

UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
ESCOLA DE ENGENHARIA INDUSTRIAL METALÚRGICA DE VOLTA REDONDA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA AMBIENTAL

BRISABELLA CLARA CORBOLAN COCA

OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE α -AMILASE PRODUZIDA
POR *Bacillus amyloliquefaciens*

VOLTA REDONDA

2019

BRISABELLA CLARA CORBOLAN COCA

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE α -AMILASE
PRODUZIDA POR *Bacillus amyloliquefaciens***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Ambiental da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Tecnologia Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo de Souza Teodoro

Co-Orientadora: Prof^a Dra. Ana Paula Martinazzo

Volta Redonda, RJ

2019

Ficha catalográfica automática - SDC/BEM
Gerada com informações fornecidas pelo autor

C659o Coca, Brisabella Clara Corbolan
OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ALFA-AMILASE
PRODUZIDA POR *Bacillus amyloliquefaciens* / Brisabella Clara
Corbolan Coca ; Carlos Eduardo de Souza Teodoro, orientador ;
Ana Paula Martinazzo, coorientadora. Volta Redonda, 2019.
103 f. : il.

Dissertação (mestrado)-Universidade Federal Fluminense,
Volta Redonda, 2019.

DOI: <http://dx.doi.org/10.22409/PCTA.2019.m.21902777875>

1. Enzima. 2. Amilase. 3. Microrganismo. 4. Biotecnologia.
5. Produção intelectual. I. Teodoro, Carlos Eduardo de
Souza, orientador. II. Martinazzo, Ana Paula, coorientadora.
III. Universidade Federal Fluminense. Escola de Engenharia
Industrial e Metalúrgica de Volta Redonda. IV. Título.

CDD -

Bibliotecária responsável: Andreia de Oliveira Palm - CRB7/5183

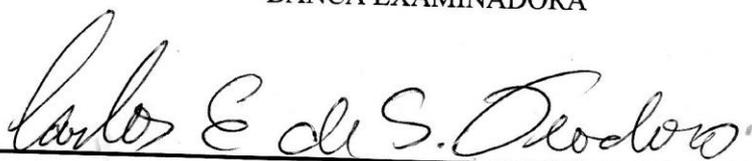
BRISABELLA CLARA CORBOLAN COCA

OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE α -AMILASE PRODUZIDA
POR *Bacillus amyloliquefaciens*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Tecnologia Ambiental da
Universidade Federal Fluminense, como
requisito parcial à obtenção do título de
Mestre em Tecnologia Ambiental

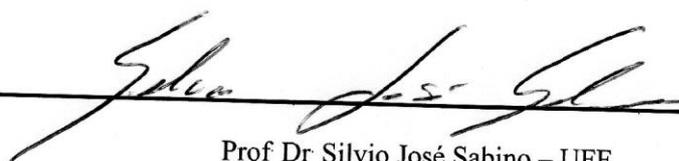
Aprovada em 20 de fevereiro de 2019

BANCA EXAMINADORA

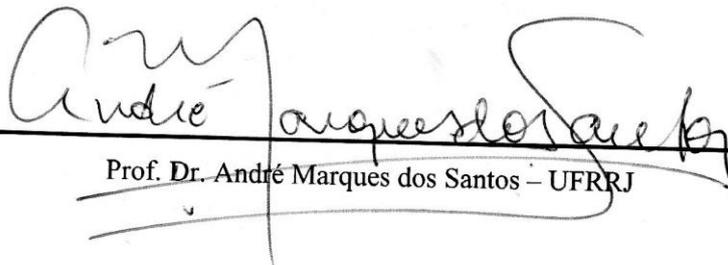


Prof. Dr. Carlos Eduardo de Souza Teodoro – UFF

Orientador



Prof. Dr. Silvio José Sabino – UFF



Prof. Dr. André Marques dos Santos – UFRRJ

Volta Redonda

2019

Dedico este trabalho à minha amada filha Aurora.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por tudo.

Agradeço à Universidade Federal Fluminense.

Meus sinceros agradecimentos ao meu orientador, professor Carlos Eduardo, pelos ensinamentos, orientação, paciência e pela oportunidade a mim concedida de juntos realizarmos este trabalho.

Agradeço à minha co-orientadora, professora Ana Paula Martinazzo.

Agradeço aos membros da banca examinadora, Dr. Silvio José Sabino e Dr. André Marques dos Santos por aceitarem o convite de participarem da banca e contribuírem para este trabalho.

Agradeço a todos os professores do curso de Pós-Graduação em Tecnologia Ambiental, pelas horas agradáveis de aprendizado e de novas experimentações.

Agradeço a toda a turma de 2016 do PGTA pelas horas divertidas, trocas de experiências, ajuda, companheirismo, pela amizade construída.

Agradeço a todos os companheiros do laboratório de Biotecnologia, sempre dispostos a ajudar e passar seus conhecimentos e ao técnico Mateus pela ajuda.

Agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram durante essa caminhada maravilhosa e na realização deste trabalho.

Grata a todos.

RESUMO

Com o avanço dos estudos na área de microbiologia, química e genética de micro-organismos, houve o aprimoramento da biotecnologia em diversas áreas de sua aplicação, propiciando a realização de processos importantes e cada vez mais sustentáveis ambientalmente. Neste diapasão, a aplicação de enzimas na área ambiental e industrial, nos mais variados ramos, aumentou nas últimas décadas, como por exemplo, na recuperação de áreas contaminadas, nas indústrias farmacêuticas, têxteis, papel e celulose, biocombustíveis e de alimentos. A α -amilase é uma enzima da família das amilases, que hidrolisa as moléculas de amido em produtos de menor peso molecular. A α -amilase atua ao acaso ao longo da cadeia de amilose e amilopectina hidrolisando as ligações α -1,4 e liberando maltoligossacarídeos. Diversas linhagens de micro-organismos vêm sendo estudadas no intuito de se obter maior rendimento enzimático e redução dos custos relativos ao meio de cultura. Dada a importância da aplicação da enzima α -amilase em diversos processos industriais, reduzindo desta forma, custos e o uso de recursos naturais, tornando esses processos mais eficientes, este trabalho foi desenvolvido para se avaliar o desempenho da bactéria *Bacillus amyloliquefaciens* VR002 para a produção de α -amilase. Neste sentido, foram avaliadas as condições ótimas de cultivo como tempo de cultivo, concentração de amido, temperatura de crescimento do micro-organismo, pH inicial do meio de cultura, fontes de nitrogênio e carbono e tamanho de inóculo, visando o aumento da produção da enzima. Verificou-se que no tempo de 24h de crescimento na temperatura de 30 °C em pH inicial no valor de 6,5 e inóculo a 2%, ocorreu a maior produção de α -amilase. O uso de fécula de batata na concentração de 1% no meio de cultura, como fonte de carbono, aumentou a atividade em aproximadamente 72%. A adição de extrato de carne na concentração de 1%, como fonte de nitrogênio, provocou um aumento de aproximadamente 54% na atividade enzimática. Na caracterização da α -amilase produzida, foram analisadas as condições de incubação do extrato bruto enzimático e o efeito sobre a atividade enzimática de diferentes íons metálicos, inibidores e detergentes, neste sentido, a temperatura ótima de incubação do extrato bruto enzimático foi de 45 °C no tempo de 5 minutos em meio reacional com valor de pH 7, contendo substrato na concentração de 1,5% e 0,15 mL de extrato bruto enzimático. A presença de íons metálicos no meio reacional influenciou positivamente a atividade enzimática, o uso de cobalto na concentração de 10 mM provocou um aumento de 1.004% na atividade enzimática. Na presença de inibidores e detergentes a enzima se mostrou tolerante na concentração de 1 mM tanto de detergentes quanto de inibidores. O uso de DTT e Benzamidina aumentaram a atividade enzimática.

Palavras-chave: Amilase. Biotecnologia. Enzima. Meio de cultura. Micro-organismos.

ABSTRACT

With the advancement of studies in the microbiology, chemistry and genetics of microorganisms, biotechnology has been improved in several areas of its application, allowing the accomplishment of important and increasingly environmentally sustainable processes. Within this range, the application of enzymes in the environmental and industrial areas has increased in the last decades, for instance in the recovery of contaminated areas, in the pharmaceutical, textile, pulp and paper, biofuel and food industries. The α -amylase is an enzyme of the amylases kind, which hydrolyzes the starch molecules into lower molecular weight products. The α -amylase acts at random along the amylose and amylopectin chain by hydrolyzing α -1,4 links and releasing maltoligosaccharides. Several strains of microorganisms have been studied in order to obtain a higher enzymatic yield and reduce the costs related to the culture medium. The proven importance of the application of the α -amylase enzyme in several industrial processes, thus reducing costs and the use of natural resources, making these processes more efficient, this work was developed to evaluate the performance of the bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* VR002 for the production of the α -amylase. With this in mind, the optimum conditions of cultivation, such as culture time, starch concentration, microorganism growth, temperature, initial pH of the culture medium, nitrogen and carbon sources and inoculum size were evaluated in order to increase the production of enzyme. It was observed that in the time of 24 hours of growth in the temperature of 30°C in initial pH in the value of 6,5 and inoculum to 2%, a greater production of the α -amylase has occurred. The use of potato starch at 1% concentration in the culture medium as a carbon source increased activity by approximately 72%. The addition of 1% meat extract, as a source of nitrogen, has caused an increase of approximately 54% in the enzymatic activity. In the characterization of the α -amylase produced, the incubation conditions of the crude enzymatic extract and the effect on the enzymatic activity of different metal ions, inhibitors and detergents were analyzed. By this mean, the optimum incubation temperature of the crude enzyme extract was 45°C in 5 minutes in a medium reaction with pH 7, containing 1.5% substrate and 0.15 mL crude enzymatic extract. The presence of metallic ions in the medium reaction positively influenced the enzymatic activity, the use of cobalt in the concentration of 10 mM caused an increase of 1.004% in the enzymatic activity. In the presence of inhibitors and detergents the enzyme was tolerant at 1 mM concentration of both detergents and inhibitors. The use of DTT and Benamidine increased the enzymatic activity.

Keywords: Amylase. Biotechnology. Enzyme. Culture Medium. Microorganisms

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Classificação das enzimas amilolíticas, p. 22

Figura 2. Estrutura de α -amilase de *Bacillus amyloliquefaciens*, p. 24

Figura 3. Estrutura de amilose e amilopectina. A) Estrutura de amilose – polímero linear composto por D-glicoses unidas em α -1,4. B) Estrutura da amilopectina – polímero ramificado composto por D-glicoses unidas em α -1,4 e α -1,6, p. 27

Figura 4. Atividade de α -amilase de *B. amyloliquefaciens* VR002 cultivado em meio de cultura contendo diferentes concentrações (%) de amido solúvel. Micro-organismo crescido a 35 °C e 150 rpm, em diferentes tempos de cultivo. As barras representam o desvio padrão, p. 41

Figura 5. Concentração de açúcares redutores presente no sobrenadante da cultura. Micro-organismo crescido a 35 °C e 150 rpm. As barras representam o desvio padrão, p. 43

Figura 6. Crescimento de *B. amyloliquefaciens* VR002 em diferentes tempos de cultivo e diferentes concentrações de amido no meio de cultura. As barras representam o desvio padrão, p. 44

Figura 7. Valores de pH da cultura após 12, 24, 36 e 48h de crescimento em meio de cultura contendo diferentes concentrações de amido. As barras representam o desvio padrão, p. 46

Figura 8. Atividade de α -amilase de *B. amyloliquefaciens* VR002 cultivado em meio contendo 1,0% de amido solúvel, em diferentes temperaturas de cultivo por 24h a 150 rpm. Diferentes temperaturas de incubação da enzima estão demonstradas na legenda lateral. As barras representam o desvio padrão, p. 47

Figura 9. Concentração de açúcares redutores presente no sobrenadante da cultura. Micro-organismo crescido em diferentes temperaturas de cultivo por 24h a 150 rpm em meio de cultura contendo 1,0% de amido. As barras representam o desvio padrão, p. 50

Figura 10. Crescimento de *B. amyloliquefaciens* VR002, após 24h, em diferentes temperaturas de cultivo em meio de cultura contendo 1,0% de amido. As barras representam o desvio padrão, p. 51

Figura 11. Valor de pH do meio de cultura após 24h de crescimento de *B. amyloliquefaciens* VR002 em diferentes temperaturas de cultivo. As barras representam o desvio padrão, p. 52

Figura 12. Atividade de α -amilase de *B. amyloliquefaciens* VR002 cultivado em diferentes valores de pH inicial do meio de cultura. Enzima incubada em diferentes valores de pH do meio reacional. Micro-organismo cultivado por 24h, a 30 °C e 150 rpm. As barras representam o desvio padrão, p. 53

Figura 13. Concentração de açúcares redutores presente no sobrenadante da cultura. Micro-organismo crescido em diferentes concentrações de pH inicial do meio de cultura por 24h, 30 °C e 150 rpm. As barras representam o desvio padrão, p. 56

Figura 14. Crescimento de *B. amyloliquefaciens* VR002 em meio contendo 1,0% de amido em diferentes valores de pH inicial. Micro-organismo crescido a 30 °C, 150 rpm por 24h. As barras representam o desvio padrão, p. 56

Figura 15. Valor de pH do meio de cultura após 24h de crescimento de *B. amyloliquefaciens* VR002 em diferentes valores de pH inicial do meio de cultura. As barras representam o desvio padrão, p. 57

Figura 16. Atividade relativa de α -amilase de *B. amyloliquefaciens* VR002 cultivado em meio de cultura contendo diferentes fontes de nitrogênio. Micro-organismo crescido por 24h, em pH inicial de 6,5, a 30 °C e 150 rpm. As barras representam o desvio padrão, p. 58

Figura 17. Concentração de açúcares redutores presente no sobrenadante da cultura. Micro-organismo crescido em meio de cultura contendo diferentes fontes de nitrogênio, com pH inicial 6,5 por 24h, 30 °C e 150 rpm. As barras representam o desvio padrão, p. 61

Figura 18. Crescimento de *B. amyloliquefaciens* VR002 em meio de cultura contendo diferentes fontes de nitrogênio. Micro-organismo crescido a 30 °C, 150 rpm por 24h com pH inicial 6,5. As barras representam o desvio padrão, p. 62

Figura 19. Valor de pH do meio de cultura após 24h de crescimento de *B. amyloliquefaciens* VR002, cultivado em diferentes fontes de nitrogênio. As barras representam o desvio padrão, p. 62

Figura 20. Atividade relativa de α -amilase de *B. amyloliquefaciens* VR002 cultivado em meio de cultura contendo diferentes concentrações de extrato de carne, como fonte de nitrogênio. Micro-organismo crescido a 30 °C, 150 rpm por 24h e pH inicial de 6,5. As barras representam o desvio padrão, p. 64

Figura 21. Concentração de açúcares redutores presente no sobrenadante da cultura. Micro-organismo crescido em meio de cultura contendo diferentes concentrações de extrato de carne, por 24h, 30 °C e 150 rpm com pH inicial 6,5. As barras representam o desvio padrão, p. 65

Figura 22. Crescimento de *B. amyloliquefaciens* VR002 em meio de cultura contendo diferentes concentrações de extrato de carne. Micro-organismo crescido a 30 °C, 150 rpm por 24h com pH inicial 6,5. As barras representam o desvio padrão, p. 66

Figura 23. Valor de pH do meio de cultura, após 24h de crescimento de *B. amyloliquefaciens* VR002, contendo diferentes concentrações de extrato de carne. As barras representam o desvio padrão, p. 66

Figura 24. Atividade relativa de α -amilase de *B. amyloliquefaciens* VR002 cultivado em meio de cultura contendo diferentes fontes de carbono. Micro-organismo crescido por 24h, em pH inicial de 6,5, a 30 °C e 150 rpm em meio de cultura contendo 1% de extrato de carne, como fonte de nitrogênio. As barras representam o desvio padrão, p. 67

Figura 25. Concentração de açúcares redutores presente no sobrenadante da cultura. Micro-organismo crescido em meio de cultura contendo diferentes fontes de carbono, com pH inicial 6,5 por 24h, 30 °C, 150 rpm, em meio de cultura contendo 1% de extrato de carne, como fonte de nitrogênio. As barras representam o desvio padrão, p. 70

Figura 26. Crescimento de *B. amyloliquefaciens* VR002 em meio de cultura contendo diferentes fontes de carbono. Micro-organismo crescido a 30 °C, 150 rpm por 24h com pH inicial 6,5, em meio de cultura contendo 1% de extrato de carne, como fonte de nitrogênio. As barras representam o desvio padrão, p. 71

Figura 27. Valor de pH do meio de cultura após 24h de crescimento de *B. amyloliquefaciens* VR002, cultivado em diferentes fontes de carbono. Micro-organismo crescido a 30 °C, 150 rpm por 24h com pH inicial 6,5, em meio de cultura contendo 1% de extrato de carne, como fonte de nitrogênio. As barras representam o desvio padrão, p. 72

Figura 28. Atividade relativa de α -amilase de *B. amyloliquefaciens* VR002 cultivado em meio de cultura contendo diferentes concentrações de pré-inóculo. Micro-organismo crescido a 30 °C, 150 rpm por 24h e pH inicial de 6,5 em meio de cultura contendo 1% de extrato de carne, como fonte de nitrogênio e 1% de fécula de batata como fonte de carbono. As barras representam o desvio padrão, p. 73

Figura 29. Concentração de açúcares redutores presente no sobrenadante da cultura. Micro-organismo crescido em meio de cultura contendo diferentes concentrações de pré-inóculo, com pH inicial 6,5 por 24h, 30 °C e 150 rpm. As barras representam o desvio padrão, p. 76

Figura 30. Crescimento de *B. amyloliquefaciens* VR002 em meio de cultura contendo diferentes concentrações de pré-inóculo. Micro-organismo crescido a 30 °C, 150 rpm por 24h com pH inicial 6,5. As barras representam o desvio padrão, p. 76

Figura 31. Valor de pH do meio de cultura após 24h de crescimento de *B. amyloliquefaciens* em diferentes concentrações de pré-inóculo. As barras representam o desvio padrão, p. 77

Figura 32. Atividade de α -amilase de *B. amyloliquefaciens* VR002 sob efeito de diferentes concentrações de substrato e diferentes concentrações de extrato bruto enzimático. Micro-organismo crescido a 30 °C, 150 rpm por 24h e pH inicial de 6,5 em meio de cultura contendo 1% de extrato de carne, como fonte de nitrogênio e 1% de fécula de batata como fonte de carbono. As barras representam o desvio padrão, p. 78

Figura 33. Efeito da concentração de substrato sobre a velocidade da reação catalisada por α -amilase, p. 80

Figura 34. Atividade de α -amilase de *B. amyloliquefaciens* VR002 avaliada em diferentes tempos de incubação. Extrato bruto enzimático na concentração de 0,15 mL, incubado a 45 °C, em meio

contendo substrato na concentração de 1,5% e pH 7. Micro-organismo crescido a 30 °C, 150 rpm por 24h e pH inicial de 6,5. As barras representam o desvio padrão, p. 81

Figura 35. Atividade relativa de α -amilase de *B. amyloliquefaciens* VR002 sob o efeito de diferentes cátions. A atividade é expressa como porcentagem da atividade obtida na ausência de cátions (Controle =100% de atividade enzimática), p. 83

Figura 36. Atividade relativa de α -amilase de *B. amyloliquefaciens* VR002 sob efeito de inibidores e detergentes. A atividade é expressa como porcentagem da atividade obtida na ausência de qualquer substância (Controle = 100% de atividade enzimática), p. 86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais classes de enzimas, p. 20

Tabela 2. Resumo da análise de variância dos dados obtidos do efeito do tempo de cultivo de *B. amyloliquefaciens* VR002 e da concentração de amido no meio de cultura sobre a produção de α -amilase, p. 99

Tabela 3. Resumo da análise de variância dos dados obtidos do efeito da temperatura de cultivo de *B. amyloliquefaciens* VR002 e da temperatura de incubação do extrato bruto enzimático sobre a atividade enzimática, p. 99

Tabela 4. Resumo da análise de variância dos dados obtidos do efeito do pH inicial no meio de cultura de *B. amyloliquefaciens* VR002 e do pH de incubação da enzima sobre a atividade enzimática, p. 100

Tabela 5. Resumo da análise de variância dos dados obtidos do efeito de diferentes fontes de nitrogênio no meio de cultura de *B. amyloliquefaciens* sobre a produção de α -amilase, p. 100

Tabela 6. Resumo da análise de variância dos dados obtidos do efeito de diferentes concentrações de extrato de carne, como fonte de nitrogênio no meio de cultura sobre a produção de α -amilase, p. 100

Tabela 7. Resumo da análise de variância dos dados obtidos do efeito de diferentes fontes de carbono no meio de cultura sobre a produção de α -amilase, p. 101

Tabela 8. Resumo da análise de variância dos dados obtidos do efeito de diferentes concentrações de pré-inóculo no meio de cultura sobre a produção de α -amilase, p. 101

Tabela 9. Resumo da análise de variância dos dados obtidos do efeito de diferentes concentrações de substrato e diferentes concentrações de extrato bruto enzimático na atividade de α -amilase, p. 101

Tabela 10. Resumo da análise de variância dos dados obtidos do efeito de diferentes tempos de incubação da enzima sobre a atividade de α -amilase, p. 102

Tabela 11. Resumo da análise de variância dos dados obtidos do efeito de diferentes cátions em diferentes concentrações sobre a atividade de α -amilase de *B. amyloliquefaciens* VR002, p. 102

Tabela 12. Resumo da análise de variância dos dados obtidos do efeito de diferentes inibidores e detergentes em diferentes concentrações sobre a atividade de α -amilase, p. 103

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

| | |
|------------------|--|
| α | Alfa |
| β | Beta |
| °C | Grau Celsius |
| % | Porcentagem |
| h | Hora |
| μmol | Micromol |
| M | Molar |
| mM | Milimolar |
| mL | Mililitro |
| mg | Miligrama |
| nm | Nanômetro |
| pH | Potencial hidrogeniônico |
| rpm | Rotação por minuto |
| sp. | Espécie |
| U | Unidade internacional de atividade enzimática |
| $V_{\text{máx}}$ | Velocidade máxima de reação catalisada por uma enzima |
| K_m | Constante de Michaelis-Menten |
| w/v | Peso por volume |
| <i>B.</i> | <i>Bacillus</i> |
| DNS | Ácido 3,5-dinitrosalicílico (C ₇ H ₄ N ₂ O ₇) |
| <i>E.</i> | <i>Escherichia</i> |
| RJ | Rio de Janeiro |

SUMÁRIO

- 1 INTRODUÇÃO, p. 17
- 2 OBJETIVOS, p. 19
 - 2.1 OBJETIVOS GERAIS, p. 19
 - 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS, p. 19
- 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA, p. 20
 - 3.1 ENZIMAS, p. 20
 - 3.2 AMILASES, p. 22
 - 3.3 AMIDO, p. 26
 - 3.4 ALFA AMILASE E SUA APLICAÇÃO INDUSTRIAL, p. 28
 - 3.5 INFLUÊNCIA DA COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA E CONDIÇÕES DE CULTIVO PARA A PRODUÇÃO DE α -AMILASE, p. 31
- 4 JUSTIFICATIVA, p. 35
- 5 MATERIAIS E MÉTODOS, p. 36
 - 5.1 MICRO-ORGANISMO E ENSAIOS ANALÍTICOS, p. 36
 - 5.1.1 Determinação da atividade enzimática (BERNFELD, 1955), p. 37
 - 5.1.2 Quantificação de açúcar redutor (MILLER, 1959), p. 37
 - 5.1.3 Medida do crescimento, p. 38
 - 5.1.4 Medida do valor de pH, p. 38
 - 5.2 EFEITO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO SOBRE A PRODUÇÃO DE α -AMILASE, p. 38
 - 5.3 CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA α -AMILASE, p. 39
 - 5.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA, p. 40
- 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO, p. 41
 - 6.1 EFEITO DO TEMPO DE CULTIVO E DA CONCENTRAÇÃO DE AMIDO NO MEIO DE CULTURA, SOBRE A PRODUÇÃO DE α -AMILASE, p. 41
 - 6.2 EFEITO DA TEMPERATURA DE CULTIVO SOBRE A PRODUÇÃO DE α -AMILASE E DA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO DA ENZIMA SOBRE A ATIVIDADE ENZIMÁTICA, p. 46

6.3 EFEITO DO pH INICIAL DO MEIO DE CULTURA E pH DO SUBSTRATO SOBRE PRODUÇÃO E ATIVIDADE DE α -AMILASE DE *B. Amyloliquefaciens*, p. 52

6.4 EFEITO DE DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO NO MEIO DE CULTURA PARA A PRODUÇÃO DE α -AMILASE, p. 57

6.4.1 Efeito de diferentes concentrações de extrato de carne sobre a produção de α -amilase, p. 63

6.5 EFEITO DE DIFERENTES FONTES DE CARBONO SOBRE A PRODUÇÃO DE α -AMILASE, p. 67

6.6 EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE PRE-INÓCULO PARA A PRODUÇÃO DE α -AMILASE, p. 72

6.7 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE EXTRATO BRUTO ENZIMÁTICO E DA CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO NO MEIO REACIONAL PARA A ATIVIDADE DE α -AMILASE, p. 77

6.8 EFEITO DO TEMPO DE INCUBAÇÃO DO EXTRATO BRUTO ENZIMÁTICO SOBRE A ATIVIDADE DE α -AMILASE, p. 81

6.9 EFEITO DE CÁTIONS SOBRE A ATIVIDADE DE α -AMILASE, p. 82

6.10 EFEITO DE INIBIDORES E DETERGENTES SOBRE A ATIVIDADE DE α -AMILASE, p. 85

7 CONCLUSÕES, p. 89

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS, p. 90

ANEXO, p. 99

1 INTRODUÇÃO

Processos biológicos são utilizados pela humanidade há séculos para preparar bebidas, pães, vinagre, queijos, entre outros, porém, somente no século XIX é que se descobriu que os responsáveis pela fermentação eram micro-organismos (BORZANI et al., 2001).

