 2 continha uma alíquota 10 vezes menor de sobrenadante.

Destaca-se que o Tratamento 3 (T3) apresentou maior eficiência no processo de hidrólise do amido nas condições testadas em relação aos demais tratamentos, resultando em maior velocidade de reação inicial (levando em conta que possui um número 10 vezes menor de presença de enzimas, reduzindo também os custos) e numa degradação aproximada de 92% do amido presente em solução no tempo de 30 minutos.

De modo geral, conclui-se que o processo de filtração de sobrenadantes de culturas de *Bacillus* sp, em membranas de milipore 0,22 µm (presentes no T3 e T4) foi mais eficiente para a ação de amilases do que apenas o processo de centrifugação.

Relacionando-se os resultados obtidos com as demandas industriais na área de sacarificação do amido, observou-se que este microrganismo "*Bacillus amyloliquefaciens*" possui elevado potencial para a síntese de enzimas amilolíticas para os processos industriais, havendo a necessidade do desenvolvimento de novos estudos a fim de otimizar os parâmetros de crescimento microbiano e de produção de amilases a partir da bancada laboratorial aos processos de *scale-up*, tais como: otimização do crescimento do microrganismo (meios de cultivo, pH, temperaturas, rpm, tempo, fatores de crescimento, indutores de amilases), assim como o uso de tecnologias de down stream das enzimas biossintetizadas.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A biotecnologia é uma ciência de excelência prática para a prospecção de microrganismos com faculdades em gerar produtos de interesses científicos e industriais nas mais diversas áreas de interesse da humanidade, tais como: alimentos, surfactantes, bebidas, têxteis, fármacos. Há muito tempo os microrganismos têm sido utilizados como biofábricas, precursores de produtos industriais. A atividade destes microrganismos pode ser potencializada através de estudos científicos e laboratoriais que visem a otimização de bioprocessos, através de fatores que viabilizem o melhor crescimento microbiano, assim como a melhor atividade das enzimas para reagirem com os substratos específicos.

Neste sentido, é indispensável que se façam escolhas baseadas em dados científicos muito bem embasados na teoria e experimentação a fim de otimizar os bioprocessos. Além disso, a otimização dos bioprocessos viabiliza a redução de custos de produção, reduz a possibilidade de impactos ambientais, reduz desperdícios ou custos desnecessários que possam prejudicar o quadro social dos consumidores no planeta. A importância de processos otimizados, bem sucedidos, no setor produtivo é considerado como ponto chave para o desenvolvimento sustentável.

Destaca-se que os resultados obtidos nesta pesquisa básica de biotecnologia foram muito profícuos. Nesse contexto, pretende-se desenvolver, em nível de Pós-graduação, de futuros trabalhos que visem a otimização e padronização do bioprocessos, tais como: avaliação da atividade pela variação da concentração de substrato; adição de íons no meio de crescimento e atividade enzimática; purificação do sobrenadante com diferentes elementos filtrantes; meio específico para crescimento, aumento da expressão gênica para a indução de enzimas amilolíticas; temperatura; pH; rpm; testagem com novos meios de crescimento para melhorar a adaptação do microrganismo direcionando sua expressão gênica à síntese de amilases, os quais poderão gerar resultados mais otimizados.

Portanto, constatou-se que a bactéria *Bacillus amyloliquefaciens* é um microrganismo capaz de viabilizar a produção de amilases, uma vez que possui capacidade adaptativa aos meios de cultivo usuais de laboratório, sendo de fácil manipulação. Este microrganismo também apresentou rápida produção de enzimas amilolíticas que foram eficientes na degradação do substrato amido. Neste sentido, conforme pode-se comprovar pelos resultados obtidos, avaliou-se que as enzimas amilases produzidas pelas bactérias da espécie *Bacillus amyloliquefaciens* apresentaram um percentual de hidrólise do substrato amido superior à 90% .

Os estudos biotecnológicos sobre esta bactéria, tendem a se tornar cada vez mais frequentes, considerando a necessidade mundial de novas tecnologias aplicadas às enzimas amilolíticas, assim como outros produtos do metabolismo desse microrganismo, os quais possam contribuir na melhoria de processos e na resolução de problemas que possam afetar o meio ambiente e, conseqüentemente, a própria humanidade.