A catálise biológica foi descrita pela primeira vez no século XVIII, através de estudos realizados sobre a digestão de carne pelas secreções estomacais, no século XIX foram realizados estudos com a conversão do amido em açúcar pela saliva e extratos de plantas (NELSON e COX, 2011).

Frederich Wilhelm Kuhne (1878) nomeou como enzimas, a substância responsável pela fermentação, enfatizando ser algo dentro das leveduras e não as leveduras propriamente, que realizam a catálise das reações de fermentação.

As enzimas são catalisadores biológicos, que apresentam diversas propriedades, o que as tornam interessantes em processos de biotransformações. As enzimas têm sido notavelmente aceitas como alternativa verde em diversos processos industriais (MADHU e CHAKRABORT, 2017), sendo utilizadas comercialmente em indústrias de alimentos, bebidas, combustível, farmacêutica, papel e celulose, têxtil, detergentes, entre outras (KIRK et al., 2002; GUPTA et al., 2003; DEMIRKAN et al., 2005; DAIHA et al., 2016). Processos enzimáticos industriais possuem inúmeras vantagens sobre processos químicos, aqueles não geram subprodutos tóxicos, não agredem o meio ambiente, consomem menos água e energia, são altamente eficientes, e além disso as enzimas são uma fonte renovável de recursos (BETINI et al., 2009; SUKUMARAM et al., 2009; HAMZAH et al., 2011).

As amilases representam uma importante classe enzimática com diversas aplicações biotecnológicas e industriais representando cerca de 25% do mercado mundial de enzimas (SAXENA et al. 2007). Sendo aplicadas na indústria de vários segmentos, é empregada em todos os processos que envolvem a hidrólise de amido (GOMES et al., 2007).

A maioria dos organismos vivos necessitam de glicose como fonte de energia, indiretamente evidenciando a importância das amilases em transformar em glicose, os alimentos armazenados na forma de amido, já que estão presentes desde a digestão de polissacarídeos em animais à germinação de sementes em plantas (BALASUBRAMANIAN et al., 2018).

As amilases podem ser obtidas através de diversas fontes, como em plantas, animais e micro-organismos. As amilases microbianas derivadas de fungos e bactérias têm dominado

o campo de aplicações industriais pela capacidade de produção e manipulação genética desses micro-organismos. Com as inovações biotecnológicas cada vez mais as amilases têm sido empregadas em novos processos industriais (SOUZA e MAGALHÃES, 2010).

Entre as amilases bacterianas mais utilizadas industrialmente estão as secretadas pelo gênero *Bacillus*, como as espécies: *B. stearothermophilus*, *B. subtilis*, *B. licheniformis* e *B. amyloliquefaciens* (NIGAM e SINGH, 1995; HAKI e RAKSHIT, 2003).

Deste modo, a investigação de novas cepas bacterianas é de suma importância a fim de encontrar novas fontes de amilases estáveis, visto sua ampla aplicação industrial e a alta eficiência de processos enzimáticos em detrimento de processos químicos de produção, selecionando micro-organismos que possuam características desejáveis como tolerância ao produto, alta eficiência de conversão, não patogênico, meio de cultivo de baixo custo, entre outros, tudo isso visando a eficiência nos processos industriais, sustentabilidade ambiental e custos reduzidos de produção. Assim, a bactéria *Bacillus amyloliquefaciens* VR002, cepa esta, isolada de amostras de solo coletadas na cidade de Volta Redonda no estado do Rio de Janeiro pela Universidade Federal Fluminense foi estudada na conversão de amido à açúcares redutores, com o objetivo de otimizar o meio de cultivo para a produção de α -amilase e caracterizar a enzima.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

- Otimizar as condições de cultivo de *Bacillus amyloliquefaciens* VR002 para a melhor produção da enzima α -amilase;
- Realizar a caracterização da atividade da α -amilase produzida por *Bacillus amyloliquefaciens* VR002.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar: a melhor concentração de amido no meio de cultura; o tempo ótimo de cultivo; pH inicial ótimo; temperatura ótima de cultivo; fonte de carbono ótima no meio de cultura; fonte de nitrogênio ótima no meio de cultura e a quantidade ideal de pré-inóculo, para a produção de α -amilase.
- Identificar: a temperatura ótima de incubação do extrato bruto enzimático; o tempo ótimo de incubação; o pH ótimo de incubação; a concentração ótima de extrato bruto enzimático; a concentração ótima de substrato e o pH ótimo de incubação para a atividade de α -amilase.
- Avaliar o comportamento da enzima α -amilase, sobre a influência de cátions, detergentes e inibidores.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 ENZIMAS

Enzimas são proteínas que têm a função de catalisar reações, facilitando a conversão de substratos em produtos (ALEXANDER et al., 2011). Esses catalisadores, mesmo em pequenas quantidades, são capazes de aumentar a velocidade de uma reação química em milhares de vezes, quando comparada a uma reação espontânea. Com alta especificidade aos substratos, as enzimas também podem ser inibidas por uma série de fatores físicos e químicos, como variações de pH, variações de temperatura, tratamento com álcool, bloqueio do sítio ativo por um composto semelhante ao substrato (inibição competitiva), deformação da enzima por inibidores que inativam coenzimas, cofatores ou produtos das reações (inibição não competitiva) (NELSON e COX, 2011). Apesar de existirem milhares de tipos de enzimas, elas podem ser agrupadas em seis principais classes, de acordo com a União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB), como demonstrado na tabela 1.

Tabela 1. Principais classes de enzimas

| Número da classe | Nome da classe | Reação catalítica |
|------------------|----------------|---|
| 1 | Oxirredutases | Reações de transferência de elétrons (transferência de elétrons ou átomos de hidrogênio de um composto para outro) |
| 2 | Transferases | Transferência de grupos funcionais (tais como grupos fosfato, amino e metil) |
| 3 | Hidrolases | Reações de hidrólise (adição de uma molécula de água para quebrar a ligação química) |
| 4 | Liases | Adição de duplas ligações a uma molécula, bem como remoção não-hidrolítica de grupos químicos |
| 5 | Isomerases | Reações de isomerização (um composto é alterado em outro, permanecendo com o mesmo número e tipos de átomos, mas difere na estrutura molecular) |
| 6 | Ligases | Formação de ligação com clivagem ou quebra de ATP |

Fonte: Adaptado de PELCZAR et al., 1997.

As enzimas podem ser obtidas através de várias fontes, como plantas, animais e micro-organismos. Geralmente, são as enzimas microbianas que atendem à demanda industrial (PANDEY et al., 2000), pois os micro-organismos podem ser produzidos em grande quantidade, gerando economia, e são passíveis de manipulação genética para se obter características desejáveis (GRUPTA et al., 2003). Inúmeras espécies de fungos e bactérias sintetizam e secretam enzimas que são industrialmente utilizadas (PANDEY et al., 2000). Enzimas provenientes de micro-organismos extremofílicos são interessantes para diversas aplicações biotecnológicas por trabalharem sob condições extremas, visto que tais micro-organismos vivem em condições extremas (ALI et al., 2015)

A seleção de cepas microbianas proporciona a produção de diversas enzimas com propriedades específicas aumentando os rendimentos na produção (JAEGER e REETZ, 1998). Além disso, estas enzimas são mais estáveis que seus homólogos obtidos de plantas e animais, e seu processo de produção é mais fácil e seguro (TANYILDIZI et al., 2005).

Com base no local de ação, as enzimas podem ser consideradas de dois tipos: enzimas intracelulares, com atuação dentro da célula, e enzimas extracelulares, com atuação fora da célula. As enzimas intracelulares sintetizam o material celular e também realizam reações catabólicas que suprem as necessidades energéticas da célula. Por outro lado, a principal função das enzimas extracelulares é a de executar as alterações necessárias à penetração dos nutrientes para o interior das células (GUPTA et al., 2003; NELSON e COX, 2011).

As enzimas são um ramo importante do mercado de biotecnologia, onde novos processos vêm sendo desenvolvidos para fabricar tanto produtos comuns quanto produtos de alto valor agregado, sendo utilizadas como biocatalisadores. Alimentos, química fina, produtos farmacêuticos e biocombustíveis são exemplos de produtos fabricados com a utilização de enzimas. Este tipo de catalisador é também utilizado para fornecer serviços ou para fins de análise e diagnóstico (DAIHA et al., 2016).

Em 2010, a Research and Markets, empresa de pesquisa de mercado, publicou um relatório sobre o mercado global de enzimas, onde 11% do mercado de enzimas em 2009 pertenciam ao ramo de combustível etanol, este mercado cresceu cerca de 15 a 20 % nos últimos anos. O mercado de enzimas conta com três grandes empresas, Novozymes A/S com sede na Dinamarca, Genencor International Inc, com sede nos Estados Unidos e DSM NV, com sede na Holanda. Os principais segmentos deste mercado são alimentos, como laticínios e bebidas, alimentação animal e aplicações técnicas. Em 2009, somente a Novozymes detinha cerca de 47% do mercado de enzimas industriais (Focus on Catalysts, 2011). Sendo

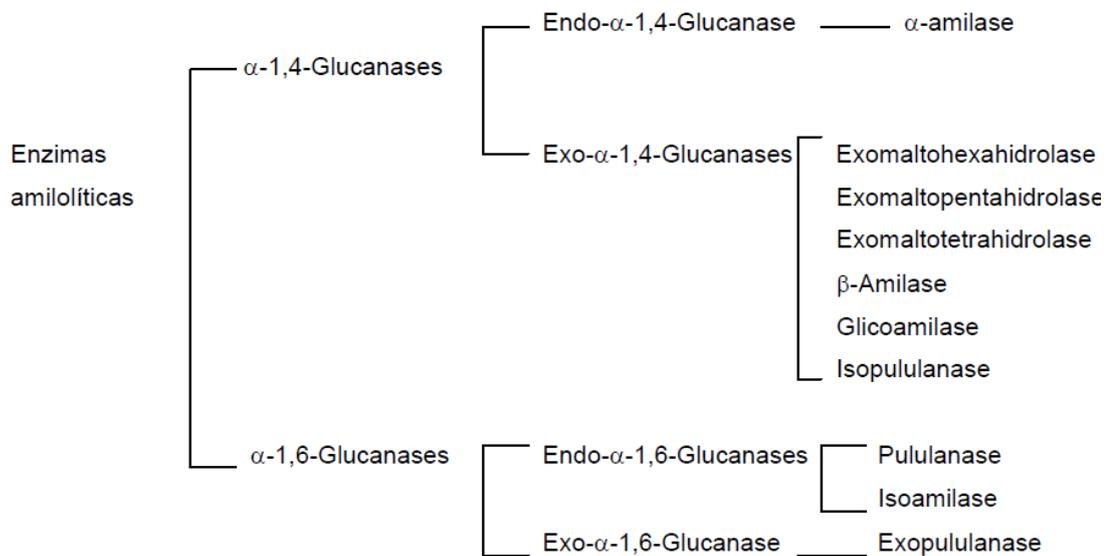
considerado um mercado crescente de grande importância econômica, espera-se um aumento de 6,3% ao ano, chegando a US\$ 7 bilhões em 2017 (DAIHA et. al., 2016).

3.2 AMILASES

As enzimas amilolíticas compreendem as hidrolases, que hidrolisam as moléculas de amido em produtos, como dextrinas, e pequenos polímeros compostos por unidades de glicose (GUPTA et al., 2003). Essas enzimas são muito utilizadas industrialmente no preparo de adesivos e colas, no clareamento de sucos de frutas, na produção de substâncias farmacêuticas, dentre outros processos (GUPTA et al., 2003; DEMIRKAN et al., 2005).

A Figura 1 apresenta a classificação das enzimas amilolíticas.

Figura 1. Classificação das enzimas amilolíticas.



Fonte: NIGAM e SINGH, 1995.

As amilases são um dos mais importantes e antigos grupos de enzimas aplicadas na indústria em diferentes ramos, como o de alimentos, têxtil, química, farmacêutica e detergentes (KIRK et al., 2002; GUPTA et al., 2003; DEMIRKAN et al., 2005), representando cerca de 25% do mercado de enzimas, encontrando aplicações em todos os

processos industriais que necessitam da hidrólise parcial ou completa do amido (SAXENA et al., 2007).

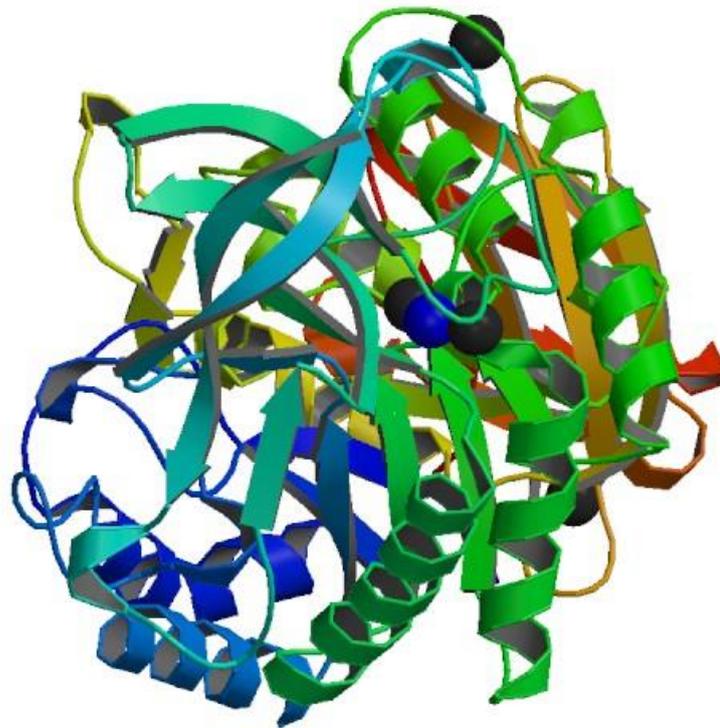
As amilases possuem estrutura tridimensional, capaz de se ligar ao substrato e promover a quebra de ligações glicosídicas pela ação de grupos catalíticos altamente específicos (IULEK et al., 2000). Dentre as enzimas amilolíticas, a mais importante é a α -amilase, pois desempenha um papel fundamental na conversão do amido em produtos de baixo peso molecular, que podem ser utilizados por outras enzimas do mesmo grupo (BALASUBRAMANIAN et al., 2018).

As α -amilases (EC 3.2.1.1, α -1,4-D-glicano glicanohidrolase) correspondem às endoamilases, que atuam ao acaso ao longo da cadeia de amilose e amilopectina hidrolisando as ligações α -1,4 e liberando maltoligossacarídeos (DECLERCK et al., 2000). Segundo a União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular as α -amilases pertencem à classe das hidrolases, e atuam de maneira aleatória sobre o amido, glicogênio e polissacarídeos relacionados e oligossacarídeos, liberando grupos redutores na configuração alfa.

A α -amilase possui diversas propriedades bioquímicas interessantes e a maioria delas requerem o íon cálcio para sua integridade estrutural, estabilidade e atividade e embora as α -amilases sejam obtidas de diversas fontes e possuam cadeias de aminoácidos diferentes, elas possuem função catalítica semelhante (HOMAEI et al., 2016).

Como comumente observado em α -amilases, Figura 2, a enzima consiste em uma única cadeia polipeptídica dobrada em três domínios distintos, A, B e C. O domínio A representa uma estrutura compacta em forma barril $(\alpha/\beta)_8$, o domínio B está inserido entre os domínios A e C, e está ligada ao domínio A por uma ligação dissulfeto, o domínio C possui estrutura folha β ligada ao domínio A, o cálcio (Ca^{2+}) está situado entre os domínios A e B e pode atuar na estabilização da estrutura tridimensional e como ativador alostérico. (SUVD et al., 2000)

Figura 2. Estrutura de α -amilase de *Bacillus amyloliquefaciens*.



Fonte: ALIKHAJEH et al., 2010.

Para a quebra completa da molécula do amido, várias enzimas que clivam o polímero em locais diferentes são necessárias. Conforme o modo de ação, as enzimas amilolíticas podem ser divididas em duas grandes categorias: as endoamilases e exoamilases. As endoamilases, α -amilases, catalisam a hidrólise das ligações glicosídicas do tipo α -1,4, de uma maneira aleatória, no interior da molécula de amido, sua ação resulta na formação de oligossacarídeos ramificados e lineares de vários comprimentos de cadeias. As exoamilases clivam exclusivamente as ligações glicosídicas α -1,4, como as β -amilases, ou clivam as duas ligações glicosídicas α -1,4 e α -1,6, como as glicoamilases e α -glicosidases. As exoamilases atuam sucessivamente nas ligações glicosídicas a partir da extremidade não redutora das mesmas, resultando em produtos finais pequenos: apenas glicose (glicoamilases e α -glicosidases) ou maltose e dextrinas (β -amilases) (PANDEY et al., 2000; GUPTA et al., 2003).

Um outro grupo de enzimas que hidrolisam apenas as ligações α -1,6, são a isoamilase e a pululanase, enzimas desramificantes. A pululanase hidrolisa tanto as ligações glicosídicas α -1,6 da amilopectina quanto as do pululano, enquanto que a isoamilase hidrolisa

apenas as ligações glicosídicas α -1,6 da amilopectina, deixando polissacarídeos lineares longos (MAAREL et al., 2002).

As transferases também clivam as ligações glicosídicas α -1,4 da molécula doadora e transfere parte do doador à um aceptor de glicose com a formação de uma nova ligação glicosídica. Enzimas como amilomaltase e ciclodextrina glicosiltransferase formam uma nova ligação glicosídica α -1,4 enzimas ramificantes formam ligações glicosídicas α -1,6, a principal diferença entre essas enzimas é que a amilomaltase realiza uma reação de transglicolização resultando em um produto linear, enquanto que a ciclodextrina glicosiltransferase resulta em um produto cíclico (VAN DER VEEN et al., 2000).

Entre as enzimas amilolíticas destaca-se também a β -amilase que é uma exoenzima que hidrolisa as ligações glicosídicas α -1,4 liberando β maltose, glicose e malto oligossacarídeos. As β -amilases são produzidas principalmente por plantas e algumas bactérias gram positivas, como as pertencentes ao gênero *Bacillus*. No ambiente intracelular atua no metabolismo vegetal transformando amido em maltose, proporcionando o sabor adocicado nos frutos. É empregada na indústria de alimentos e detergentes (KOCABAY et al., 2016).

As pululanases são enzimas desramificantes que clivam as ligações glicosídicas α -1,6 do pululano, amilopectina e oligossacarídeos. Conforme os tipos de substratos e produtos de reação, as enzimas pululanases podem ser classificadas em quatro grupos, pululanase tipo I que hidrolisam especificamente as ligações glicosídicas α -1,6 de pululano e outro oligossacarídeos ramificados formando maltotrioses ou oligômeros lineares, pululanase tipo I (neopululanase) que hidrolisam as ligações glicosídicas α -1,4 de pululano formando panose, as pululanases tipo II (amilopululanase) atacam não somente as ligações glicosídicas α -1,6 do pululano mas também as ligações α -1,4 de outros polissacarídeos e a pululanase tipo II (isopululanase) que hidrolisam as ligações glicosídicas α -1,4 de pululano formando isopanose (SPREINANT e ANTRANIKIAN, 1990). Uma nova amilopululanase foi descrita, proveniente de uma cepa de *Geobacillus stearothermophilus*, que converte pululano em glicose, maltose e maltorose, bem como amido em glicose e maltose (ZAREIAN et al., 2010). As pululanases são de grande interesse para a indústria de processamento de amido, uma vez que podem combianar a liquefação e a sacarificação em um único processo (YU et al., 2011).

Já as glicoamilases são enzimas extracelulares que clivam facilmente as ligações glicosídicas α -1,4 do amido e oligossacarídeos, mas as ligações α -1,6 são mais resistentes à ação desta enzima, que a cliva em menor velocidade. Muitas glicoamilases convertem

completamente o amido em D-glicose, mas somente quando usada em grande quantidade e em períodos longos de incubação. Secretada por diversas fontes microbianas, a glicoamilase é importante comercialmente na conversão de malto-oligossacarídeos em D-glicose (BARRY e MARILYN, 1980).

3.3 AMIDO

A maior parte dos carboidratos encontrados na natureza ocorre como polissacarídeos, polímeros de média até alta massa molecular, os polissacarídeos de armazenamento mais importantes são o glicogênio em células animais e o amido em células vegetais.

Como resultado da fotossíntese, as plantas sintetizam o amido, processo em que a energia da luz solar é convertida em energia química (MAAREL et al., 2002). O amido pode ser armazenado em diferentes órgãos e tecidos vegetais, como por exemplo, em plastídeos de folhas, frutos e no endosperma de cereais, formando grânulos que podem variar de 0,1 a 50 µm de diâmetro, constituindo um importante macronutriente da dieta humana (BALL e MORREL, 2003), é encontrado amplamente distribuído em vegetais, como carboidrato de reserva, sendo abundante em grãos de cereais (40 a 90% do peso seco), leguminosas (30 a 50% do peso seco), tubérculos (65 a 85% do peso seco) e frutas não maduras (40 a 70% do peso seco (LAJOLO e MENEZES, 2006).

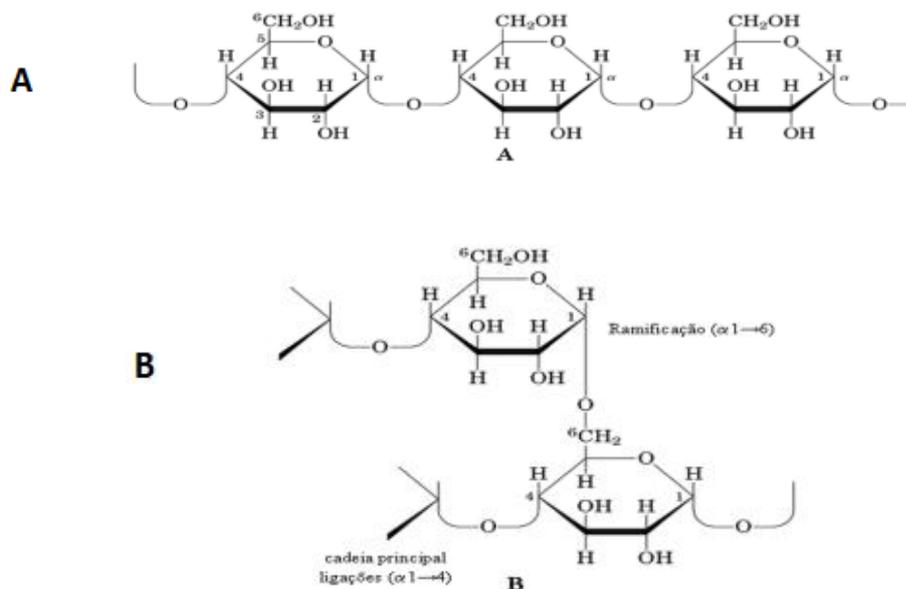
Além de seu uso como alimento, o amido é usado em vários processos industriais, químicos ou enzimáticos, para obtenção de xaropes de glicose, maltose e de frutose empregados em confeitarias, cervejarias, fábricas de biscoito, geleias e refrigerantes (GALDINO, 2008), sendo o principal responsável pelas propriedades tecnológicas que caracterizam grande parte de produtos processados, contribuindo para a textura de alimentos, espessante, estabilizador de colóides, agente gelificante, adesivo, entre outros (SINGH et al., 2003).

O amido é um polímero de D-glicose onde as moléculas são unidas entre si por ligações *O*-glicosídicas, que são formadas quando um grupo hidroxila no carbono 1 (C1) de uma molécula de açúcar reage com o átomo de carbono anomérico de outra molécula de açúcar (MAAREL et al., 2002; VANDEPUTTE e DELCOUR, 2004).

Dois tipos de polímeros de glicose estão presentes no amido: amilose e amilopectina, Figura 3. A amilose possui cadeias longas não ramificadas de unidades de D-glicose unidas

por ligações α -1,4, consistindo em até 6.000 unidades de glicose, essas cadeias variam em massa molecular, até mais de um milhão, já a amilopectina consiste em cadeias lineares e cadeias laterais, as ligações glicosídicas encontradas entre as unidades sucessivas de glicose são α -1,4 mas os pontos de ramificação são α -1,6, a molécula completa de amilopectina contém em média cerca de 2.000.000 de unidades de glicose, sendo uma das maiores moléculas da natureza (MAAREL et al., 2002). A proporção em que aparecem esses dois polímeros variam a depender das fontes botânicas, das variedades de uma mesma espécie e até mesmo dentro de uma variedade, de acordo com o grau de maturação da planta (TESTER et al., 2004).

Figura 3. Estrutura de amilose e amilopectina. A) Estrutura de amilose – polímero linear composto por D-glicoses unidas em α -1,4. B) Estrutura da amilopectina – polímero ramificado composto por D-glicoses unidas em α -1,4 e α -1,6.



Fonte: Adaptado de TESTER et al., 2004.

Quanto às propriedades físico-químicas, a amilopectina é solúvel em água, já a amilose e o próprio grânulo de amido são insolúveis em água fria, quando em água aquecida os grânulos incham de forma irreversível, este processo chama-se gelatinização, neste processo a amilose lixivia da fase intergranular para a fase aquosa aumentando a viscosidade.

Com o aumento da temperatura, a viscosidade aumenta, até que os grânulos se partem culminando em uma dispersão coloidal viscosa completa, com o posterior resfriamento obtêm-se um gel elástico, durante a retrogradação, o amido passa de um estado dissolvido e dissociado a um estado associado, a retrogradação é principalmente causada pela amilose, pois a amilopectina, devido a sua estrutura altamente ramificada é menos propensa à retrogradação (MAAREL et al., 2002). A retrogradação é um fenômeno complexo que varia conforme à influência de alguns fatores, como: temperatura, pH, tempo de armazenamento, fonte de amido, presença de outros componentes (lipídeos, eletrólitos, açúcares) e condições de processamento (THARANATHAN, 2002).

3.4 ALFA AMILASE E SUA APLICAÇÃO INDUSTRIAL

Um aumento na demanda pela enzima α -amilase na biotecnologia tem ocorrido devido à grande variedade de condições de sua atuação, tais como em alta temperatura, extremo de pH e na presença de surfactantes e solventes orgânicos (TANAKA e HOSHINO, 2002). Além disso, processos químicos podem gerar subprodutos tóxicos, mutagênicos, persistentes, bioacumulativos, causando assim, inúmeras perturbações prejudiciais nos sistemas biológicos. Nas últimas décadas, um número crescente de estudos objetivando desenvolver métodos ambientalmente limpos e não tóxicos para processos industriais vêm sendo desenvolvidos, neste contexto, o uso de processos enzimáticos tem sido o foco desses estudos (BETINI et al., 2009).

O maior mercado para a aplicação das α -amilases está na produção de amido hidrolisado na forma de glicose. Durante muito tempo o amido foi hidrolisado quimicamente, através de ácidos, este processo gerava compostos coloridos ou de “flavor” e dificultava o controle dos teores finais. Nos últimos 30 anos, as amilases vêm substituindo a hidrólise ácida (GOMES et al., 2007). Nos processos industriais de conversão do amido, a conversão enzimática inclui o processo de gelatinização, onde o amido é dissolvido formando uma solução viscosa, a liquefação que envolve uma hidrólise parcial e a sacarificação. A α -amilase do gênero *Bacillus* é utilizada neste tipo de segmento, ela precisa ter características de termoestabilidade e ser ativa e estável em pH baixo (NIELSEN e BORCHERT, 2000; SAJEDI et al., 2005; COUTO e SANROMÁN, 2006).

Na indústria têxtil, o amido é utilizado para impedir que o fio se quebre impedindo também a absorção de tintas e alvejantes, o uso de amilases para quebrar esse esmalte não

prejudica o tecido, tornando-o pronto para o branqueamento ou tingimento. As amilases são muito utilizadas para a remoção de amido dos fios após o processo de tecelagem. As amilases removem o amido sem danificar as fibras dos tecidos. O uso de enzimas na indústria têxtil ainda acelera o processo, consumindo menos água e energia, além de conferir diferenças no produto final, como maior maciez, cores mais vivas e impermeáveis (GUPTA et al., 2003; AHLAWAT et al., 2009; NOVOZYMES, 2017).

Nas indústrias de papel e celulose é realizado um tratamento no papel utilizando amido para tornar a superfície do papel lisa e forte, porém a viscosidade natural do amido é muito alta para a cobertura no papel, desta forma, a utilização de α -amilases tem o objetivo de degradar parcialmente o amido dando o acabamento adequado ao papel (GUPTA et al., 2003; CARVALHO, 2007).

As α -amilases também vêm sendo empregadas na indústria de detergentes (SINGH et al., 2012). Essas indústrias são as principais consumidoras de enzimas em termos de volume e valor (MITIDIERI, et al., 2006). As amilases são o segundo maior grupo de enzimas utilizadas na indústria de detergentes, o primeiro são as proteases. As amilases estão presentes em 90% dos detergentes líquidos, esses detergentes têm que ser capazes de degradar resíduos alimentares ricos em amido, como, batata, chocolate, cremes, molhos, dextrinas e outros oligossacarídeos. As amilases empregadas neste segmento devem ser estáveis em ambientes oxidantes, ter atividade em temperaturas baixas e pH alcalino e ter um ótimo nível de atividade nas formulações com a presença de proteases. As enzimas utilizadas neste segmento industrial são as secretadas pelos gêneros *Bacillus* e *Aspergillus* (GUPTA et al., 2003; MITIDIERI, et al., 2006; HMIDET et al., 2009).

Na produção de etanol, o substrato mais utilizado é o amido devido ao baixo custo e disponibilidade. A conversão do amido em etanol se dá pela liquefação e sacarificação, onde o amido é convertido em açúcar por enzimas como a α -amilase e em seguida ocorre o processo de fermentação, onde o açúcar é convertido em etanol através da utilização de leveduras. As α -amilases utilizadas nesse processo são provenientes de micro-organismos como *Bacillus licheniformis* ou cepas modificadas de *E. coli* ou *B. subtilis* (SANCHEZ e CARDONA, 2008; CHI et al., 2009).

Na indústria de alimentos, as amilases são utilizadas na panificação, fabricação de cervejas, suco de frutas, xaropes de amido, entre outros. Elas são responsáveis pela melhora do volume e textura dos produtos, aumento da taxa de fermentação, melhora do sabor, da cor, além de reterem a maciez dos produtos da panificação, clarificarem as cervejas e sucos de frutas e atuarem no pré-tratamento de rações animais melhorando a digestibilidade das fibras

(GUPTA et al., 2003; COUTO e SANROMÁN, 2006). As amilases termoestáveis de *Bacillus stearothermophilus* são utilizadas na indústria de panificação (MAAREL et al., 2002).

A aplicação de enzimas na indústria de vários segmentos em substituição a processos químicos, é um grande avanço na área de biotecnologia e na preservação ambiental. Processos químicos necessitam de condições ácidas, alcalinas, altas temperaturas, grande consumo de água, promovem emissão de CO₂ e produzem resíduos perigosos, em contrapartida, os processos enzimáticos possuem muitas vantagens, como o aumento de produção, não geram resíduos tóxicos, possuem condições de reação moderadas, promovem redução do consumo de água no processo, diminuem etapas de produção, os produtos gerados possuem alta qualidade, além do fato de que as enzimas não são consumidas durante o processo sendo passíveis de reuso, o que contribui para a diminuição do custo do processo (SUKUMARAN et al., 2009; HAMZAH et al., 2011).

A termoestabilidade é uma característica desejável na maioria das enzimas industriais. Enzimas termoestáveis isoladas de micro-organismos termofílicos encontram uma série de aplicações na indústria de vários segmentos e têm sido objeto de pesquisa. (STAMFORD et al., 2001; GOMES et al., 2003; ASGHER et al., 2007).

As amilases termoestáveis são produzidas por um pequeno número de organismos mesofílicos. Porém, existe um grande interesse por organismos termofílicos como produtores de novas enzimas amilolíticas, visto que as enzimas produzidas por estes organismos são geralmente mais estáveis quando comparadas às dos mesofílicos (KRISHNAN e CHANDRA, 1983).

As amilases produzidas por micro-organismos termofílicos têm recebido uma considerável atenção da indústria por serem termorresistentes, reduzindo riscos de contaminação, eliminação da etapa de resfriamento, aumento da taxa de difusão e por possuírem características importantes, como estabilidade à temperatura e ao pH (LIN et al., 1998).

Entre as α -amilases bacterianas mais importantes industrialmente estão as secretadas pelo gênero *Bacillus*, destacando-se as amilases ativas em altas temperaturas produzidas por *B. amyloliquefaciens*, *B. stearothermophilus*, *B. subtilis* e *B. licheniformis* (NIGAM e SINGH, 1995; HAKI e RAKSHIT, 2003).

As α -amilases termoestáveis produzidas por *Bacillus* são amplamente utilizadas na liquefação do amido, nas indústrias de papel, têxtil, detergentes, alimentos, adesivos, química fina, farmacêutica e bioquímica. Também possuem grande aplicação na produção de

combustível etanol, xarope de frutose e de glicose (SARIKAYA et al., 2000; GUPTA et al., 2003; SAXENA et al., 2007).

Dentre as α -amilases produzidas pelo gênero *Bacillus*, a α -amilase de *Bacillus licheniformis* é a mais utilizada em processos industriais de hidrólise de amido, por sua melhor reversibilidade à desnaturação térmica quando comparada à α -amilase de *Bacillus amyloliquefaciens* e a de *Bacillus stearothermophilus*. Entretanto, as estruturas tridimensionais e sequência de aminoácidos dessas três α -amilases são bastante similares (LI et al., 2017).

3.5 INFLUÊNCIA DA COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA E CONDIÇÕES DE CULTIVO PARA A PRODUÇÃO DE α -AMILASE

Alguns micro-organismos podem crescer apenas com a exigência de reduzidas fontes inorgânicas de nutrição, enquanto outros necessitam de compostos orgânicos complexos, assemelhando-se a organismos superiores, porém todos os organismos vivos possuem necessidades comuns como carbono, nitrogênio, hidrogênio e oxigênio. Esses elementos são necessários tanto para a síntese como para as funções normais dos componentes celulares. O carbono fornece energia para o crescimento da célula e serve como unidade básica do material celular, e o nitrogênio é necessário para a síntese de ácidos nucleicos e proteínas. (BORZANI et al., 2001; TORTORA et al., 2005).

As condições do meio físico são fundamentais para o crescimento do micro-organismo e as especificidades dessas condições poderão ser diferentes para cada tipo de micro-organismo. Há quatro condições fundamentais que irão interferir no crescimento do micro-organismo e na secreção de metabólitos: a temperatura, o pH, atmosfera gasosa e pressão osmótica. Assim, meios de cultura específicos são imprescindíveis para a cultura de micro-organismos (TORTORA et al., 2005; DJEKRIFF-DAKHMOUCHE et al., 2006).

O crescimento do micro-organismo e a produção de enzimas são fortemente influenciados pela composição do meio de cultura, assim, a otimização dos parâmetros e dos componentes do meio de cultura são a principal tarefa em um processo biológico (DJEKRIFF-DAKHMOUCHE et al., 2006). Particularmente, os parâmetros físico-químicos são fundamentais nos processos fermentativos por seu impacto econômico e pela viabilidade do processo, fatores como pH, temperatura, íons metálicos, fontes de nitrogênio e carbono,

agitação e concentração de fosfato, têm sido estudados na produção de α -amilase (SAJEDI et al., 2005; COUTO e SANROMÁN, 2006).

A aplicação industrial de enzimas pode ser dificultada devido à quantidade limitada produzida por alguns micro-organismos, tendo em vista que as condições exigidas para um ótimo crescimento do micro-organismo nem sempre são as mesmas para a produção de enzimas, variáveis como suplementação nutricional, pH do meio de cultura, pressão osmótica, grau de aeração e temperatura, influenciam no crescimento do micro-organismo e na produção de enzimas (PANDEY et al., 2000), contudo na maioria dos casos, adotando-se métodos simples como a utilização de um meio de cultura específico e otimizado, é possível aumentar significativamente o rendimento enzimático e reduzir os custos de produção (KUMAR e TAKAGI, 1999; JOO e CHANG, 2005).

As bactérias termofílicas podem ser cultivadas numa variedade de fontes de energia, dentre os substratos, incluem-se: biopolímeros comuns, açúcares, polipeptídeos, aminoácidos, álcoois, ácidos carboxílicos, aromáticos, monóxidos de carbono e lipídios. Como todos os organismos, as bactérias requerem certa quantidade de energia para manutenção de determinados processos, como a renovação de constituintes celulares e preservação da composição iônica. Assim, em temperaturas extremas, os termofílicos têm suas exigências aumentadas para preservar a organização espacial de componentes específicos da membrana que podem aumentar em taxas maiores do que a eficiência catalítica global (ZEIKUS, 1979).

As fontes de carbono fermentáveis tais como glicose, amido, lactose ou frutose são obtidos após o processamento de produtos agrícolas. Porém, eles se tornaram muito caros para a produção comercial de α -amilase (HAQ et al., 2005). O custo de produção de enzimas é alto, cerca de 30 a 40% do custo total de produção está relacionado com o meio de cultura utilizado (JOO e CHANG, 2005). Uma alternativa seria a utilização de resíduos agroindustriais em bioprocessos, visto que são fontes de substratos de natureza renovável, possuem baixo custo e com a vantagem de também contribuírem com a diminuição de problemas de natureza ambiental que a disposição desses resíduos poderia causar (PANDEY et al., 2000). Diariamente são gerados milhões de toneladas de resíduos agroindustriais em todo o mundo, alguns são aproveitados em rações animais, outros dispostos no campo, porém, a maior parte é descartada sem tratamento causando danos ao meio ambiente (MELO et al., 2011). Com as inovações biotecnológicas, principalmente na área de tecnologia enzimática e fermentação, muitas portas foram abertas para a utilização de resíduos agroindustriais, eles possuem um grande potencial de uso como substrato na fermentação, por apresentarem custo reduzido, possibilidade de produzirem produtos de alto valor agregado e serem passíveis de

consumo por micro-organismos (PELIZER et al., 2007). Vários resíduos agroindustriais como bagaço de cana-de-açúcar, farelo de soja, farelo de trigo, bagaço de maçã e torta de mamona mostraram potencial para a produção de lipases, por exemplo (SANTOS et al., 2012). Visando diminuir os custos de produção de amilases, pesquisas utilizando farelo de trigo, resíduos de café, banana, casca de batata, bagaço de cana, farelo de soja, farelo de arroz, torta de óleo de milho, casca de laranja, casca de maçã, como alternativa de substituição da fonte de carbono nos meios de cultivo vem sendo realizadas (YARAS et al., 2015).

Na produção de α -amilases por fungos e bactérias, o efeito da fonte de carbono na indução e repressão da enzima é muito importante como fonte de regulação da biossíntese. Amido e substâncias amiláceas têm sido descritos como os substratos mais adequados para a alta produtividade de α -amilases (MESSAOUD et al., 2004; SAXENA et al., 2007), podendo ser aproveitados resíduos agrícolas ou de processamento de amido, os quais contêm quantidades residuais de amido suficientes para esse fim (KUNAMNENI et al., 2005; DJEKIRIF-DAKHMOUCHE et al., 2006).

Quando as α -amilases são sintetizadas na presença de carboidratos contendo ligações glicosídicas do tipo α -1,4, são consideradas indutivas. A síntese dessas enzimas também pode ser constitutiva; neste caso, o micro-organismo é capaz de sintetizá-la quando a única fonte de carbono é a glicose (RAY e NANDA, 1996).

Muitas pesquisas avaliam a indução de α -amilase na presença de amido, maltose, lactose, trealose e α -metil-D-glicosídeo. Porém, o uso do amido e, ou fontes de carbono amiláceas são os principais substratos para a produção de α -amilase (GUPTA et al., 2003). Saxena et al. (2007), estudando o efeito de diferentes fontes de carbono sobre a produção de α -amilase por *Bacillus sp.* PN5, verificaram que o amido induziu fortemente a síntese da enzima enquanto que a frutose e glicose inibiram sua produção. Resultado semelhante foi encontrado por Lin et al. (1998) e Teodoro e Martins (2000) em *Bacillus sp.* e por Konsoula e Liakopoulou-Kyriakides (2007) em *Bacillus subtilis*. A secreção de amilases no meio de cultura quando o amido é utilizado como fonte de carbono vem sendo descrita em várias cepas do gênero *Bacillus*, por vários autores (CORDEIRO et al., 2002; MESSAOUD et al., 2004; AGRAWAL et al., 2005; KONSOUULA e LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES, 2007). Já em uma pesquisa realizada por Singh et al. (2012) a fonte de carbono que melhor induziu a produção de α -amilase por *Streptomyces sp.* foi D-inositol e D-sorbitol, seguidos por monossacarídeos como glicose e galactose e polissacarídeos como o amido. Resultado similar foi encontrado por Srivastava e Baruah (1986) em *Bacillus stearothermophilus*.

Fontes de nitrogênio têm sido descritas em diversas pesquisas como preferíveis as fontes de carbono na produção de α -amilase (PEDERSEN e NIELSEN, 2000; JIN et al., 2001; KUNAMNENI et al., 2005). Konsoula e Liakopoulou-Kyriakides (2007) substituíram a fonte de carbono, amido solúvel, por fontes orgânicas de nitrogênio no meio de cultivo de *Bacillus subtilis*, utilizando triptona, peptona, extrato de carne, caseína, glicina e CSL (corn steep liquor). A biossíntese de α -amilase pareceu ser independente da disponibilidade de amido no meio, a produção máxima da enzima se deu com a utilização de triptona.

Singh et al. (2012) utilizaram fontes orgânicas e inorgânicas de nitrogênio para a produção de α -amilase por *Streptomyces sp.* a utilização de peptona no meio obteve a produção máxima da enzima, seguida de sulfato de amônio e nitrato de amônio. Resultado semelhante foi obtido por Carvalho et al. (2008) na produção de α -amilase por *Bacillus sp.*

A α -amilase é uma metaloproteína que contém pelo menos um Ca^{2+} em sua estrutura, a afinidade por este íon é maior do que por qualquer outro. O cálcio não tem influência somente na atividade enzimática, mas também aumenta sua estabilidade nas trocas de temperatura e pH, deste modo, o cálcio mantém a molécula da enzima na conformação ótima para a máxima atividade e estabilidade (LÉVÊQUE et al., 2001). Pesquisas indicam que a utilização de íons cálcio tem tido êxito na atividade e estabilidade enzimática de α -amilase proveniente de várias espécies de *Bacillus* (DEMIRKAN et al., 2005; GOYAL et al., 2005; DJEKIRIF-DAKHMOUCHE et al., 2006). Konsoula e Liakopoulou-Kyriakides (2004) relataram que a termoestabilidade da enzima α -amilase foi aumentada pelos íons cálcio e magnésio.

Por outro lado, alguns estudos demonstraram que o íon Ca^{2+} não exerce influência sobre a atividade de α -amilase, e pode até ter um efeito inibitório em alguns casos, dependendo da concentração deste íon (YANG e LIU, 2004; HASHIM et al., 2005). Singh et al. (2012) testaram a atividade de α -amilase na presença de diversos íons metálicos, os cátions divalentes Mn^{2+} , Mg^{2+} e Co^{2+} estimularam a atividade da enzima, enquanto que os cátions Pb^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mo^{2+} e Ca^{2+} inibiram a atividade enzimática. Goyal et al. (2005) obtiveram bons resultados na produção de α -amilase por *Bacillus sp.* utilizando os íons Mn^{2+} , Mg^{2+} e Co^{2+} .

Diversos íons metálicos têm sido estudados visando aumentar a atividade e a estabilidade térmica de amilases (GUPTA et al., 2003). Cátions univalentes e trivalentes têm apresentado efeito inibitório na produção de α -amilase (SINGH et al., 2012). Srivastava e Baruah (1986) encontraram efeito inibitório de cátions trivalentes na produção de α -amilase por *Bacillus stearothermophilus*.

4 JUSTIFICATIVA

Tendo em vista a vasta aplicação de enzimas amilolíticas na indústria de vários segmentos, a crescente aplicação de micro-organismos como fonte de enzimas em detrimento de outras fontes, por serem mais vantajosos sob vários aspectos, e a necessidade de otimizar o processo de cultivo desses micro-organismos a fim de se obter uma maior produção enzimática, e ainda, considerando a ampla gama de micro-organismos e suas linhagens a serem estudadas, como é o caso de *Bacillus amyloliquefaciens* VR002, faz-se imprescindível o estudo da produção de α -amilase através da otimização das condições de cultivo do referido micro-organismo, visando a produção enzimática, e a caracterização da atividade da α -amilase produzida.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biotecnologia da Escola de Engenharia Industrial Metalúrgica de Volta Redonda da Universidade Federal Fluminense (EEIMVR-UFF).

5.1 MICRO-ORGANISMO E ENSAIOS ANALÍTICOS

O micro-organismo utilizado para o estudo foi *Bacillus amyloliquefaciens* VR002, previamente isolado de amostras de solo coletadas na cidade de Volta Redonda-RJ, cuja cultura se encontra no Laboratório de Biotecnologia da EEIMRV.

Para a produção de α -amilase, foi utilizado meio de cultura com a seguinte composição: 1% de amido, 0,7% de extrato de levedura, 4g/L KH_2PO_4 , 4g/L Na_2HPO_4 , 0,2g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,001g/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,004g/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ para 1.000 mL de água destilada, em pH 7. Este meio foi esterilizado em autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

O pré-inóculo foi produzido utilizando caldo nutriente, com a seguinte composição: 0,3% de extrato de carne e 0,5% de peptona de caseína para 1.000 mL de água destilada em pH 7, o qual foi esterilizado em autoclave a 121 °C durante 15 minutos e posteriormente inoculado com cultura de *B.amyloliquefaciens* VR002, armazenada em placas de petri sob refrigeração.