## REFERÊNCIAS

- ABREU, J. A. S.; ROVIDA, A. F. S.; PAMPHILE, J. A. Fungos de Interesse: Aplicações Biotecnológicas. Universidade Estadual de Maringá – UEM. **Revista UNINGÁ Review** - Vol.21,nº 1, pp.55-59 (Jan – Mar 2015).
- AZEVEDO, N.; FERREIRA, L.O.; KROPF, S.P.; HAMILTON, W.S. Pesquisa Científica e Inovação Tecnológica: A Via Brasileira da Biotecnologia. **Dados, Revista de Ciências Sociais**, Rio de Janeiro, vol.45, no. 1, p.139-176, 2002, ISSN 0011-5258.
- BEATTIE A.J.; HAY M.; MAGNUSSON B.; de NYS, R.; SMEATHERS, J.; VINCENT, J.F.V. **Ecology and bioprospecting**. *Austral Ecol.* May 1; v. 36 n.3. 2011, p. 341-356.
- BRASIL, MDIC - **Ministério da Indústria, Comércio Exterior e Serviços**. 2018. Disponível em: <<http://www.mdic.gov.br/comercioexterior/estatisticasdecomercioexterior/comex-vis/frame-ppi?ppi=3161>>. Acesso em: 12 de maio de 2020.
- BROHUN, S.H.; KELLY, R.M.; Characterization of amylolytic enzymes, having both -1,4 and -1,6 hydrolytic activity from the thermophilic Archea *Pyrococcus furiosus* and *Thermococcus litoralis*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 59, n. 8, p. 2614-2621, 1993.
- CHI, Z.; CHI, Z.; LIU, G.; WANG, F.; JU, L.; ZHANG, T. *Saccharomycopsis fibuligera* and its applications in biotechnology. **Biotechnol Adv.** Jul-Aug; v.27, n.4. 2009, p. 423-431.
- COSTA JÚNIOR, J. A.; VICENTE, E. J.; GRAEL MARASCA, E. T.; TORRES, F. A.G.; PEPE DE MORAES, L.M.; BONES, U. A. (Prelo). *Biotechnology: use of available carbon sources on the planet to generate alternatives energy*. John Wiley & Sons, *Biotechnology and Bioengineering*.
- COUTO, S.R.; SANRÓMAN, M.A. Application of solid-state fermentation to food industry - A review. **J Food Eng.** Oct; v. 76, n. 3, 2006, p. 291-302.
- CRABB, W.D.; MITCHINSON, C. Enzymes involved in the processing of starch to sugar. **TIBTECH**, v. 15, 1997, p. 349–352.
- CUESTA, S.M.; RAHMAN S.A.; FURNHAM N.; THORNTON J.M. The Classification and Evolution of Enzyme Function. **Biophys J.** Sep v. 109, 2015, p. 1082–1086.
- DALVI, P.; ANTHAPPAN, P.; DARADE, N.; KANOONGO, N.; ADIVAREKAR, R. Amylase and pectinase from single source for simultaneous desizing and scouring. **Indian J Fibre Text Res.** Dec, v. 32, n.4, 2007, p. 459-465.
- DEMIRKAN, E. S. et al.  $\alpha$ -Amylase from *B. amyloliquefaciens*: purification, characterization, raw starch degradation and expression in *E. coli*. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 8, p. 2629-2636, 2005.

ELLIAIAH, P.; ADINARAYANA, K.; BHAVANI, Y.; PADMAJA, P.; SRINIVASULU, B. Optimization of process parameters for glucoamylase production under solid state fermentation by a newly isolated *Aspergillus* species. **Process Biochemistry**, v. 38, 2002, p. 615- 620.

FOGARTY, W. M.; BENSON, C. P. Purification and properties of a thermophilic amyloglucosidase from *Aspergillus niger*. **Journal Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 18, 1983, p. 271–275.

GOPINATH, S.C.B.; ANBU, P.; ARSHAD, M.K.M.; LAKSHMIPRIYA T., VOON C.H.; HASHIM, U.; CHINNI, S.V. Biotechnological Processes in Microbial Amylase Production. **BioMed Res. Inter.** Feb, 2017.

GUPTA, R. et al. **Microbial  $\alpha$ -amylases**: a biotechnological perspective. *Process Biochemistry*, v. 38, n. 11, p. 1599-1616, 2003.

GURUNG, N.; RAY, S.; BOSE, S.; RAI V.A. **Broader View: Microbial Enzymes and Their Relevance in Industries, Medicine, and Beyond.** *Biomed Res Int.* 2013; 2013: 18 pages.

GUZMÁN-MALDONADO, H.; PAREDES-LÓPEZ, O. Amylolytic enzymes and products derived from starch: A review. **Critical Reviews Food Science Nutrition**, v. 35, 1995, p. 373-403.

HMIDET, N., ALI N.E-H.; HADDAR, A.; KANOUN, S.; ALYA, S-K.; NASRI, M. Alkaline proteases and thermostable  $\alpha$ -amylase co-produced by *Bacillus licheniformis* NH1: Characterization and potential application as detergent additive. **Biochem. Eng J.** Dec 1; v. 47, n.1-3, 2009, p. 71-79.

HSIU, J.; FISHER, E.H.; STEIN, E.A. **Alpha-amylase as calcium metalloenzymes. II.** Calcium and catalytic activity. *Biochemistry.* v. 3, n. 64, 1964.

KUMAR, S.; KHARE, S.K. **Chloride Activated Halophilic  $\alpha$ -Amylase from *Marinobacter* sp. EMB8:** Production Optimization and Nanoimmobilization for Efficient Starch Hydrolysis. *Enzy Res*, 2015.

LIN, L.L.; CHYAU, C.C.; HSU, W.H. Production and properties of a raw starch-degrading amylase from the thermophilic and alkalophilic *Bacillus* sp. TS-23. **Biotechnol. Appl. Biochem.** v, 28, 1998, p. 61–68.

MILNER, J. A.; MARTIN, J.; SMITH, A. Oxygen transfer conditions in the production of alpha-amylase by *Bacillus amyloliquefaciens*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.18, p. 507-512, 1997.

MORCEL C.; BIEDERMANN, K. **Coupling of fermentation and microfiltration for  $\alpha$ - amylase production from *Bacillus amyloliquefaciens*.** *FEMS Microbiology Reviews*, Amsterdam, v. 14, n. 1, p. 57-62, 1994.

NIELSEN, J.E.; BORCHERT, T.V. 2000. **Protein engineering of bacterial  $\alpha$ -amylases.** *Biochim. Biophys. Acta* 1543, 253–374.

OLIVEIRA, C.; MULLER, F.; SEGATO, M. Departamento de Engenharia Química e de Alimentos. Aplicações de enzimas em produtos de limpeza. *In: Trabalhos de graduação do grupo de processos biotecnológicos da UFSC*. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2004. Disponível em: [http://www.enq.ufsc.br/labs/probio/disc\\_eng\\_bioq/trabalhos\\_grad2004/detergente/enzimas\\_produtos\\_limpeza.htm](http://www.enq.ufsc.br/labs/probio/disc_eng_bioq/trabalhos_grad2004/detergente/enzimas_produtos_limpeza.htm). Acesso em: 2 jan. 2020.

PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V.T. Biotechnological potential of agroindustrial residues. I: sugarcane bagasse. **BioTech**. Aug; b. 74, n. 1, 2000, p. 69-80.

PANDEY, A.; WEBB, C.; SOCCOL, C.R.; LARROCHE, C. **Enzyme Technology**. 1<sup>a</sup> ed. New Delhi: Asiatech Publishers, Inc, 2005.

PEIXOTO, S.C.; JORGE, J.A.; TERENCEZ, H.F.; DE LOURDES, M.; POLIZELI, T.M. *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis*: a thermotolerant fungus with potential for production of thermostable amylases. **Int. Microbiol.**, v. 6, n. 4, 2003, p. 269–273.

POLITZER, K.; BOM, E. P. S. **Enzimas Industriais e Especiais**. Rio de Janeiro, 2006. Disponível em: <[http://www.anbio.org.br/pdf/2/tr03\\_enzimas.pdf](http://www.anbio.org.br/pdf/2/tr03_enzimas.pdf)> Acesso em: 28 de jun. de 2020.

PRIEST, E.G. Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus* Bacterial, **Bacteriol Rev.**, v. 41, 1977, p. 711-753.

SAHA, B.C.; ZEIKUS, J.G. **Biotechnology of maltose syrup production**. *Bioprocess Biochem.*, June, 1987, p. 78-82.

SAJEDI, R.H.; NADERI-MANESH, H.; KHAJEH, K.; AHMADVAND, R., RANJBAR, B.; ASOODEH, A.; MORADIAN, F. A Ca-independent  $\alpha$ -amylase that is active and stable at low pH from the *Bacillus* sp. KR-8104. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, 2005, p. 666-671.

SANDHYA, C.; SUMANTHA, A.; SZAKACS, G.; PANDEY, A. **Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation**. *Process Biochemistry*, v. 40, p. 2689–2694, 2005.

SARIKAYA, E.; HIGASA, T.; ADACHI, M.; MIKAMI, B. **Comparison of degradation abilities of  $\alpha$ - and  $\beta$ -amylase on raw starch granules**. *Process Biochemistry*, v. 35(7), p. 711-715, 2000.

SEONG, Y.; RYU, S.T.; LEE, S.B.; MOON, T.W. Purification and Characterization of Branching Specificity of a Novel Extracellular Amylolytic Enzyme from Marine 94 Hyperthermophilic *Rhodothermus marinus*. **J Microbiol Biotechnol**. v. 18 n. 3. 2008, p. 457– 464.

SHIMADA, H.; HONJO, M.; MITA, I.; NAKAYAMA, A.; AKAOKA, A.; MANABE, K.; FURUTANI, Y. **The nucleotide sequence and some properties of the neutral**

**protease gene of *Bacillus amyloliquefaciens***. *Journal of Biotechnology*, v. 2, p. 75-85, 1985.

SIDHU, G.S.; SHARMA, P.; CHAKRABARTI, T.; GUPTA, J.K. Strain improvement for the production of a thermostable  $\alpha$ -amylase. ***Enzyme and Microbial Technology***, v. 21, n. 7, 1997, p. 525-530.