O meio de cultura foi inoculado, em ambiente estéril, em uma cabine de segurança biológica (Pachane - modelo PA 420) com uma cultura preparada de véspera (pré inóculo) na concentração de 2%, e incubado por 18h em uma incubadora refrigerada com agitação (Tecinal - modelo TE 424) operando a 150 rpm e sob temperatura de 35 °C. Os experimentos foram realizados em triplicata, sendo cada amostra constituída por 50 mL de meio de cultura em frascos erlenmeyer de 250 mL.

Em intervalos de tempo pré-determinados, foram retirados frascos contendo as amostras para a determinação da densidade ótica da cultura, dosagem da atividade enzimática, dosagem de açúcares redutores e valor de pH do meio de crescimento.

5.1.1 Determinação da atividade enzimática (BERNFELD, 1955)

Para a remoção das células, a cultura bacteriana foi centrifugada em Micro Centrífuga Refrigerada (NT805-Novatecnica) a 10.000 rpm por 10 minutos a 4 °C . Após a centrifugação, o sobrenadante livre de células (extrato bruto enzimático) foi utilizado para a dosagem da atividade enzimática. A atividade de α -amilase foi determinada pela quantificação de açúcares redutores seguindo o método de Bernfeld (1955) com modificações.

As amostras contendo 0,25 mL de extrato bruto enzimático e 0,5 mL de solução de amido na concentração de 1%, foram incubadas a 45 °C por 30 minutos. Após este período a reação foi paralisada pela adição de 0,75 mL do reagente de Miller (1959). A mistura, em tubos de ensaio, então foi colocada em água em ebulição por 5 minutos, e em seguida, após ser resfriada, foi adicionado ao tubo, 7 mL de água destilada. A coloração desenvolvida foi aferida em espectrofotômetro (SHIMADZU UV-mini 1800), utilizando comprimento de onda de 540 nm. O mesmo procedimento foi realizado com o controle, exceto que o reagente de Miller foi adicionado juntamente com a enzima à solução de amido 1% e esta mistura foi colocada em água em ebulição. Uma curva padrão de glicose com concentrações conhecidas foi construída medindo-se a absorvância da solução em espectrofotômetro (SHIMADZU UV-mini 1800), utilizando comprimento de onda de 540 nm, tal curva constituiu-se de aproximadamente 17 pontos, com concentrações variando entre 0,1 a 2,25 mg/mL de glicose. Uma unidade da atividade enzima (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 μ mol de açúcar redutor por minuto.

5.1.2 Quantificação de açúcar redutor (MILLER , 1959)

As amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos em temperatura de 4 °C, obtendo-se o sobrenadante livre de células. Em tubos de ensaio, foram adicionados 0,50 mL de água desilada, 0,25 mL de sobrenadante e 0,75 mL de reagente DNS, após, os tubos foram colocados em banho com água fervente por 5 minutos. Após o banho, foi adicionado 7 mL de água destilada e realizada a leitura da absorvância em espectrofotometro (SHIMADZU UV-mini 1800) com comprimento de onda de 540 nm. Uma curva padrão de glicose com concentrações conhecidas foi construída medindo-se a absorvância da solução em espectrofotômetro (SHIMADZU UV-mini 1800), utilizando comprimento de onda de 540 nm.

5.1.3 Medida do crescimento

O crescimento do micro-organismo celular foi medido por turbidimetria. A turbidez do meio foi medida em espectrofotometro (SHIMADZU UV-mini 1800) com comprimento de onda de 600 nm.

5.1.4 Medida do valor de pH

O valor de pH foi medido em pHmetro (Tecnal modelo-Tec5), logo após a cultura de micro-organismos ser retirada da incubadora tipo shaker.

5.2 EFEITO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO SOBRE A PRODUÇÃO DE α -AMILASE

Para a otimização das condições de cultivo de *Bacillus amyloliquefaciens* VR002 para a produção de α -amilase, a influência do tempo de cultivo sobre a produção da enzima foi avaliada cultivando-se o micro-organismo nos tempos de 12, 24, 36 e 48 horas nas condições descritas no item 5.1

A influência da concentração de amido solúvel, como fonte de carbono, foi avaliada cultivando-se o micro-organismo em diferentes percentuais de amido (0,5; 1,0 e 1,5%).

O efeito da temperatura de crescimento do micro-organismo sobre a produção de α -amilase foi avaliado cultivando-se o micro-organismo em diferentes temperaturas: 30, 35, 40 e 45 °C.

O efeito do pH inicial no meio de cultura sobre a produção da enzima foi determinada cultivando-se o micro-organismo com valores de pH inicial de 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 e 8,0. Os valores do meio foram ajustados com HCl na concentração de 1 M e NaOH na concentração de 1 M.

A influência de diferentes fontes de nitrogênio no crescimento do micro-organismo e na produção de α -amilase foi avaliada substituindo-se o extrato de levedura do meio de cultura (0,7%), por outras fontes de nitrogênio, a saber: extrato de levedura, peptona de carne, extrato de carne, caseína, peptona de caseína, gelatina em pó e sulfato de amônio acrescidos individualmente no meio de cultivo na concentração de 1% cada. Após a obtenção da melhor

fonte de nitrogênio, foi avaliada a melhor concentração da fonte de nitrogênio, avaliando-se os percentuais de 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 e 3,0%.

A influência de diferentes fontes de carbono no crescimento do micro-organismo e na produção de α -amilase foi investigada substituindo-se o amido solúvel do meio de cultura por: glicose, sacarose, frutose, lactose, maltose, amido de trigo, amido de milho e fécula de batata. As soluções de açúcares foram esterilizadas separadamente em autoclave e adicionadas ao meio de cultura individualmente na concentração de 1% cada, de forma asséptica em cabine de segurança biológica (Pachane, modelo PA 420).

A influência na produção de α -amilase da concentração de pré-inóculo utilizado para inocular o meio de cultura foi determinado através do emprego de diferentes concentrações de pré-inóculo, desta forma, foram adicionados ao meio de cultura 1, 2, 3, 4, 5, 7 e 10% de pré-inóculo. O meio de cultura contendo os micro-organismos foi crescido nas condições de cultivo otimizadas e a produção de α -amilase foi analisada de acordo com item 5.1.1.

5.3 CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA α -AMILASE

Para a caracterização da enzima produzida, α -amilase, foram analisadas as variáveis como, temperatura de incubação, pH, concentração de substrato, concentração de extrato bruto enzimático e tempo de incubação. Foram também analisados os efeitos de íons metálicos, detergentes e inibidores sobre a atividade enzimática.

O efeito da temperatura na atividade da enzima foi determinado incubando-se a mistura de reação (0,25 mL de extrato bruto enzimático + 0,5 mL de solução de amido) nas temperaturas de 35, 40, 45, 50 e 55 °C. Após 30 minutos de incubação em cada temperatura, a atividade enzimática foi determinada nas condições padrão, descritas no item 5.1.1.

O efeito do pH na atividade de α -amilase foi avaliado na faixa de 5,5 a 8,0 com intervalos de 0,5 unidade. As soluções tamponantes utilizadas foram: Citrato-ácido cítrico para as faixas de 5,5; 6,0 e 6,5 e Tris-HCl para as faixas de pH de 7,0; 7,5 e 8,0. O pH ótimo foi determinado preparando-se o substrato (amido) nas soluções tampão com os diferentes valores de pH e incubando-se o mesmo com 0,25 mL de extrato bruto enzimático em banho-maria a 45 °C por 30 minutos. Após 30 minutos de incubação, a atividade enzimática foi determinada nas condições padrão, conforme item 5.1.1.

O efeito de diferentes concentrações de substrato, amido solúvel, no meio reacional sobre a atividade enzimática foi determinado avaliando-se as concentrações de 0,2; 0,5; 0,7; 1,0 e 1,5% de amido. A atividade enzimática foi determinada nas condições do item 5.1.1

O efeito de diferentes concentrações de extrato bruto enzimático, na mistura de reação, sobre a atividade enzimática foi determinado avaliando-se o efeito das concentrações nos valores de 0,1; 0,15; 0,20 e 0,25 mL. A atividade enzimática foi determinada nas condições do item 5.1.1.

O efeito do tempo de incubação sobre a atividade enzimática foi avaliado incubando-se o meio reacional nos tempos de 5, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 minutos em banho-maria. A atividade enzimática foi determinada nas condições do item 5.1.1.

O efeito de diferentes íons metálicos sobre a atividade da enzima foi avaliado, para tanto, o extrato bruto enzimático foi pré-incubado à temperatura de 4 °C por 10 minutos na presença de íons Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ e Co^{2+} na forma de cloretos e Zn^{2+} e Cu^{2+} na forma de sulfatos, individualmente, de maneira que a concentração final dos íons fosse de 1, 5 e 10 mM. Após o período de pré-incubação, foi adicionado à mistura 0,5 mL do substrato (solução de amido 1,5%) e, o meio reacional foi incubado por 5 minutos a 45 °C. A atividade enzimática foi determinada de acordo com o item 5.1.1 e expressa em percentual.

O efeito de inibidores e detergentes sobre a atividade enzimática também foi avaliado, para tanto, o extrato bruto enzimático foi pré-incubado à 4 °C por 10 minutos na presença de SDS (dodecil sulfato de sódio), EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético), PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonil), DTT (ditiotreitól), Benzamidina, TRITON X100, TWEEN 20 e TWEEN 80, individualmente, nas concentrações finais de 1 e 5 mM. Após o período de pré-incubação foi adicionado à mistura, 0,5 mL de substrato (solução de amido 1,5%). O meio reacional foi incubado por 5 minutos a 45 °C. A atividade residual foi determinada de acordo com o item 5.1.1 e expressa em percentual.

5.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos nos experimentos foram analisados através do programa estatístico SISVAR[®] (FERREIRA, 2000) com análise de variância e comparação de médias pelo teste de Scott-Knott com grau de significância de 5% em delineamento inteiramente casualizado em esquema experimental fatorial, com três repetições.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

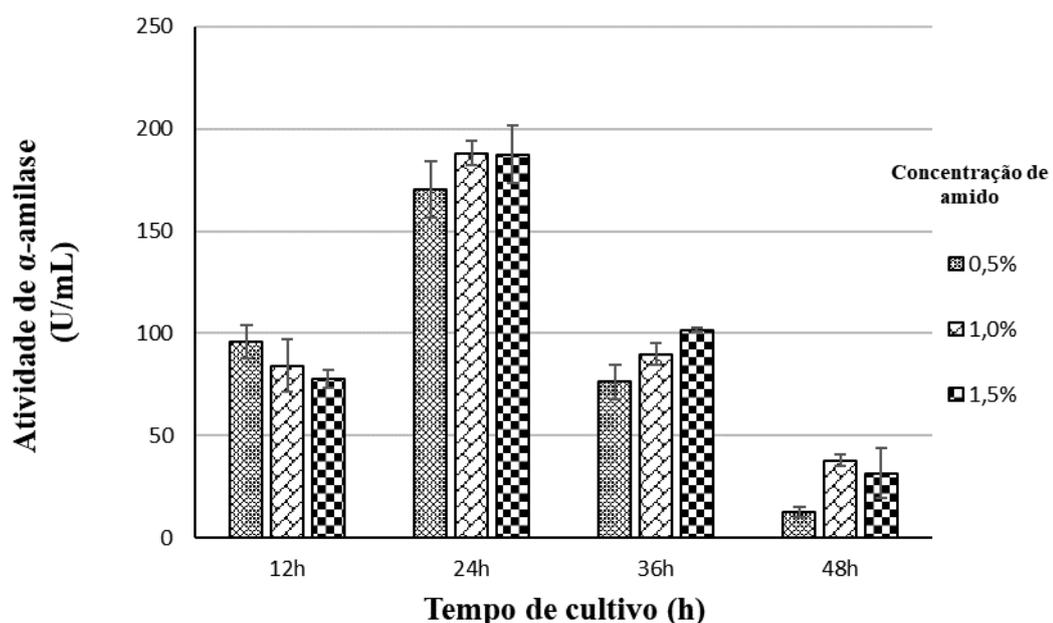
6.1 EFEITO DO TEMPO DE CULTIVO E DA CONCENTRAÇÃO DE AMIDO NO MEIO DE CULTURA, SOBRE A PRODUÇÃO DE α -AMILASE

Na produção de amilases por fungos e bactérias, o amido, como fonte de carbono, tem sido descrito como o substrato mais adequado para a alta produtividade da enzima (SAXENA et al., 2007), sua oferta no meio de cultivo favorece a síntese de amilases.

A fim de se verificar a melhor concentração de amido no meio de cultura e o melhor tempo de cultivo para a produção de α -amilase, a cepa *B. amyloliquefaciens* VR002 foi crescida a temperatura de 35 °C e 150 rpm, nos tempos de 12, 24, 36 e 48h em meio de cultura contendo amido solúvel, como fonte de carbono, nas concentrações de 0,5; 1,0 e 1,5%.

As análises para a determinação de atividade enzimática foram realizadas em triplicata e os resultados estão apresentados pela média dos valores obtidos, conforme consta na Figura 4.

Figura 4. Atividade de α -amilase de *B. amyloliquefaciens* VR002 cultivado em meio de cultura contendo diferentes concentrações (%) de amido solúvel. Micro-organismo crescido a 35 °C e 150 rpm, em diferentes tempos de cultivo. As barras representam o desvio padrão.



De acordo com os resultados obtidos, foi realizada a análise de variância do efeito do tempo de incubação e a concentração de amido no meio de cultivo sobre a produção da enzima evidenciando que houve efeito significativo nas variáveis tempo de cultivo e concentração de amido, bem como houve efeito significativo na interação dessas duas variáveis indicando que a produção de α -amilase depende da interação da concentração do amido solúvel no meio de cultura e do tempo de cultivo. O coeficiente de variação (CV) foi de 9,09%, de acordo com PIMENTEL (2000), quanto menor for o coeficiente de variação, maior o grau de precisão dos resultados. A análise de variância está descrita em Anexo, Tabela 2.

De acordo com a Figura 4, todas as concentrações de amido no meio de cultura no tempo de cultivo de 24h são estatisticamente superiores às demais concentrações de amido nos tempos de 12, 36 e 48h. Entre as concentrações de amido no tempo de 24h de cultivo, 1,0 e 1,5% foram estatisticamente iguais e superiores à concentração de 0,5%.

Assim, o tempo ótimo de cultivo encontrado para a produção de α -amilase por *B. amyloliquefaciens* VR002 foi o de 24h e por não haver efeito significativo entre as concentrações de 1,0 e 1,5% de amido no meio de cultura para a produção da enzima, a concentração de 1% foi mantida, tendo em vista a redução tanto de custos financeiros quanto do uso de recursos naturais.

O aumento da disponibilidade de amido no meio de cultivo de 1,0 para 1,5% não foi fator relevante para a biosíntese de α -amilase.

Carvalho et al. (2008) encontraram resultados diferentes para a produção de α -amilase por *Bacillus sp.* SMIA-2, a melhor concentração de amido no meio de cultura foi de 0,25%, quando se aumentou o percentual para 0,5 e 1,0%, houve decréscimo significativo na atividade da enzima, neste mesmo trabalho o tempo de cultivo ótimo foi de 32h, sendo que a produção da enzima teve início na fase exponencial se mantendo durante a fase estacionária, após 36h de cultivo houve queda na produção da enzima.

Haq et al. (2003) encontraram uma maior produção de α -amilase por *Bacillus licheniformis* GCBU-8 no tempo de cultivo de 48h em um meio suplementado com farelo de trigo e amido de milho. Singh et al. (2012) também encontraram tempo de cultivo ótimo de 48h na produção de α -amilase por *Streptomyces sp.*, já Sennur et al. (2016) encontraram o tempo ótimo de cultivo de 72h para *Geobacillus sp.* na produção de α -amilase em meio de cultura contendo 1,0% de amido, e similar ao presente trabalho, quando o amido foi acrescentado ao meio em menores concentrações, 0,5 e 0,2%, a produção de α -amilase decresceu.

Foi analisada a concentração de açúcares redutores, Figura 5, presente no sobrenadante da cultura, resultado da hidrólise do amido realizada pela α -amilase. A conversão do amido em dissacarídeos e monossacarídeos reflete o consumo energético pelo micro-organismo, deste modo, quanto menor a concentração de açúcares redutores, maior foi o consumo de substrato pelo micro-organismo.

Foi analisado o crescimento do micro-organismo, a cada 12 horas, durante 48 horas de cultivo, os resultados estão apresentados na Figura 6.

Figura 5. Concentração de açúcares redutores presente no sobrenadante da cultura. Micro-organismo crescido a 35 °C e 150 rpm. As barras representam o desvio padrão.

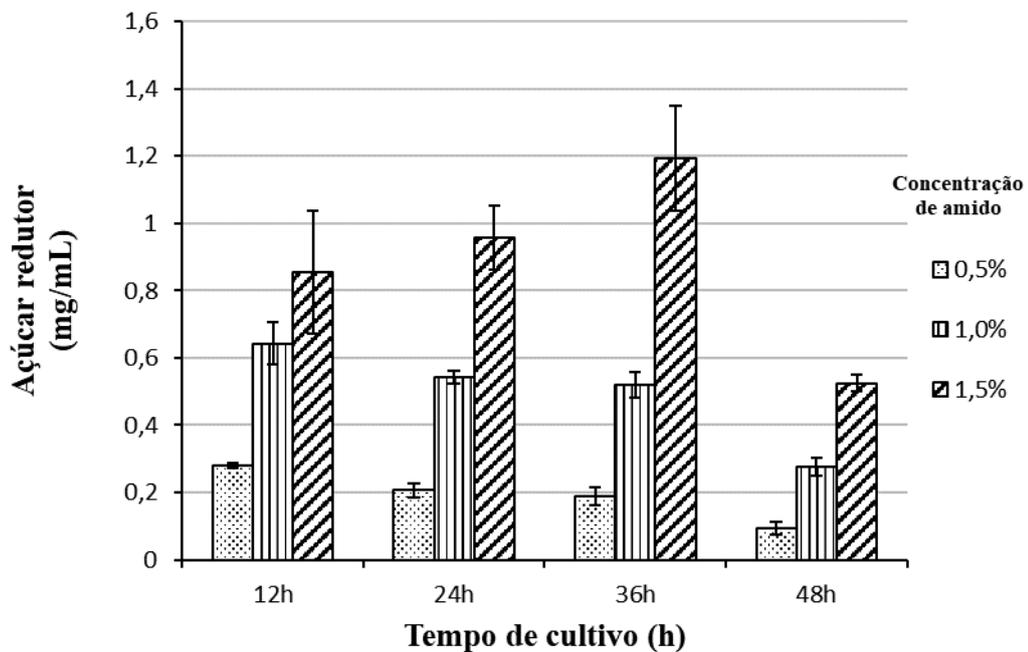
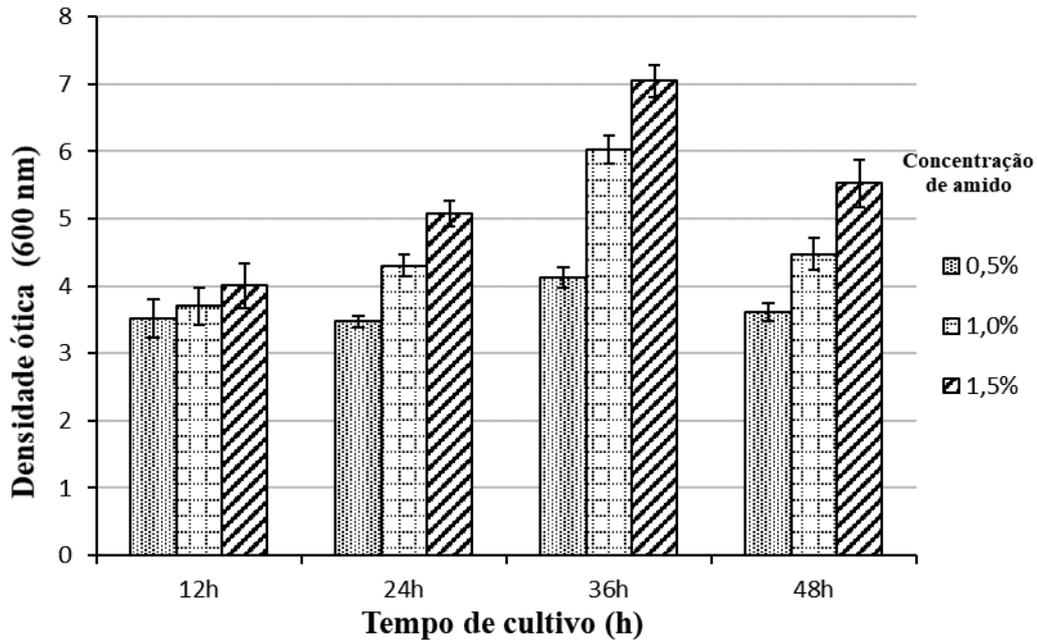


Figura 6. Crescimento de *B. amyloliquefaciens* VR002 em diferentes tempos de cultivo e diferentes concentrações de amido no meio de cultura. As barras representam o desvio padrão.



De acordo com a Figura 5, as menores concentrações de açúcares redutores ocorreram no meio de cultura contendo 0,5% de amido, pode-se observar que ao longo da fermentação o consumo foi aumentando gradualmente, os organismos crescidos neste meio de cultura obtiveram o menor crescimento, conforme a Figura 6, e apesar de terem registrado a menor produção de α -amilase, sua produção foi bem próxima à produção de micro-organismos crescidos em meio de cultura contendo maiores concentrações de amido, como demonstra a Figura 4. A menor produção da enzima e o baixo crescimento do micro-organismo podem ter sido afetados pela baixa oferta de substrato.

De um modo geral, observa-se que houve diminuição gradual de açúcares redutores ao longo do tempo. Após 48h de cultivo o micro-organismo já estava na fase de declínio, Figura 6, tempo no qual também se observa a menor produção de enzima, Figura 4.

A maior concentração de açúcar redutor presente no sobrenadante encontra-se as 36h de cultivo, nos meio de cultura contendo 1,5% de amido, coincidindo com o maior crescimento do micro-organismo e também a baixa produção de α -amilase.

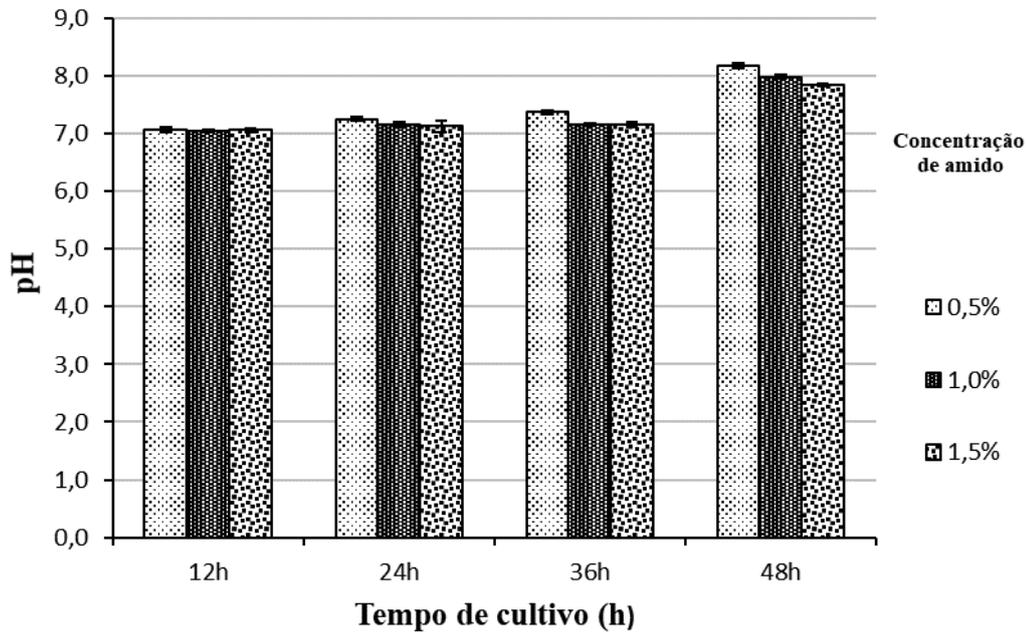
De acordo com a Figura 6, foi identificado o crescimento máximo de *B. amyloliquefaciens* VR002 no tempo de cultivo de 36h, após esse período, a cultura entra na fase estacionária por um curto período e rapidamente entra em declínio. Pode-se observar que

durante a fase exponencial houve a máxima produção de α -amilase, no tempo de 24h, e ao final da fase exponencial a produção da enzima caiu drasticamente, Figura 4.