SILVA, I.F. **Produção de amilase por bacillus amyloliquefaciens utilizando torta de macaúba (*acrocornia aculeata*) e farinha de pupunha (*bactris gasipaes*) como substratos**. 2012. Disponível em: [http://acervo.ufvjm.edu.br/jspui/bitstream/1/501/1/isadora\\_ferreira\\_silva.pdf](http://acervo.ufvjm.edu.br/jspui/bitstream/1/501/1/isadora_ferreira_silva.pdf). Acesso em: 15 dez. 2020.

SINGH, J.S.; PANDEY, V.C.; SINGH, D.P. Efficient soil microorganisms: A new dimension for sustainable agriculture and environmental development. ***Agric Ecosyst Environ***. Mar; v. 140, n. 3, 2011, p. 339–353.

SINGH R.; KUMAR M.; MITTAL A.; MEHTA PK. Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. ***Biotech***. Dec; v. 6, n. 2, 2016, p. 174.

SIVARAMAKRISHNAN, S.; GANGADHARAN, D.; NAMPOOTHIRI, K. M.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A.  $\alpha$ -amylases from microbial sources – an overview on recente developments. ***Food Technol. Biotechnol***, v. 44, n. 2, 2006, p. 173–184.

SLIDEPLAYER. **Proteínas e Enzimas**. 2016. Disponível em: <https://slideplayer.com.br/slide/5598533/>. Acesso em: 05 dez. 2020.

SOCCOL, C. R. et al. **Glucoamylase**. In: *Enzyme Technology*. New Delhi: Asiatec Publishers Inc., 2005. p. 221-230.

SOUZA, P. M.; MAGALHÃES, P. O. Application of microbial  $\alpha$ -amylase in industry – a review. ***Brazilian Journal of Microbiology***, v 41, 2010, p. 850-861.

SUNDARRAM, A.; MURTHY, T.P.K.  **$\alpha$ -Amylase Production and Applications: A Review**. *J Appl Environ Microbiol*. 2014 Jun; 2(4): 166-175

SURMELY, R. et al. **Hidrólise do Amido**. In: *Culturas de tuberosas amiláceas latino americanas*. v. 3, cap. 15. 2003, p. 377-395.

TAFFARELLO, L.A.B.; PASTORE, G.M. **Produção, purificação parcial, caracterização e aplicações de alfa-amilases termoestável produzida por bactérias**. Disponível em: [http://repositorio.unicamp.br/bitstream/REPOSIP/256715/1/Taffarello\\_LucianaAfonsoBittar\\_M.pdf](http://repositorio.unicamp.br/bitstream/REPOSIP/256715/1/Taffarello_LucianaAfonsoBittar_M.pdf). Acesso em: 28 jan. 2020.

VALLEE, B.L.; STEIN, E.A.; SUMMERWELL, W.M.; FISCHER, E.M. Metal content of  $\alpha$ -amylases of various origins. ***J. Biol. Chem***. V. 231, 1959, p. 2901-2905.

VAN DER MAAREL, M.J.; VAN DER VEEN, B.; UITDEHAAG, J.C.; LEEMHUIS, H.; DJKHUIZENL, L. Properties and applications of starch-converting enzymes of the  $\alpha$ -amylase family. **J. Biotechnol.** V. 94, 2002, p. 137–155.

VERMAANPERÄ, J.; STEINBORN, G.; HOFEMEISTER, J. Genetic manipulation of *Bacillus amyloliquefaciens*. **Journal of Biotechnology**, v. 19, p. 221-240, 1991.

VESTER, J.K.; GLARING M.A.; STOUGAARD, P. Improved cultivation and metagenomics as new tools for bioprospecting in cold environments. **Extremoph.** Jan, v. 19, n. 1, 2015, p. 17-29.

VIHINEN M.; MÄNTSÄLÄ, P. **Microbial amylolytic enzymes.** Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology, v. 24, p. 329-418, 1989.

WELKER, N. E.; CAMPBELL, L.L. Induction and properties of a temperature bacteriophage from *Bacillus stearothermophilus*. **J Bacteriol.** Jan; v. 89, 1967, p.175–184.

WOHLGEMUTH, R. **Biocatalysis-key to sustainable industrial chemistry.** Curr. Opin Biotechnol. Dec; 21, n. 6, 2010, p. 713-724.

YUTANI, A.; YUTANI, K.; ISEMURA, T. Stability of the conformation of saccharifying-amylase. **J. Biochem.**, v. 62, 1969, p. 201-210.