A síntese de α -amilase por micro-organismos do gênero *Bacillus sp.*, de maneira geral, ocorre de duas formas dependendo das condições de cultivo e do micro-organismo utilizado. Na primeira, a síntese da enzima acompanha o crescimento microbiano e diminui a velocidade de síntese à medida que a cultura entra na fase estacionária (STEPHENSON et al., 1998). Na segunda, a formação da enzima é lenta durante a fase logarítmica de crescimento seguida de um aumento da velocidade de síntese à medida que a velocidade de crescimento diminui e atinge a fase estacionária (HAMILTON et al., 1999). Os resultados encontrados nesta primeira análise estão de acordo com o primeiro caso, onde a síntese da enzima acompanha o crescimento do micro-organismo e diminui à medida que a cultura entra na fase estacionária, dando indícios de que a enzima α -amilase é um metabólito primário.

Quando íons de amônio estão sendo utilizados o meio de cultivo se torna mais ácido, no sentido oposto, quando nitrogênio orgânico está sendo assimilado, o meio se torna mais alcalino, assim, a variação de pH pode fornecer informações sobre a síntese de α -amilase, pois a utilização de compostos nitrogenados no meio está relacionada com a sua síntese (CHU et al., 1992). Porém de acordo com a Figura 7, o pH dos meios de cultura contendo diferentes concentrações de amido no tempo de 24h, onde também ocorreu a maior produção de α -amilase, durante a fase log, variou discretamente, ficando próximo da neutralidade. O pH se manteve próximo à neutralidade nas primeiras 36h de cultivo, aumentando de pH 7 para pH 8 no tempo de cultivo de 48h, onde se observou a menor produção da enzima coincidindo com a fase de declínio do micro-organismo, indo de encontro ao exposto por Chu et al. (1992). Neste experimento observou-se uma relação entre a atividade enzimática máxima em pH neutro, em torno de 7 durante a fase exponencial, e a queda na atividade enzimática em pH mais alcalino entrando na fase de declínio. Os valores de pH podem ser verificados através da Figura 7.

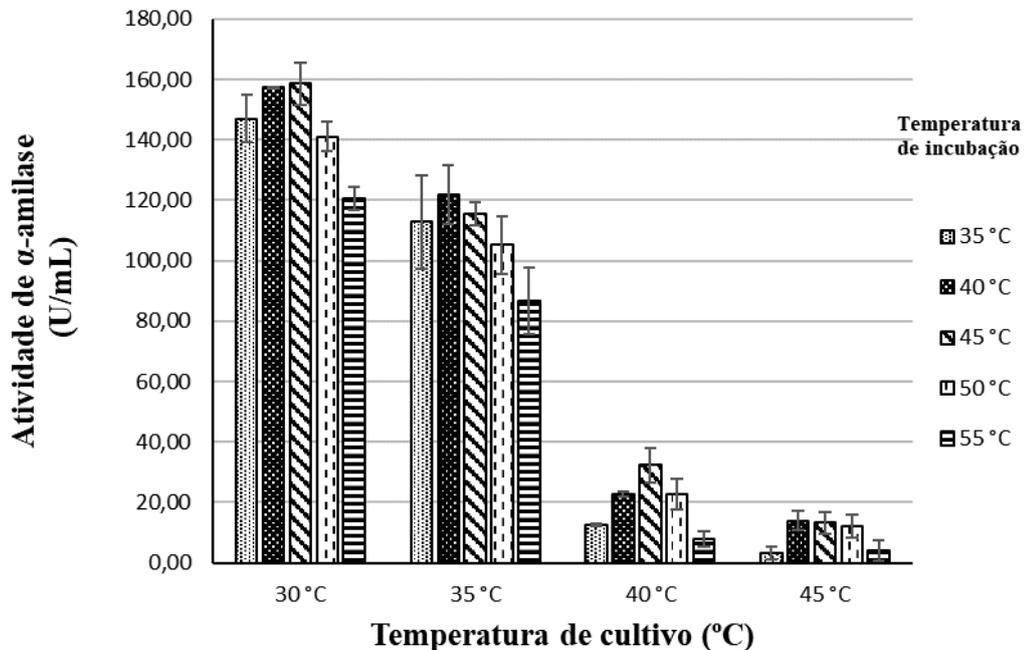
Figura 7. Valores de pH da cultura após 12, 24, 36 e 48h de crescimento em meio de cultura contendo diferentes concentrações de amido. As barras representam o desvio padrão.



6.2 EFEITO DA TEMPERATURA DE CULTIVO SOBRE A PRODUÇÃO DE α -AMILASE E DA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO DA ENZIMA SOBRE A ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A análise para avaliar o efeito da temperatura de cultivo de *Bacillus amyloliquefaciens* VR002 para a produção de α -amilase foi realizada conjugada com a análise para avaliar o efeito da temperatura de incubação sobre a atividade da enzima. As análises foram realizadas em triplicata e os resultados estão representados na Figura 8. Para a definição da temperatura ótima de cultivo do micro-organismo visando a melhor produção da enzima α -amilase, cultivou-se o micro-organismo nas temperaturas de 30, 35, 40 e 45 °C pelo período de 24h a 150 rpm. Para a definição da melhor temperatura de incubação, do meio reacional contendo o extrato bruto enzimático, o meio reacional foi incubado nas temperaturas de 35, 40, 45, 50 e 55 °C.

Figura 8. Atividade de α -amilase de *B. amyloliquefaciens* VR002 cultivado em meio contendo 1,0% de amido solúvel, em diferentes temperaturas de cultivo por 24h a 150 rpm. Diferentes temperaturas de incubação da enzima estão demonstradas na legenda lateral. As barras representam o desvio padrão.



Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância para verificar o efeito da temperatura de cultivo sobre a produção da enzima e da temperatura de incubação do extrato bruto enzimático sobre a atividade enzimática, demonstrando que houve efeito significativo das variáveis temperatura de incubação e temperatura de cultivo e houve efeito significativo na interação dessas duas variáveis, procedendo-se ao desdobramento da interação para avaliar a atividade enzimática dentro de cada fator. A análise de variância está descrita em Anexo, Tabela 3.

De acordo com a Figura 8, a produção de α -amilase nas temperaturas de cultivo de 40 e 45 °C foi baixa para todas as temperaturas de incubação da enzima. Considerando como parâmetro a maior média obtida na temperatura de cultivo de 30 °C, houve quedas de aproximadamente 24% considerando a maior média obtida na temperatura de cultivo 35 °C, 80% considerando a maior média obtida na temperatura de cultivo de 40 °C e de 92% considerando a maior média obtida na temperatura de cultivo de 45 °C.

Quando o micro-organismo foi crescido na temperatura de 30 °C, observou-se que as temperaturas de incubação de 40 e 45 °C foram estatisticamente iguais e superiores as demais.

Quando o micro-organismo foi crescido na temperatura de 35 °C, as temperaturas de incubação da enzima de 35, 40 e 45 °C foram estatisticamente iguais e superiores as demais. Desta forma, pode-se concluir que a melhor temperatura de cultivo do micro-organismo para a produção da enzima é a de 30 °C e as temperaturas de 40 e 45 °C para a incubação da enzima não diferem estatisticamente entre si.

A influência da temperatura de cultivo na produção de amilases tem sido relacionada com o crescimento dos micro-organismos, a faixa entre 35 e 80 °C tem sido descrita para o crescimento ótimo de bactérias e produção de α -amilase (LIN et al., 1998). Contudo nem sempre o crescimento do micro-organismo é diretamente proporcional à secreção de enzimas, micro-organismos podem possuir uma temperatura ótima de crescimento e outra temperatura ótima de produção de enzima (PANDEY et al., 2000; BURHAN et al., 2003).

No presente estudo, a produção máxima da enzima por *B. amyloliquefaciens* VR002 ocorreu na temperatura de 30 °C de cultivo em 24h de crescimento, a medida que a temperatura de cultivo foi aumentando a produção da enzima foi decaindo gradualmente, conforme observado na Figura 8.

Asgher et al. (2007) relataram que houve atividade enzimática satisfatória de α -amilase produzida por *Bacillus subtilis* nas temperaturas de cultivo nas faixa de 30 à 50 °C, porém a atividade máxima se deu com a temperatura de cultivo de 50 °C, em temperaturas superiores, a atividade enzimática foi reduzida. Resultado semelhante foi descrito por Carvalho et al. (2008) na produção de α -amilase por *Bacillus sp.* que atingiu atividade enzimática ótima na temperatura de cultivo de 50 °C em 24h de crescimento, assim como Teodoro e Martins (2000) que identificaram a temperatura ótima de cultivo de 50 °C. Singh et al. (2011) também encontraram a temperatura de cultivo ótimo de 50 °C na produção de α -amilase por *Streptomyces sp.*

Saxena et al. (2007) investigando a produção de α -amilase por *Bacillus sp.* identificaram a produção da enzima numa faixa de temperatura entre 30 e 70 °C, sendo a temperatura de 60 °C ótima para produção de α -amilase. Entretanto, Konsula e Liakopoulou-Kyriakides (2004) encontraram a temperatura de 40 °C como ótima para a produção de α -amilase por *B. subtilis*.

Sennur et al. (2016) estudando a produção de α -amilase por *Geobacillus sp.* identificaram a temperatura de 55 °C como ótima para a produção da enzima.

Em contraste com os resultados de outros autores, a temperatura ótima encontrada neste trabalho para a produção de α -amilase foi de 30 °C.

Alfa amilases termoestáveis possuem grande aplicação em processos industriais, verificando a temperatura ótima de incubação da enzima produzida por *B. amyloliquefaciens* VR002, no presente trabalho, a temperatura ótima ficou entre 40 e 45 °C, e considerando as temperaturas ótimas de incubação, quando a enzima foi incubada na temperatura de 35 °C, a atividade enzimática caiu cerca de 7%, em temperaturas mais altas houve queda de aproximadamente 11 e 24% na atividade, nas temperaturas de incubação de 50 e 55 °C, respectivamente.

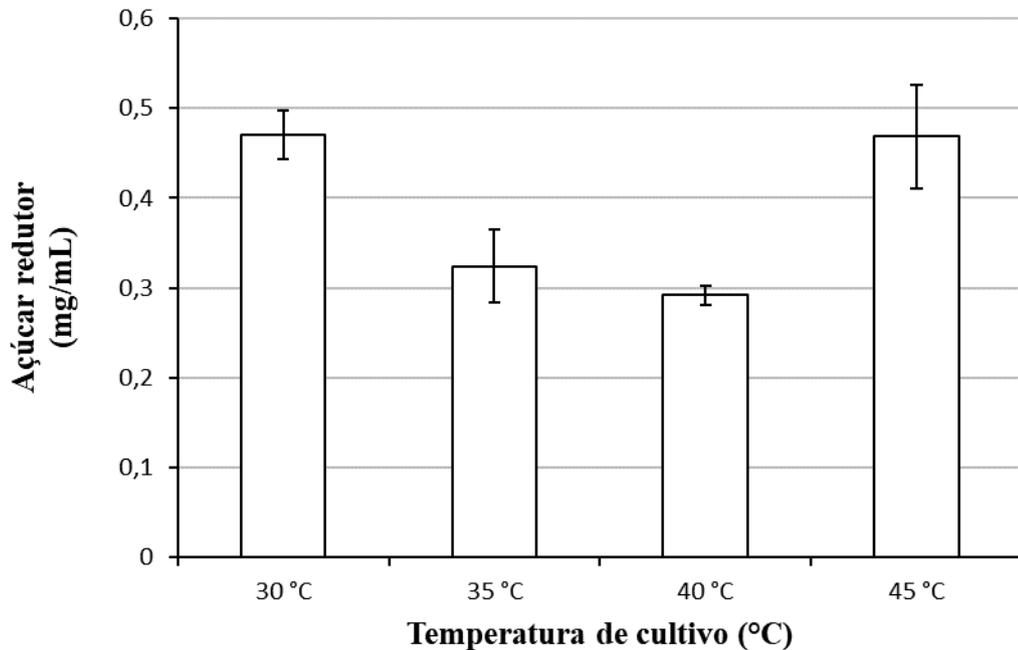
Deb et al. (2013) encontraram a temperatura ótima de incubação de α -amilase produzida por *Bacillus amyloliquefaciens*, de 60 °C, resultado semelhante foi alcançado por Sennur et al. (2016) que estudando a produção de α -amilase por *Geobacillus sp.* obtiveram a máxima atividade da enzima quando a mesma foi incubada em temperatura de 65 °C.

Teodoro e Martins (2000) encontraram a temperatura ótima de incubação de α -amilase produzida por *Bacillus sp.* de 50 °C, resultado semelhante foi descrito por Sharma et al. (2014) que encontraram a temperatura ótima de incubação de 50 °C para α -amilase de *Bacillus sp.*

Goyal et al. (2005) encontraram a temperatura ótima de incubação de 70 °C para α -amilase de *Bacillus sp.*

Foi analisada a concentração de açúcares redutores presente no sobrenadante da cultura, como resultado da hidrólise do amido realizada por α -amilase. De acordo com a Figura 9, a maior concentração de açúcares redutores presente no sobrenadante encontra-se nas temperaturas de cultivo de 30 e 45 °C, indicando maior quantidade de amido degradado, nessas temperaturas de cultivo.

Figura 9. Concentração de açúcares redutores presente no sobrenadante da cultura. Micro-organismo crescido em diferentes temperaturas de cultivo por 24h a 150 rpm em meio de cultura contendo 1,0% de amido. As barras representam o desvio padrão.



De acordo com a Figura 10, obteve-se um baixo crescimento de *B.amyloliquefaciens* VR002 quando o micro-organismo foi cultivado a 30 °C, em relação aos micro-organismos cultivados na temperatura de 35 °C e um crescimento similar com os micro-organismos cultivados a 40 °C, porém na temperatura de cultivo de 30 °C, se obteve a maior produção de α -amilase e uma maior concentração de açúcar redutor, dando indícios de que a temperatura ótima para o crescimento do micro-organismo não é a mesma para a produção da enzima, destaca-se que nem sempre a temperatura ótima de crescimento de micro-organismos é a mesma para a produção da enzima, de acordo com Burhan et al. (2003).

Um maior crescimento do micro-organismo foi observado na temperatura de cultivo de 35 °C, a produção de α -amilase nesta temperatura foi maior do que nas temperaturas de cultivo de 40 e 45 °C e menor do que na temperatura de 30 °C bem como a concentração de açúcar redutor encontrava-se ligeiramente mais baixa, indicando maior gasto energético.

A Figura 11 demonstra os valores de pH encontrados no meio de cultura após 24h de cultivo e em diferentes temperaturas. Observa-se que o valor de pH dos meios de cultura, não variou significativamente. No experimento anterior, a atividade enzimática máxima foi alcançada quando o pH do meio de cultura se encontrava em torno de 7, acompanhando a fase

exponencial do micro-organismo, em pH na faixa de 8, tanto a produção de α -amilase quanto a concentração de micro-organismos foram menores. Neste experimento observou-se um padrão de comportamento do micro-organismo e a produção de enzima semelhante ao experimento anterior, item 6.1.

Figura 10. Crescimento de *B. amyloliquefaciens* VR002, após 24h, em diferentes temperaturas de cultivo em meio de cultura contendo 1,0% de amido. As barras representam o desvio padrão.

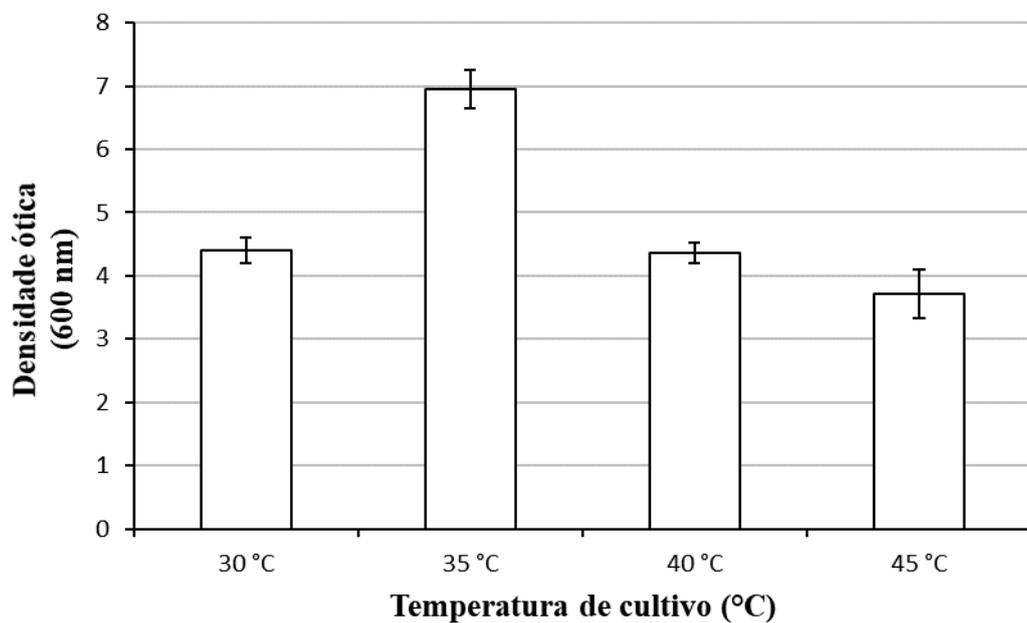
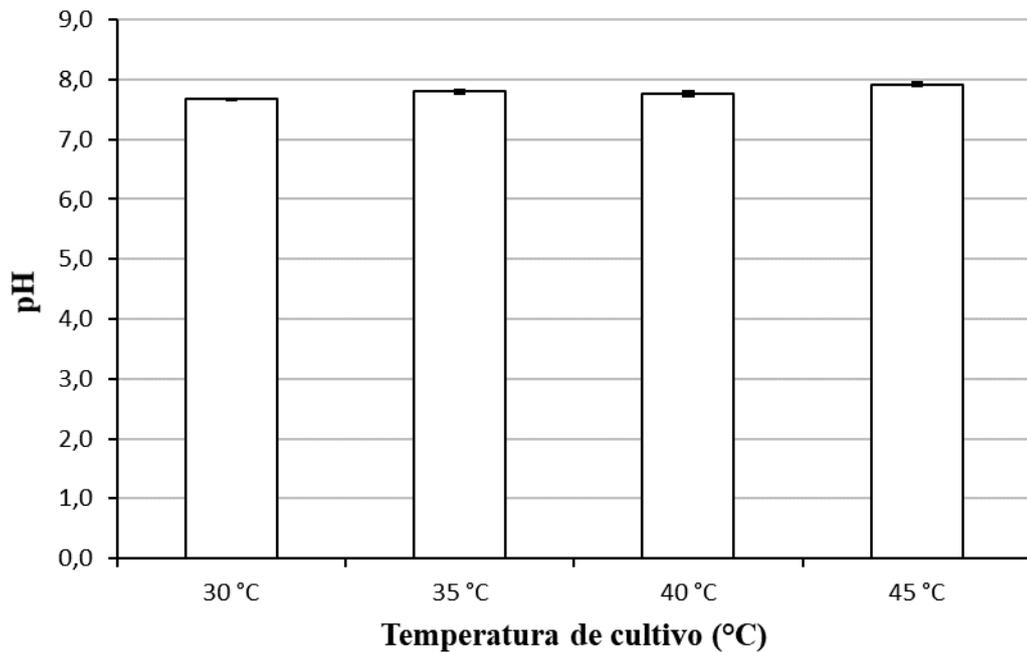


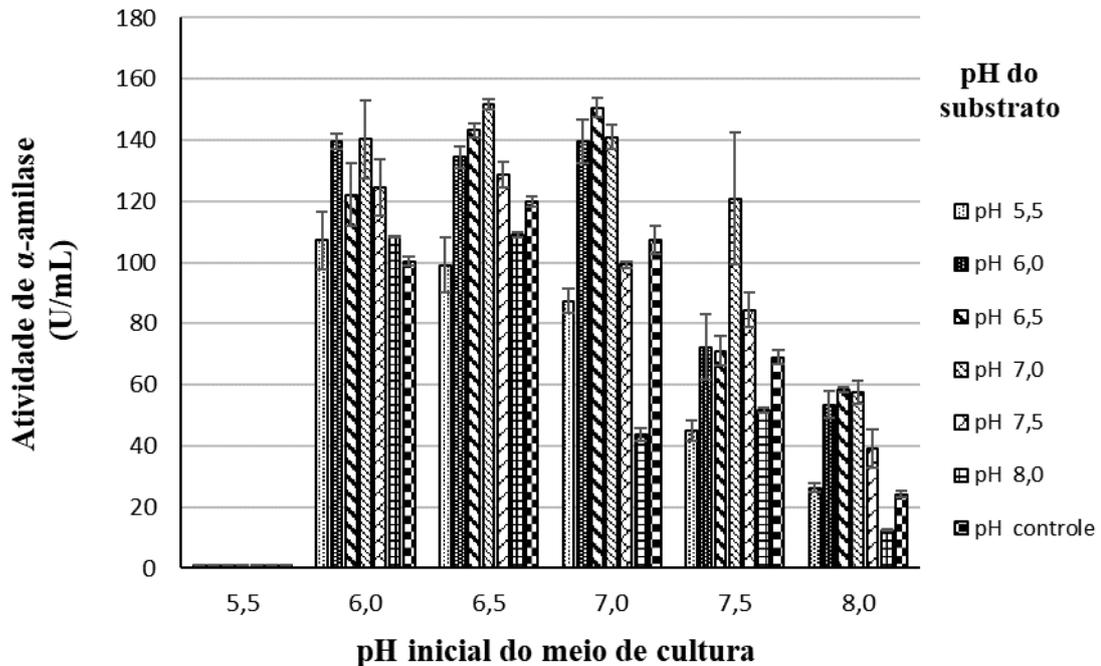
Figura 11. Valor de pH do meio de cultura após 24h de crescimento de *B.amyloliquefaciens* VR002 em diferentes temperaturas de cultivo. As barras representam o desvio padrão.



6.3 EFEITO DO pH INICIAL DO MEIO DE CULTURA E pH DO SUBSTRATO SOBRE A PRODUÇÃO E ATIVIDADE DE α -AMILASE DE *B. amyloliquefaciens*

O experimento para determinar o pH inicial ótimo do meio de cultura para a produção de α -amilase foi realizado conjugado com o experimento para determinar o pH ótimo de incubação para a atividade da enzima. Para determinar o melhor pH inicial do meio de cultura foram testados os valores de pH de 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 e 8,0, esses valores foram ajustados com HCl 1 M e NaOH 1 M. Para determinar o valor de pH ótimo de incubação de α -amilase foram testados os valores na faixa de 5,5 a 8,0 com intervalos de 0,5 unidade, foram utilizados os tampões Citrato-ácido cítrico para as faixas de 5,5; 6,0 e 6,5 e Tris-HCl para as faixas de pH de 7,0; 7,5 e 8,0. Os resultados obtidos estão representados na Figura 12.

Figura 12. Atividade de α -amilase de *B. amyloliquefaciens* VR002 cultivado em diferentes valores de pH inicial do meio de cultura. Enzima incubada em diferentes valores de pH do meio reacional. Micro-organismo cultivado por 24h, a 30 °C e 150 rpm. As barras representam o desvio padrão.



De acordo com a Figura 12 pode-se observar que quando o micro-organismo foi cultivado em pH inicial de 5,5 não houve produção da enzima, no entanto, houve produção de α -amilase pelo micro-organismo nas faixas de pH inicial de 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 e 8,0 observando-se maior produção de enzima nas faixa de pH 6,0; 6,5 e 7,0. Foi realizada análise de variância para avaliar o efeito do pH inicial do meio de cultura e do pH de incubação da enzima sobre a produção e atividade enzimática, indicando que houve efeito significativo das variáveis pH inicial do meio de cultura e pH de incubação da enzima. Houve efeito significativo na interação das variáveis analisadas, desta forma, procedeu-se ao desdobramento da interação para avaliar a atividade enzimática dentro de cada fator. A análise de variância está descrita em Anexo, Tabela 4.

Observa-se na Figura 12 que a produção de α -amilase por *B. amyloliquefaciens* VR002 nos meios de cultura com valores de pH inicial de 7,5 e 8,0 foi estatisticamente inferior à produção da enzima nas culturas contendo os demais valores de pH inicial, de acordo com a análise estatística pode-se concluir que o pH inicial ótimo do meio de cultura foi de 6,5 enquanto que o pH ótimo de incubação da enzima foi de 7,0.

A alteração de pH observada durante o crescimento dos micro-organismos também afeta a estabilidade de produtos do meio. Diversas cepas de *Bacillus sp.* utilizadas industrialmente para a produção de α -amilases possuem valor de pH ótimo entre 6,0 e 7,0 tanto para o crescimento quanto para a produção de enzima (GUPTA et al., 2003).

Neste trabalho verifica-se, de um modo geral, que conforme o valor de pH inicial do meio de cultura aumentou, a produção de enzimas diminuiu, considerando o pH inicial 6,5, quando o pH inicial foi 7, a produção enzimática caiu aproximadamente 7%, no pH inicial 7,5 houve queda de aproximadamente 21% e no pH inicial de 8, houve queda de aproximadamente 62%. Neste sentido, a faixa de pH 6,5 favoreceu a produção de α -amilase por *B. amyloliquefaciens* VR002.

Resultado semelhante foi encontrado por Teodoro e Martins (2000), para a produção de α -amilase por *Bacillus sp.*, o pH inicial ótimo foi de 7,0, neste mesmo estudo, foi relatado que quando o pH inicial foi ajustado para 4,0; 5,0; 6,0 e 10 não houve o crescimento do micro-organismo, contudo no presente trabalho verificou-se que no pH inicial de 5,5 não foi detectada atividade enzimática, porém houve crescimento do micro-organismo, Figura 14, já no meio com valor de pH 8, observou-se tanto um crescimento menor de *B. amyloliquefaciens* VR002, Figura 14, quanto baixa produção de enzimas, Figura 12.

Sennur et al. (2016) estudando a produção de α -amilase por *Geobacillus sp.* identificou pH inicial de 7,0, como ótimo.

Considerando a importância, para processos industriais, de enzimas que atuam em uma ampla faixa de pH, a atividade da enzima em diferentes valores de pH foi investigada, conforme descrito no item 5.3. No presente trabalho, a faixa de pH 7,0 de incubação da enzima foi identificada como ótima para a maior atividade de α -amilase produzida por *B. amyloliquefaciens* VR002. Houve redução na atividade enzimática de aproximadamente 15% quando a enzima foi incubada em meio com pH 7,5 e redução de aproximadamente 28% quando incubada em meio com pH 8,0.

Resultado semelhante foi encontrado por Goyal et al. (2005) na incubação de α -amilase, produzida por *Bacillus sp.*, em meio reacional com valor de pH 7,0.

Sodhi et al. (2005) e Deb et al. (2013) identificaram o valor de pH 6,5 como ótimo para a incubação de α -amilase de *Bacillus sp.*

Teodoro e Martins (2000), estudando a produção de α -amilase por *Bacillus sp.*, identificaram o pH ótimo de incubação da enzima entre 6,0 e 6,5 resgistrando queda de aproximadamente 73% na atividade enzimática nos pH 8,5 e 9,0 de incubação.

Sennur et al. (2016) estudando a produção de α -amilase por *Geobacillus sp.* identificaram que o pH 9,0 foi o mais adequado para a incubação da enzima.

De acordo com a Figura 13, a maior concentração de açúcares redutores presente no sobrenadante encontra-se quando o micro-organismo é cultivado em pH inicial de 8,0. Porém em todas as amostras cultivadas em diferentes valores de pH inicial, a concentração de açúcar redutor não varia substancialmente, dando indícios de que embora o pH inicial do meio tenha inibido a produção de enzimas, verificado na análise de 24h de cultivo, o micro-organismo foi capaz de sintetizar a enzima e hidrolisar o amido.

Foi identificado o crescimento máximo de *B.amyloliquefaciens* VR002 em meio contendo pH inicial de 6,5, conforme Figura 14, coincidindo com o pH inicial ótimo encontrado para a atividade de α -amilase. O meio de cultura com pH inicial 6,5 favoreceu tanto o crescimento do micro-organismo, quanto a produção de enzimas.

O menor crescimento de *B. amyloliquefaciens* VR002 foi detectado nos meios de cultura com pH inicial de 7,0; 7,5 e 8,0, conforme Figura 14.

A Figura 15 demonstra os valores de pH encontrados no meio de cultura após 24h de cultivo. Conforme Figura 15, observa-se uma pequena variação no valor de pH, após 24h de cultivo, sendo que os meios de cultura com valores de pH inicial de 6,0; 6,5 e 7,0 correspondem a maior produção de α -amilase, conforme se verifica na Figura 11.

Embora não tenha sido detectada atividade de α -amilase, conforme demonstra a Figura 12, para o meio de cultura com pH inicial no valor de 5,5, de acordo com a Figura 13, foi detectada concentração de açúcar redutor similar aos demais meios de cultura, bem como o crescimento do micro-organismo, Figura 14. Desta forma, verifica-se que houve o crescimento do micro-organismo e a produção de α -amilase, porém pode ter ocorrido a desnaturação da enzima por motivo desconhecido, motivo pelo qual não foi detectada atividade enzimática após 24h de cultivo do micro-organismo.

Figura 13. Concentração de açúcares redutores presente no sobrenadante da cultura. Micro-organismo crescido em diferentes concentrações de pH inicial do meio de cultura por 24h, 30 °C e 150 rpm. As barras representam o desvio padrão.

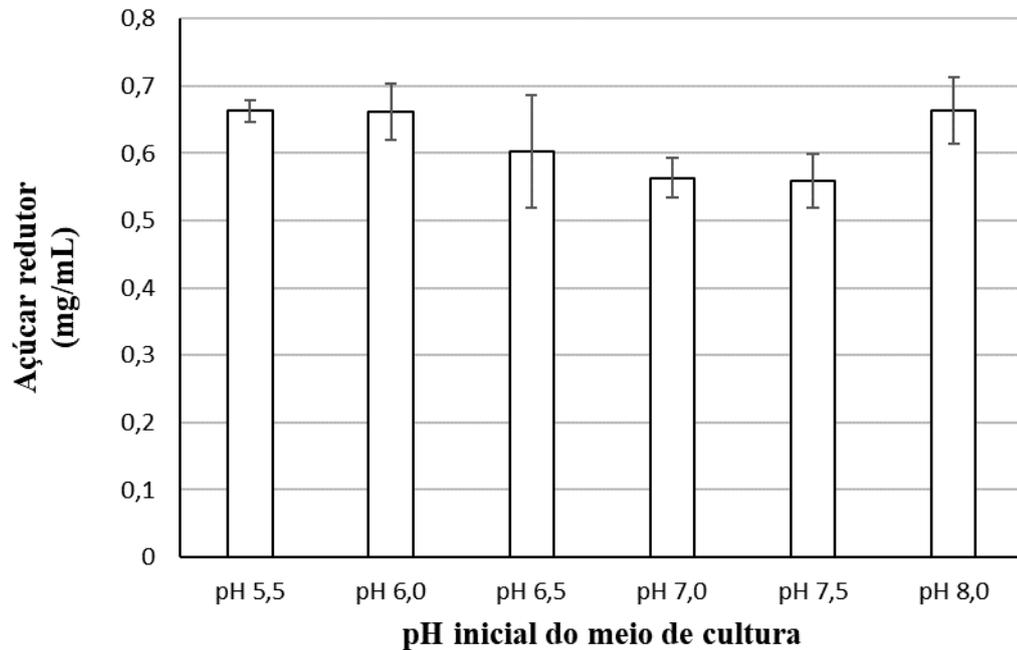


Figura 14. Crescimento de *B. amyloliquefaciens* VR002 em meio contendo 1,0% de amido em diferentes valores de pH inicial. Micro-organismo crescido a 30 °C, 150 rpm por 24h. As barras representam o desvio padrão.

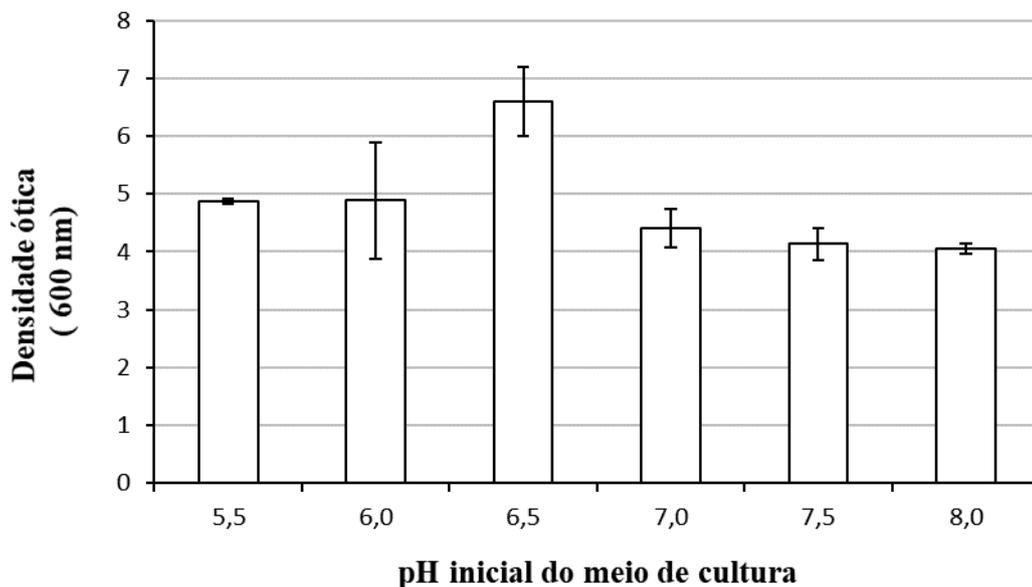
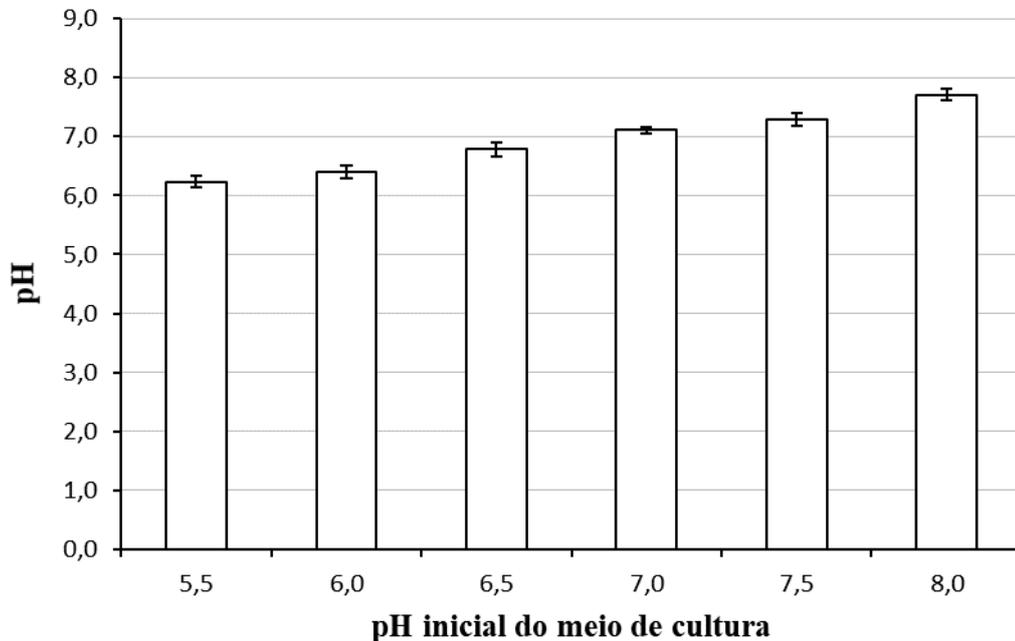


Figura 15. Valor de pH do meio de cultura após 24h de crescimento de *B.amyloliquefaciens* VR002 em diferentes valores de pH inicial do meio de cultura. As barras representam o desvio padrão.



6.4 EFEITO DE DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO NO MEIO DE CULTURA PARA A PRODUÇÃO DE α -AMILASE

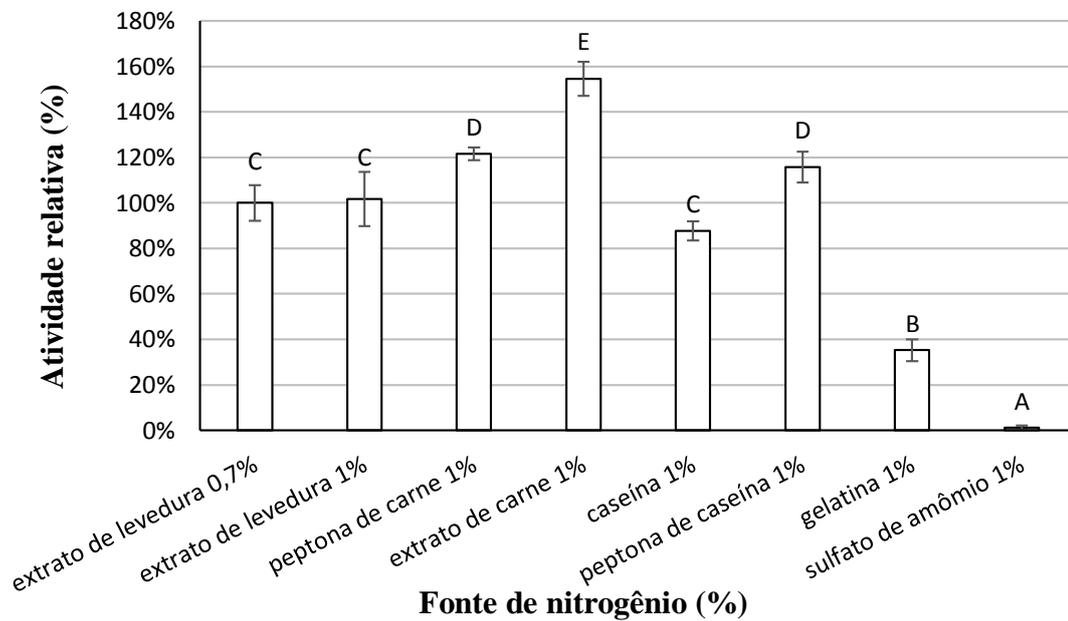
As fontes de nitrogênio são utilizadas principalmente para produzir aminoácidos, ácidos nucleicos, proteínas e componentes de parede celular. Existem diversos compostos nitrogenados que podem ser utilizados por micro-organismos para seu crescimento assim como para a produção de enzimas (PEDERSEN e NIELSEN; 2000).

Foi realizado experimento para se determinar a melhor fonte de nitrogênio para a produção de α -amilase por *Bacillus amyloliquefaciens* VR002, para tanto, foi substituído do meio de cultura, o extrato de levedura (0,7%) por diversas outras fontes de nitrogênio, a saber: peptona de carne, extrato de carne, caseína, gelatina, peptona de caseína e sulfato de amônio, todas na concentração de 1%. Foi também testado o extrato de levedura, o qual já era utilizado no meio de cultura padrão, nas concentrações de 0,7% (100% de atividade) e na concentração de 1% .

Foi realizada análise de variância para avaliar se houve efeito significativo entre as diferentes fontes de nitrogênio, constatando-se que houve efeito significativo entre as diferentes fontes de nitrogênio no meio de cultura sobre a produção enzimática. A análise de variância está descrita em Anexo, Tabela 5.

O resultado pode ser observado na Figura 16.

Figura 16. Atividade relativa de α -amilase de *B.amyloliquefaciens* VR002 cultivado em meio de cultura contendo diferentes fontes de nitrogênio. Micro-organismo crescido por 24h, em pH inicial de 6,5, a 30 °C e 150 rpm. As barras representam o desvio padrão.



*Letras iguais não diferem entre si estatisticamente, pelo teste de Scott-Knott com significância de 5%.

De acordo com a Figura 16, observa-se que não houve produção de α -amilase quando o sulfato de amônio foi acrescentado ao meio de cultura na concentração de 1%, observa-se ainda que as fontes orgânicas de nitrogênio no meio de cultura estimularam a produção de α -amilase sendo que a produção máxima da enzima se deu quando o extrato de carne foi adicionado ao meio de cultura.

De acordo com a Figura 16, pode-se observar que a produção de α -amilase no meio de cultura contendo o extrato de levedura na concentração de 1% não diferiu estatisticamente do meio de cultura contendo a mesma substância porém, na concentração de 0,7%.

O extrato de carne na concentração de 1% foi a fonte de nitrogênio utilizada no meio de cultura onde se obteve a máxima produção de enzima, pelo teste de Scott-Knott com nível de 5% de significância, como mostra a Figura 16. A adição ao meio de cultura de peptona de carne e peptona de caseína obtiveram desempenho estatisticamente iguais e superiores ao do extrato de levedura e caseína. Gelatina e sulfato de amônio no meio de cultura inibiram a produção de α -amilase. Alguns componentes nitrogenados orgânicos e inorgânicos podem ter efeitos adversos na produção de enzimas, os sais de amônio mostram-se como os mais inibitórios (CHU et al. 1992).

No entanto, Pandersen e Nielsen (2000) analisando a influência de fontes de nitrogênio sobre a produção de α -amilase por *Aspergillus oryzae* verificaram que o sulfato de amônio foi melhor do que o nitrato de amônia, além disso observaram que a produção desta enzima era maior quando se usava uma mistura de amônia com outras fontes de nitrogênio complexas, como extrato de levedura e caseína hidrolisada.

Fontes orgânicas de nitrogênio foram relatadas como preferíveis à fontes inorgânicas por micro-organismos na produção de amilases. (JIN et al., 2001; GOYAL et al., 2005; KONSOUOLA e LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES, 2007).

Neste sentido e em consonância com este trabalho, Simair et al. (2017) identificaram como fonte de nitrogênio ótima, o extrato de carne na concentração de 1% para a produção de α -amilase por *Bacillus sp.*, comparando com o uso de extrato de levedura na concentração de 1%, o uso de extrato de carne proporcionou um aumento de aproximadamente 17% na produção de α -amilase, foi relatado ainda que as fontes de nitrogênio inorgânicas tiveram o pior desempenho na produção da enzima em relação as fontes orgânicas. No presente trabalho o uso de extrato de carne a 1% aumentou a produção enzimática em aproximadamente 54% em relação ao uso de extrato de levedura.

Teodoro e Martins (2000) identificaram que em meio contendo amido solúvel como fonte de carbono, a adição de peptona (1%) e extrato de carne (0,5%) no meio de cultura, não só encurtou a fase lag como também aumentou o peso seco e favoreceu a síntese de α -amilase em *Bacillus sp.*

Neeraj et al. (2012) obtiveram bons resultados com a adição de extrato de levedura e peptona no meio de cultura na produção de α -amilase por *B.amyloliquefaciens*, porém a máxima produção da enzima foi alcançada quando se utilizou cloreto de amônio na

concentração de 0,6% como fonte de nitrogênio, ocorrendo um aumento de 214% em relação à segunda maior produção enzimática alcançada com o uso de extrato de levedura na concentração de 0,4%, em contraste com o presente trabalho onde se observou inibição total da enzima com o uso de sulfato de amônio na concentração de 1% e a máxima produção de α -amilase utilizando extrato de carne na concentração de 1%.

Resultado semelhante ao de Neeraj et al. (2012) foi encontrado por Sreekanth et al. (2013) que obtiveram máxima produção de α -amilase por *Bacillus sp.* utilizando como fonte de nitrogênio orgânica o extrato de carne e o acetato de amônio, como fonte inorgânica, em detrimento de outras fontes utilizadas, porém a produção de α -amilase utilizando acetato de amônio no meio de cultura foi 71% maior em relação a utilização de extrato de carne.

Já no trabalho realizado por Sennur et al. (2016) o cloreto de amônio no meio de cultura como fonte de nitrogênio para produção de α -amilase por *Geobacillus sp.* inibiu tanto o crescimento do micro-organismo quanto a produção da enzima, a produção máxima de α -amilase se deu quando adicionou-se extrato de levedura no meio de cultura, na concentração de 0,5%.

Neste trabalho, fontes de nitrogênio complexas no meio de cultura resultaram em maior produção de α -amilase, demonstrando que essas fontes são essenciais para produção de amilases.

Foi analisada a concentração de açúcares redutores, que determinam a quantidade de glicose presente no sobrenadante, resultado da hidrólise do amido realizada pela α -amilase, o resultado obtido está demonstrado na Figura 17.

De acordo com a Figura 17, a maior concentração de açúcares redutores presente no sobrenadante encontra-se no meio de cultura contendo extrato de levedura, seguido do meio contendo sulfato de amônio como fonte de nitrogênio, porém para esta amostra não houve atividade enzimática, além de ter sido constatado baixo crescimento do micro-organismo em relação aos demais meios de cultura com diferentes fontes de nitrogênio, conforme observado na Figura 18.

O meio de cultura contendo sulfato de amônio é acidificado uma vez que o nitrogênio é transportado para o meio intracelular na forma de amônio deixando o íon hidrogênio no meio extracelular resultando em sua acidificação (LEMOS et al., 2001), porém essa premissa não se aplica a este trabalho, visto que não houve variação significativa de pH nos meios de cultura conforme pode-se observar na Figura 19, que possa explicar a ausência de atividade enzimática no tempo de 24h de cultivo.

Ocorreu de fato a produção de α -amilase, porém a adição de sulfato de amônio no meio de cultura pode ter sido um fator que causou a precipitação da enzima ou sua desnaturação em um momento posterior, fato este que levou a não detecção de atividade enzimática, no tempo de 24h de cultivo do micro-organismo, quando houve o contato do extrato bruto enzimático com o substrato.

De acordo com a Figura 18, foi encontrado baixo crescimento nos meios de cultura contendo caseína, gelatina e sulfato de amônio, esses meios coincidentemente registraram o pH levemente mais baixo, conforme Figura 19, porém sem alterações que possam justificar o baixo rendimento enzimático.

Figura 17. Concentração de açúcares redutores presente no sobrenadante da cultura. Micro-organismo crescido em meio de cultura contendo diferentes fontes de nitrogênio, com pH inicial 6,5 por 24h, 30 °C e 150 rpm. As barras representam o desvio padrão.

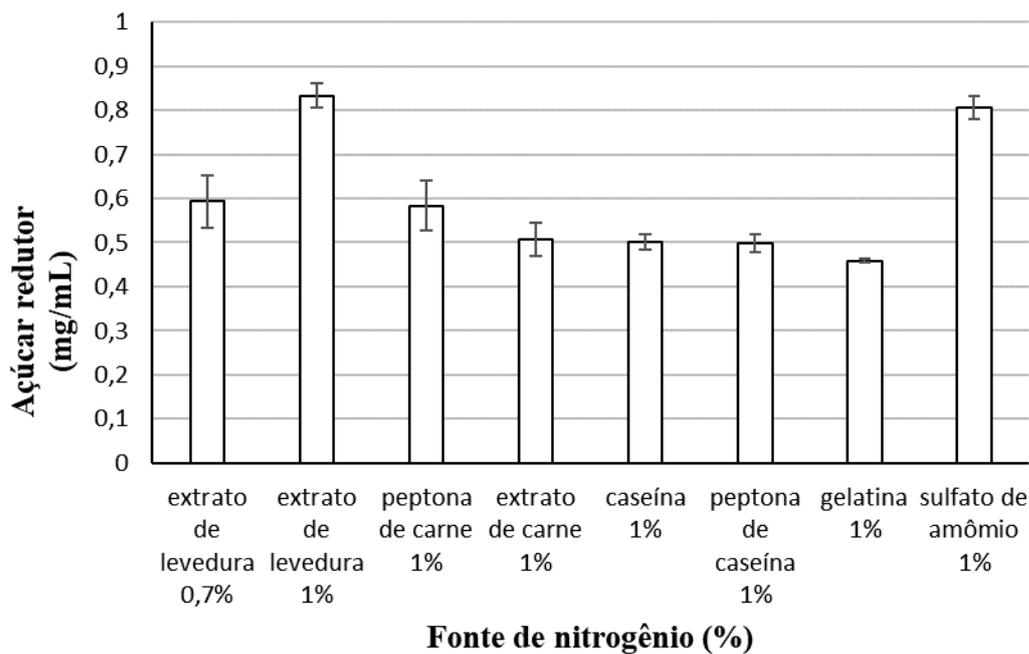


Figura 18. Crescimento de *B. amyloliquefaciens* VR002 em meio de cultura contendo diferentes fontes de nitrogênio. Micro-organismo crescido a 30 °C, 150 rpm por 24h com pH inicial 6,5. As barras representam o desvio padrão.

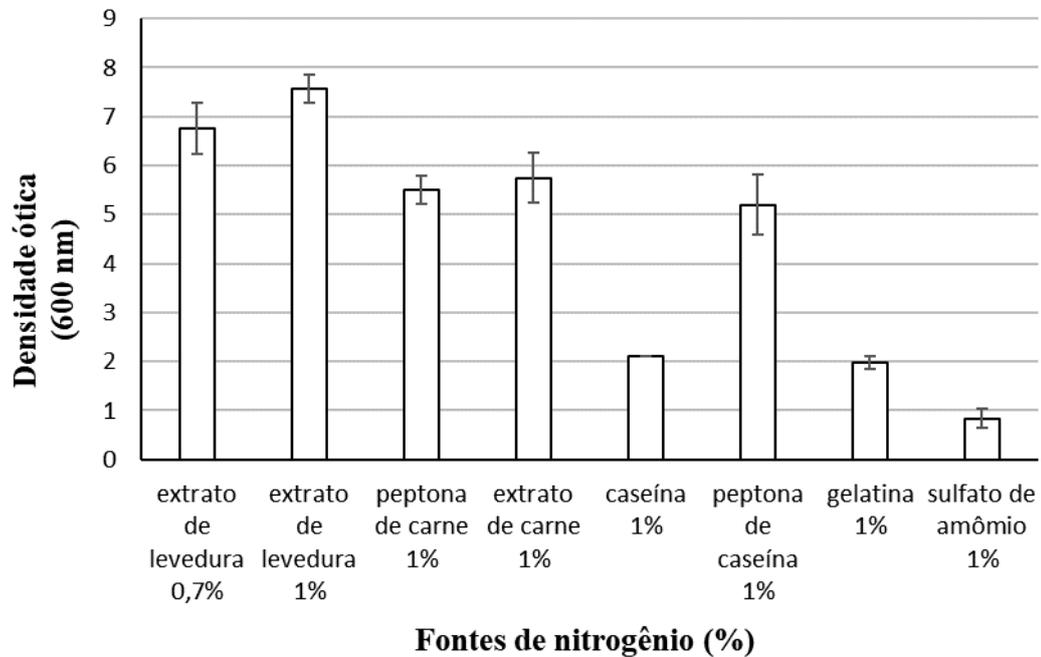
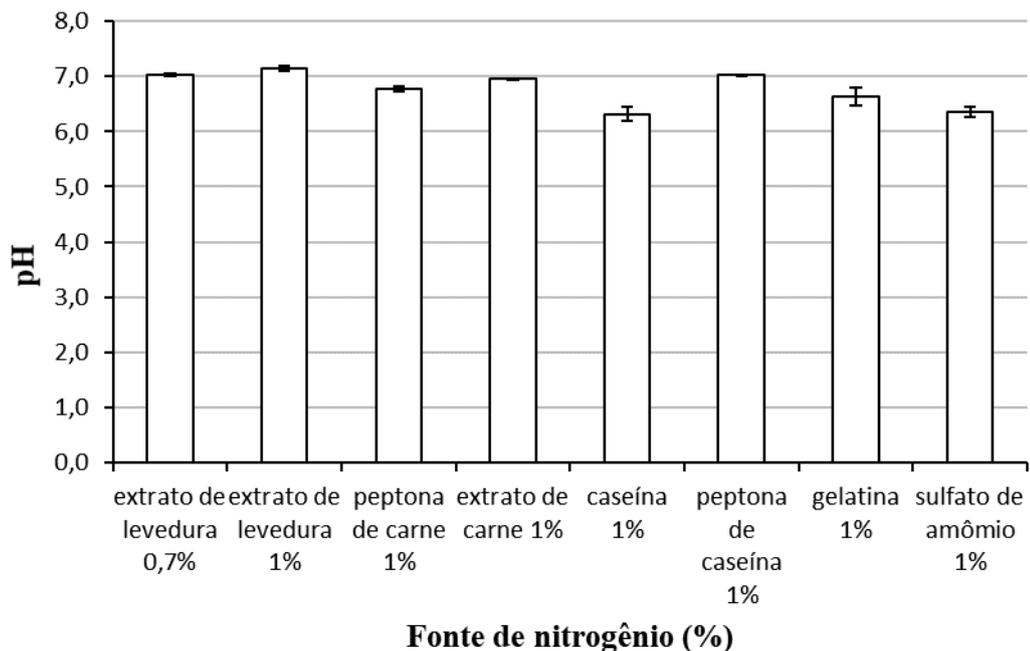


Figura 19. Valor de pH do meio de cultura após 24h de crescimento de *B. amyloliquefaciens* VR002, cultivado em diferentes fontes de nitrogênio. As barras representam o desvio padrão.

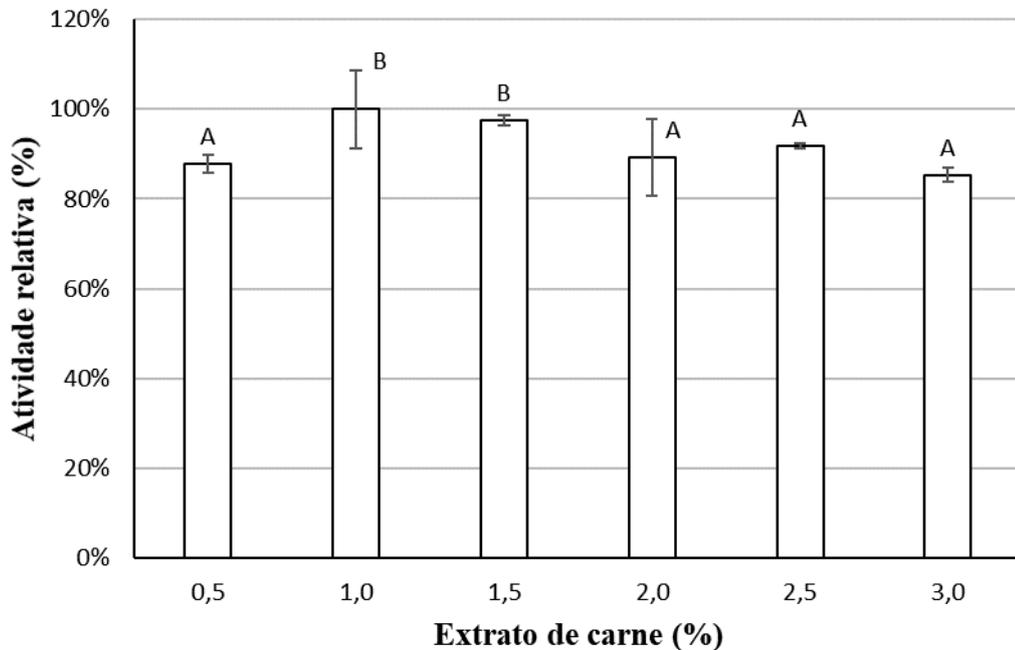


6.4.1 Efeito de diferentes concentrações de extrato de carne sobre a produção de α -amilase

A fim de se verificar a melhor concentração de extrato de carne, a qual foi identificada como a melhor fonte de nitrogênio no meio de cultura para a produção de α -amilase, a cepa *B. amyloliquefaciens* VR002 foi crescida a temperatura de 30 °C e 150 rpm por 24h em meio de cultura contendo 1% de amido solúvel e com pH inicial de 6,5. O extrato de carne foi adicionado ao meio de cultura nas concentrações de 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 e 3,0% individualmente. A concentração de extrato de carne 1,0% representa 100% de atividade.

As análises para a determinação de atividade enzimática foram realizadas em triplicata e de acordo com os resultados obtidos, foi realizada a análise de variância para verificação do efeito de diferentes concentrações de extrato de carne no meio de cultura para a produção de α -amilase, evidenciando que houve efeito significativo na variável concentração de extrato de carne sobre a produção de α -amilase. A análise de variância está descrita em Anexo, Tabela 6. Os resultados estão representados pela média dos valores obtidos, Figura 20.

Figura 20. Atividade relativa de α -amilase de *B.amyloliquefaciens* VR002 cultivado em meio de cultura contendo diferentes concentrações de extrato de carne, como fonte de nitrogênio. Micro-organismo crescido a 30 °C, 150 rpm por 24h e pH inicial de 6,5. As barras representam o desvio padrão.



*Letras iguais não diferem entre si estatisticamente, pelo teste de Scott-Knott com significância de 5%.

De acordo com a Figura 20, houve efeito significativo da concentração de extrato de carne no meio de cultura sobre a produção de α -amilase. As concentrações de 0,5; 2,0; 2,5 e 3,0% foram estatisticamente iguais e inferiores às concentrações de 1,0 e 1,5%, ambas estatisticamente iguais ao nível de 5% de significância pelo teste de Scott-Knott. Deste modo, a concentração de 1% foi determinada como concentração ótima da fonte de nitrogênio por questões de eficiência, pois possui eficácia e economicidade e poupa recursos naturais.

Resultado semelhante foi encontrado por Simair et al. (2017), que após identificarem o extrato de carne como fonte de nitrogênio no meio de cultura para a maior produção de α -amilase por *Bacillus sp.*, identificaram a concentração de 1,5% de extrato de carne como ótima, concentrações menores e maiores proporcionaram baixo rendimento enzimático.

A Figura 21 traz a concentração de açúcares redutores no meio de cultura, resultado da hidrólise do amido. Pode-se observar que nos meios contendo 0,5; 1,0 e 1,5% de extrato de carne a concentração de açúcares redutores foi menor, indicando maior consumo de açúcares

pelo micro-organismo, assim como nas concentrações de 1,0 e 1,5% ocorre a maior produção de α -amilase, de acordo com a Figura 20.

Ainda na Figura 21, observa-se que nos meios contendo as concentrações de 2,0; 2,5 e 3,0% da fonte de nitrogênio, a concentração de açúcares redutores não variou visivelmente, o mesmo ocorreu com a produção de α -amilase, Figura 20. Nessas mesmas concentrações de extrato de carne, a concentração de açúcares redutores foi maior e houve maior crescimento do micro-organismo indicando que a maior disponibilidade de extrato de carne, proporcionou ao micro-organismo maior crescimento celular, porém não houve maior produção enzimática.

Nas concentrações de 0,5; 1,0 e 1,5% de extrato de carne, o crescimento do micro-organismo foi menor, Figura 22, indicando novamente que o crescimento do micro-organismo não está associado à produção da enzima, observa-se ainda que o crescimento do micro-organismo elevou-se proporcionalmente ao aumento da oferta de nitrogênio no meio.

De acordo com a Figura 23, pode-se observar que não houve variações nos valores de pH, os meios de cultura permaneceram com valores próximos à neutralidade.

Figura 21. Concentração de açúcares redutores presente no sobrenadante da cultura. Micro-organismo crescido em meio de cultura contendo diferentes concentrações de extrato de carne, por 24h, 30 °C e 150 rpm com pH inicial 6,5. As barras representam o desvio padrão.

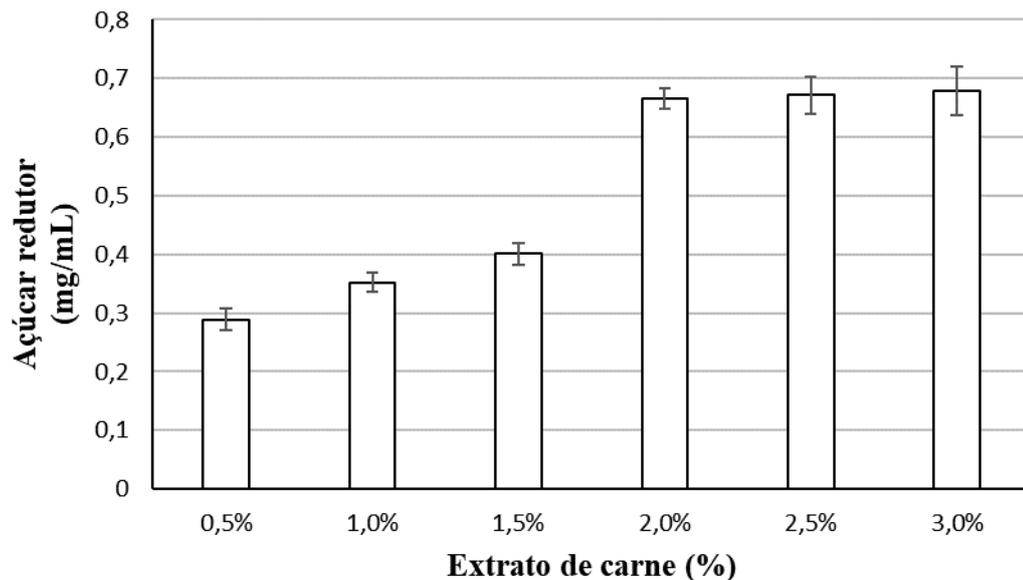


Figura 22. Crescimento de *B. amyloliquefaciens* VR002 em meio de cultura contendo diferentes concentrações de extrato de carne. Micro-organismo crescido a 30 °C, 150 rpm por 24h com pH inicial 6,5. As barras representam o desvio padrão.

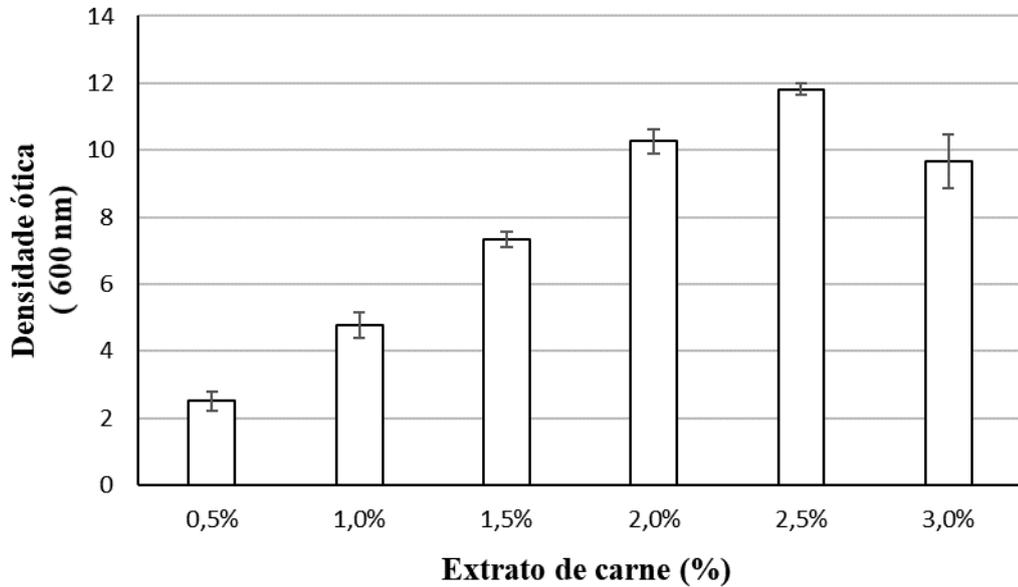
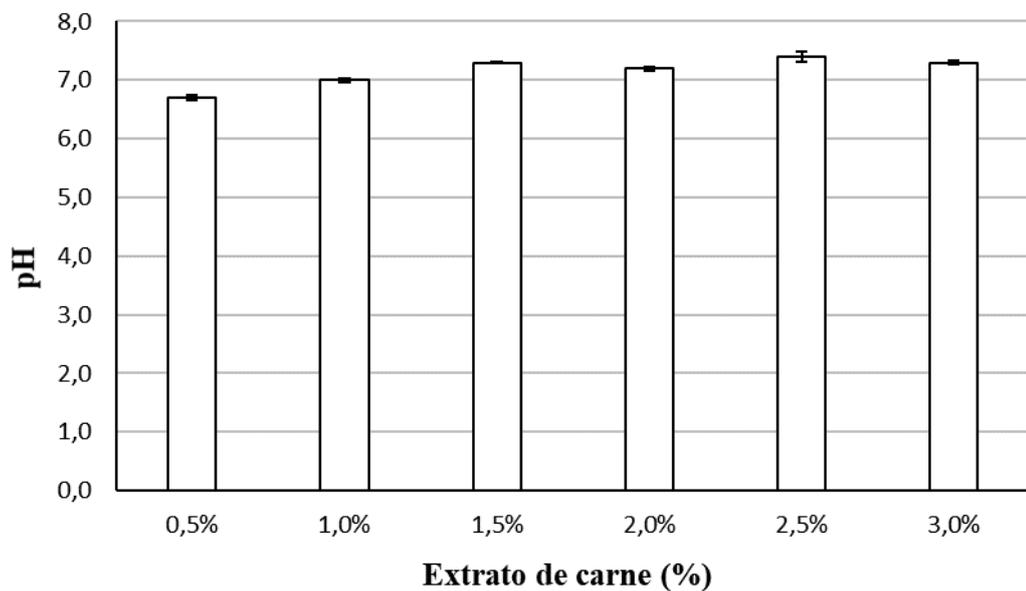


Figura 23. Valor de pH do meio de cultura, após 24h de crescimento de *B. amyloliquefaciens* VR002, contendo diferentes concentrações de extrato de carne. As barras representam o desvio padrão.

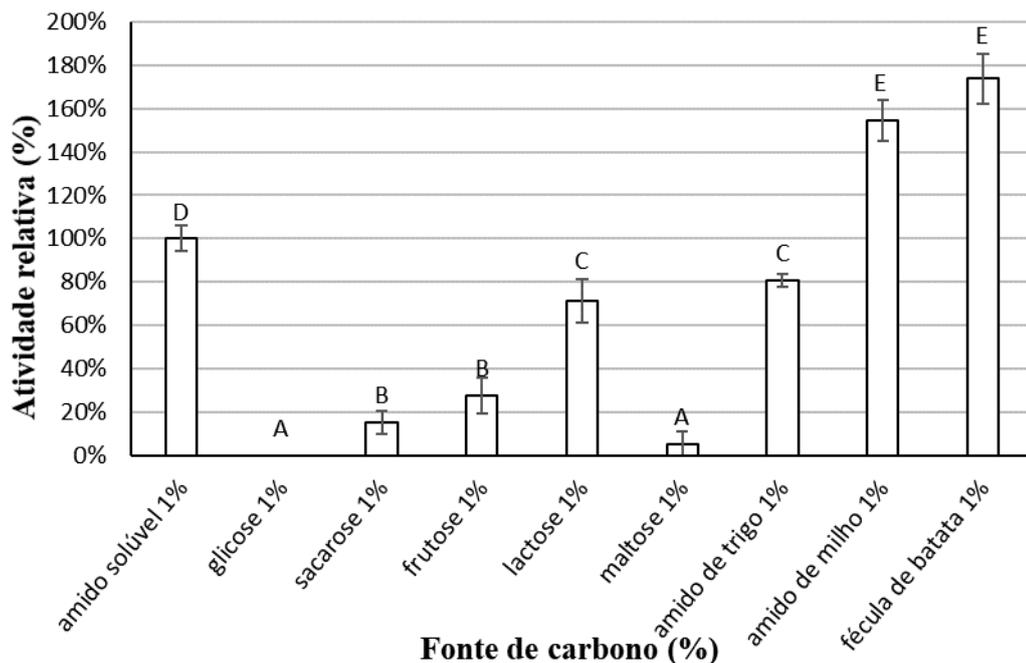


6.5 EFEITO DE DIFERENTES FONTES DE CARBONO SOBRE A PRODUÇÃO DE α -AMILASE

Foi realizado experimento para se determinar a melhor fonte de carbono para a produção de α -amilase por *Bacillus amyloliquefaciens* VR002, para tanto, foi substituído do meio de cultura, o amido solúvel por diversas outras fontes de carbono, separadamente, a saber: glicose, sacarose, frutose, lactose, maltose, amido de trigo, amido de milho e fécula de batata, todas na concentração de 1%. Foi também testado o amido solúvel, o qual já era utilizado no meio de cultura como fonte de carbono, na concentração de 1%, representando 100% de atividade.

Foi realizada análise de variância para avaliar se houve efeito significativo entre as diferentes fontes de carbono utilizadas no meio de cultura, constatando-se que houve efeito significativo sobre a produção da enzima. A análise de variância está descrita em Anexo, Tabela 7. Os resultados estão apresentados na Figura 24.

Figura 24. Atividade relativa de α -amilase de *B. amyloliquefaciens* VR002 cultivado em meio de cultura contendo diferentes fontes de carbono. Micro-organismo crescido por 24h, em pH inicial de 6,5, a 30 °C e 150 rpm em meio de cultura contendo 1% de extrato de carne, como fonte de nitrogênio. As barras representam o desvio padrão.



*Letras iguais não diferem entre si estatisticamente, pelo teste de Scott-Knott com significância de 5%

De acordo com a Figura 24, amido de milho e fécula de batata foram estatisticamente iguais e superiores as demais fontes de carbono investigadas, ao nível de 5% de significância. Ainda, conforme Figura 24, a utilização de lactose e amido de trigo no meio de cultura produziu resultados estatisticamente iguais e proporcionaram queda na produção da enzima, já a utilização de sacarose e frutose no meio de cultura resultou em desempenhos iguais estatisticamente e provocaram uma queda maior na produção da enzima, em relação à utilização de lactose e amido de trigo. Os piores resultados foram obtidos na adição de maltose e glicose no meio de cultura, ocorrendo queda na produção de enzimas de aproximadamente 95% com o uso de maltose e inibição total na produção da enzima quando se utilizou glicose.

Na produção de amilases por micro-organismos a fonte de carbono tem efeito muito importante na regulação da biossíntese. Amido e substâncias amiláceas têm sido descritos como substratos mais apropriados para alta produção de amilases (MESSAOUD et al., 2004; KONSULA e LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES, 2007; SAXENA et al., 2007).

A produção de α -amilase por algumas espécies do gênero *Bacillus* está sujeita à repressão catabólica pela glicose, xilose e frutose (GUPTA et al., 2003). Desta forma, alta densidade celular e alta taxa de crescimento específico podem ser obtidas com o uso de glicose no meio de cultura, entretanto, alta taxa de produção de enzimas é obtida utilizando amido como fonte de carbono (PANDEY et al., 2000). Este fato pode ser corroborado pelos resultados obtidos neste trabalho, a utilização de glicose no meio de cultura na concentração de 1% inibiu a produção de α -amilase por *B. amyloliquefaciens* VR002, bem como a utilização de frutose na concentração de 1% que proporcionou uma queda de aproximadamente 76% na produção de α -amilase, quando comparado com o controle, Figura 24, além disso no meio de cultura contendo esses mesmos monossacarídeos, houve um crescimento maior do micro-organismo, Figura 26, quando comparado ao crescimento observado quando se utilizou fécula de batata como fonte de carbono, considerando que este polissacarídeo proporcionou um aumento na produção da enzima em torno de 70%, Figura 24.

Konsula e Liakopoulou-Kyriakides (2007) investigando a produção de α -amilase e β -galactosidase por *Bacillus subtilis* identificaram um alto crescimento do micro-organismo quando inserido no meio de cultura, fontes de carbono facilmente metabolizadas como glicose, maltose, maltotriose e lactose, porém a produção de ambas enzimas foi suprimida na presença desses açúcares. Entre as fontes de carbono pesquisadas, o amido na concentração de 0,2% foi considerado o substrato mais adequado para a maior produção das duas enzimas.

Semelhante a esses dois autores, pode-se observar na Figura 24 que as fontes de carbono: glicose, sacarose, frutose e maltose inibiram a produção de α -amilase, porém, proporcionaram um crescimento maior do micro-organismo em uma média de aproximadamente 80% em relação as demais fontes de carbono, polissacarídeos, Figura 26.

Neste sentido, Sennur et al. (2016) investigando a melhor fonte de carbono para a produção de α -amilase por *Geobacillus sp.* verificaram que com a adição de sacarose, dextrose e lactose, todas na concentração de 1%, a atividade enzimática caiu drasticamente, a adição de maltose no meio de cultura obteve o melhor resultado, ultrapassando a atividade com amido, diferente do presente trabalho onde a substituição do amido solúvel por maltose ocasionou queda de aproximadamente 95% na atividade enzimática.

Teodoro e Martins (2000) relataram que a adição de glicose no meio de cultura inibiu a produção de α -amilase por *Bacillus sp.* provocando queda de aproximadamente 38% da atividade enzimática, diferente do presente trabalho, onde a adição de glicose no meio de cultura inibiu totalmente a produção de α -amilase.

Resultado semelhante foi relatado por Saxena et al. (2007) na avaliação do efeito de diferentes fontes de carbono na produção de α -amilase por *Bacillus sp.* em que a glicose e frutose inibiram a produção da enzima enquanto o amido induziu fortemente sua produção, a utilização de glicose e frutose ocasionaram queda na atividade enzimática de aproximadamente 87 e 86%, respectivamente, enquanto que no presente trabalho o uso de glicose e frutose registrou queda de 100 e 72%, respectivamente.

Por outro lado, Sreekant et al. (2013) identificaram a glicose como fonte de carbono ótima para a produção de α -amilase por *Bacillus sp.*, a adição de glicose no meio de cultura aumentou a atividade enzimática cerca de 10% em relação ao uso de amido solúvel, bem como, Neeraj et al. (2012) encontraram a lactose 0,5 % como fonte de carbono ótima, mas verificaram que sacarose e manitol também favoreceram a produção de α -amilase por *B. amyloliquefaciens*.

Singh et al. (2011) identificaram D-inositol como ótimo indutor na produção de α -amilase por *Streptomyces sp.*, seguidos por monossacarídeos como glicose e galactose e polissacarídeos, como o amido, porém xilose e frutose inibiram a produção da enzima.

Segundo Gupta et al. (2003), a indução de amilases de micro-organismos selvagens é melhor quando se utiliza amido, ou seus produtos de hidrólise, como única fonte de carbono. Em muitos trabalhos, o amido e outras fontes amiláceas têm sido descritos como sendo a principal fonte de carbono utilizada induzindo fortemente a produção de α -amilase (GUPTA et al., 2003; SAXENA et al., 2007).

De acordo com a Figura 25, a concentração de açúcares redutores foi mais baixa entre os polissacarídeos, indicando maior consumo de açúcares pelo micro-organismo, nesses mesmos meios de cultura foram encontradas as maiores taxas de produção de enzimas e as menores taxas de crescimento, indicando que a oferta desses polissacarídeos, foram utilizados para a produção de enzimas e não para o crescimento do micro-organismo.

De acordo com a Figura 27, o pH de todos os meios de cultura contendo as diferentes fontes de carbono se mantiveram próximos a neutralidade, os valores de pH variaram entre 6 e 7.

Figura 25. Concentração de açúcares redutores presente no sobrenadante da cultura. Micro-organismo crescido em meio de cultura contendo diferentes fontes de carbono, com pH inicial 6,5 por 24h, 30 °C, 150 rpm, em meio de cultura contendo 1% de extrato de carne, como fonte de nitrogênio. As barras representam o desvio padrão.

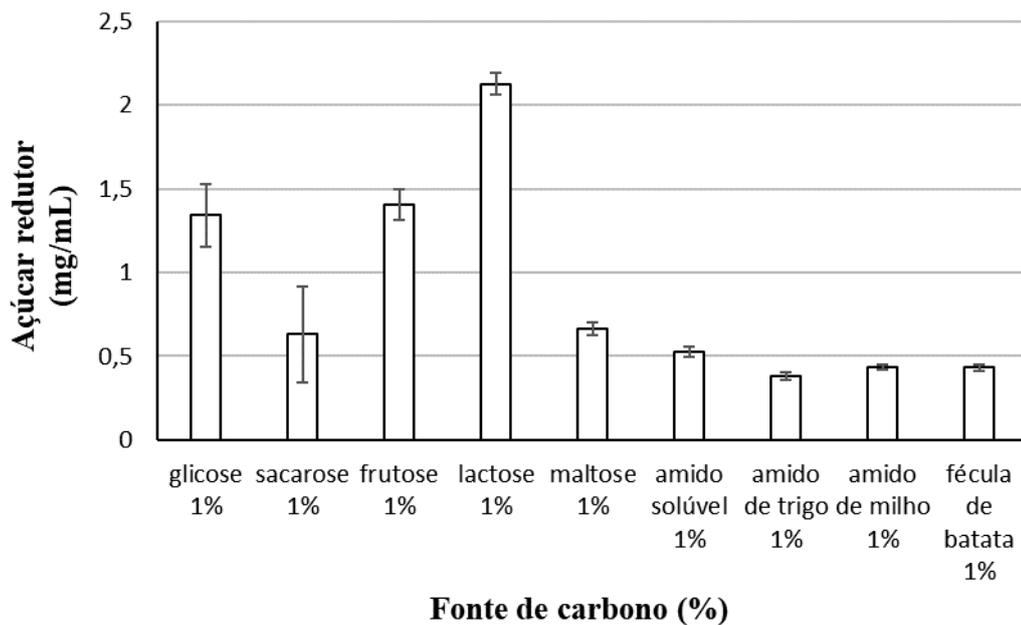


Figura 26. Crescimento de *B. amyloliquefaciens* VR002 em meio de cultura contendo diferentes fontes de carbono. Micro-organismo crescido a 30 °C, 150 rpm por 24h com pH inicial 6,5, em meio de cultura contendo 1% de extrato de carne, como fonte de nitrogênio. As barras representam o desvio padrão.

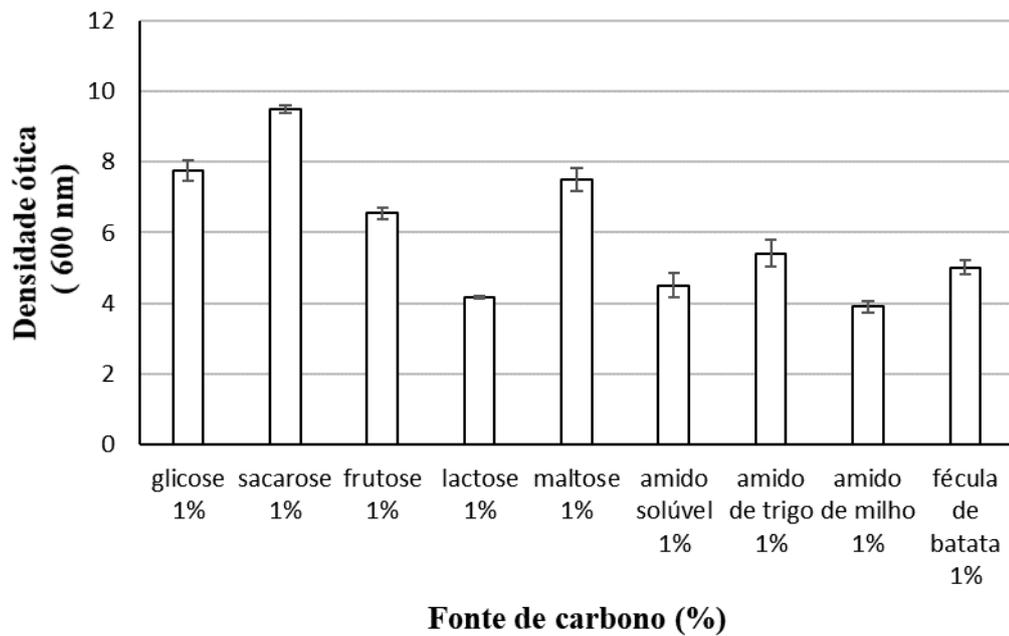
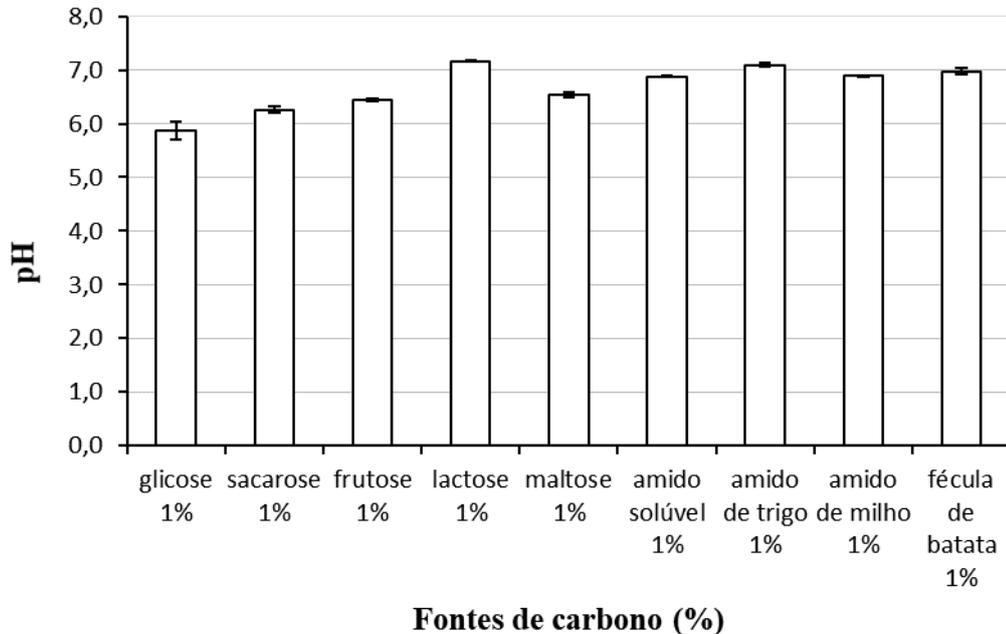


Figura 27. Valor de pH do meio de cultura após 24h de crescimento de *B. amyloliquefaciens* VR002, cultivado em diferentes fontes de carbono. Micro-organismo crescido a 30 °C, 150 rpm por 24h com pH inicial 6,5, em meio de cultura contendo 1% de extrato de carne, como fonte de nitrogênio. As barras representam o desvio padrão.



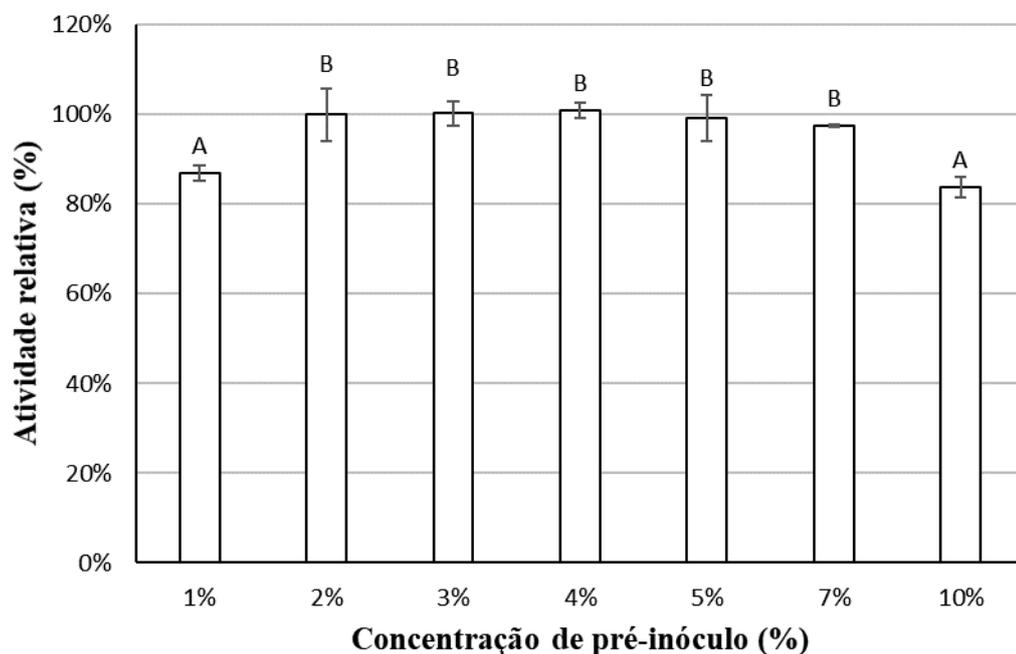
6.6 EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE PRE-INÓCULO PARA A PRODUÇÃO DE α -AMILASE

Foi realizado experimento para se determinar a melhor concentração de pré-inóculo no meio de cultura, para a produção de α -amilase por *Bacillus amyloliquefaciens* VR002, para tanto, foi adicionado ao meio de cultura 1, 2, 3, 4, 5, 7 e 10% de pré-inóculo, individualmente. O meio de cultura foi incubado nas condições ótimas encontradas e a atividade de α -amilase foi avaliada de acordo com item 5.1.1, porém com a temperatura e o pH de incubação, já otimizados. A concentração de 2% de pré-inóculo foi considerada como 100% de atividade. Os resultados obtidos estão demonstrados na Figura 28.

Foi realizada análise de variância para se avaliar o efeito entre as diferentes concentrações de pré-inóculo no meio de cultura, destarte, observou-se que houve efeito

significativo das diferentes concentrações de pré-inóculo no meio de cultura sobre a produção enzimática. A análise de variância está descrita em Anexo, Tabela 8.

Figura 28. Atividade relativa de α -amilase de *B.amyloliquefaciens* VR002 cultivado em meio de cultura contendo diferentes concentrações de pré-inóculo. Micro-organismo crescido a 30 °C, 150 rpm por 24h e pH inicial de 6,5 em meio de cultura contendo 1% de extrato de carne, como fonte de nitrogênio e 1% de fécula de batata como fonte de carbono. As barras representam o desvio padrão.



*Letras iguais não diferem entre si estatisticamente, pelo teste de Scott-Knott com significância de 5%.

De acordo com a Figura 28, observa-se que o pré-inóculo aplicado ao meio de cultura nas concentrações de 1 e 10 % foram estatisticamente iguais e inferiores às demais concentrações, obtendo-se um resultado cerca de 13 e 16% a menos, respectivamente. As concentrações 2, 3, 4, 5 e 7% foram estatisticamente iguais, desta forma, a concentração de pré-inóculo a 2% foi identificada como sendo mais adequada, considerando economia e eficácia.

Resultado semelhante foi relatado por Deb et al. (2013) que ao estudarem a produção de α -amilase por *Bacillus amyloliquefaciens*, onde foram avaliadas diferentes concentrações de inóculo que variaram entre 1 e 3,5%, observaram que o aumento da concentração de

inóculo provocou queda na produção de α -amilase, por exemplo, a utilização de 3,5% de inóculo ocasionou queda de aproximadamente 28% da produção enzimática em relação ao uso de 1% de inóculo.

Ibrahim et al. (2013), investigando a produção de α -amilase por *Bacillus licheniformis* observaram que o inóculo na concentração de 1,7% propiciou um aumento na produção de α -amilase, quando se utilizou concentrações maiores e menores que 1,7% houve redução na produção da enzima.

Ao estudarem a produção de amilase por *Bacillus sp.*, Wang et al. (2016) testaram diferentes concentrações de inóculo, a concentração de 1% foi identificada como ótima, aumentando a produção da enzima, já o uso de concentrações menores e maiores do que 1% resultaram em menor produção enzimática.

Sharma e Satyanarayana (2011), estudando a produção de α -amilase por *Bacillus acidicola*, observaram que as diferentes concentrações de inóculo não influenciaram a produção de α -amilase, mantendo assim a concentração de 2% no meio de cultura, apresentando certa similaridade com o presente trabalho onde também se manteve a concentração de inóculo de 2% por não haver diferença estatística significativa quando da utilização de maiores concentrações de inóculo.

Salman et al. (2016) ao estudarem a produção de amilase por *Bacillus subtilis* investigaram a influência do tamanho do inóculo sobre a produção de amilases e identificaram que a menor produção de amilase se deu com o uso de inóculo na concentração de 2,5% e a maior produção foi encontrada com o uso de inóculo na concentração de 7,5%, diferente do presente trabalho no qual se observou que entre as concentrações de 2 e 7% de inóculo não houve diferença significativa.

Simair et al. (2017) estudando a produção de α -amilase por *Bacillus sp* identificaram que a maior produção enzimática se deu quando a concentração de inóculo foi de 10%, sendo que a menor produção da enzima ocorreu na concentração de 1%, diferente do presente trabalho, em que nas concentrações de inóculo tanto de 1% quanto de 10% obteve-se os menores resultados para a produção da enzima.

Resultado diferente foi relatado por Akassou e Groleau (2018) que ao estudarem a produção de enzimas amilolíticas por *Thermus thermophilus* encontraram a concentração de 20% de inóculo como sendo ótima para a produção de enzimas.

Foram dosados o açúcares redutores no sobrenadante livre de células, Figura 29, o crescimento do micro-organismo, Figura 30, e os valores de pH no meio de cultura, Figura 31.

De acordo com a Figura 29 as concentrações mais baixas de açúcares redutores foram observados nos meios de cultura contendo 7 e 10% de pré-inóculo, porém a variação, de um modo geral, entre os resultados das concentrações de açúcares redutores para todas as concentrações de pré-inóculo foi baixa. Neste mesmo sentido, de acordo com a Figura 30, houve pouca variação no crescimento do micro-organismo entre as amostras avaliadas, exceto por um pequeno aumento do crescimento observado nos meios de cultura contendo 1, 4 e 10% de inóculo. De acordo com a Figura 31, o pH do meio de cultura para todas as amostras analisadas não sofreu variação significativa, permanecendo próximo a neutralidade.

Considerando as baixas variações apresentadas na concentração de açúcar redutor, crescimento do micro-organismo e pH do meio de cultura, conclui-se que as diferentes concentrações de pré-inóculo utilizadas no meio de cultura não influenciaram de sobremaneira o crescimento do micro-organismo, ocorrendo porém variação na produção de α -amilase, nas concentrações de 1 e 10% de inóculo, podendo ser justificado somente pela concentração muito baixa e muito alta de micro-organismos. Assim, a produção enzimática depois de um certo tempo de crescimento pode estar associada a necessidade de uma massa mínima celular para que o micro-organismo possa sintetizar enzimas (SINGH et al., 2003) fato pelo qual ocorreu a baixa produção da enzima na concentração de 1% de inóculo, já na concentração de 10% de inóculo o excesso de micro-organismos propiciou um direcionamento para seu crescimento e não para a síntese de enzimas.

Figura 29. Concentração de açúcares redutores presente no sobrenadante da cultura. Micro-organismo crescido em meio de cultura contendo diferentes concentrações de pré-inóculo, com pH inicial 6,5 por 24h, 30 °C e 150 rpm. As barras representam o desvio padrão.

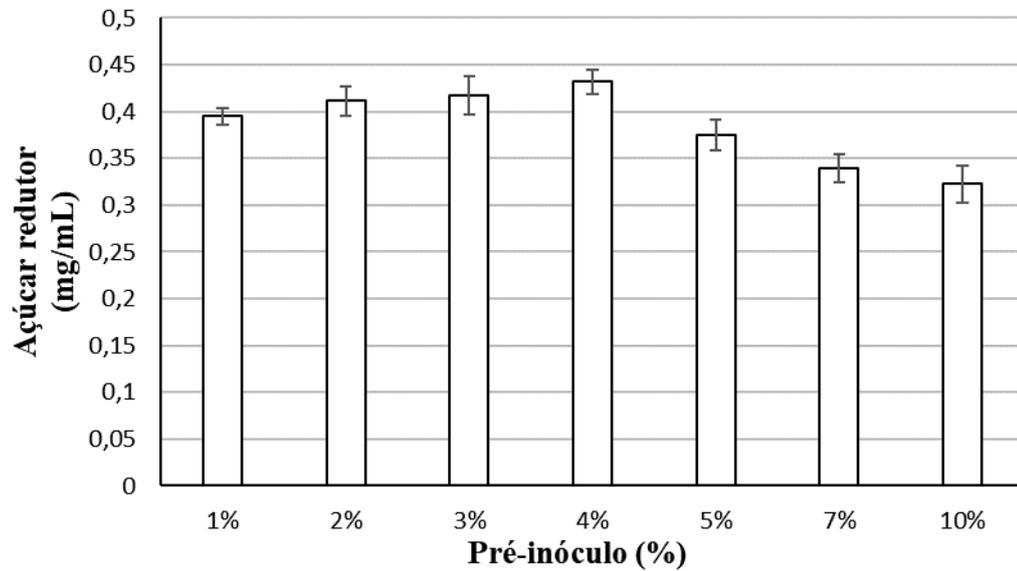


Figura 30. Crescimento de *B. amyloliquefaciens* VR002 em meio de cultura contendo diferentes concentrações de pré-inóculo. Micro-organismo crescido a 30 °C, 150 rpm por 24h com pH inicial 6,5. As barras representam o desvio padrão.

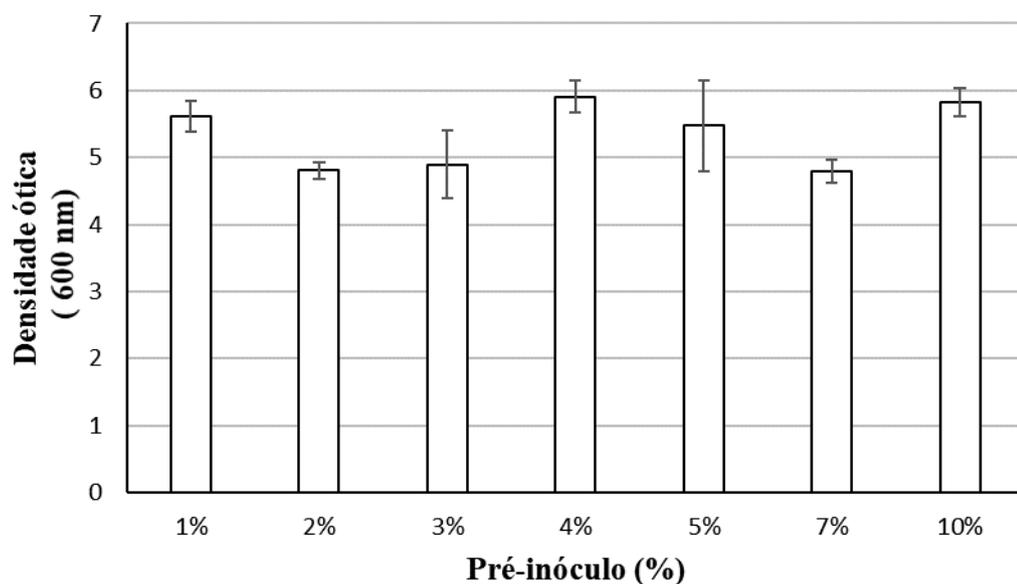
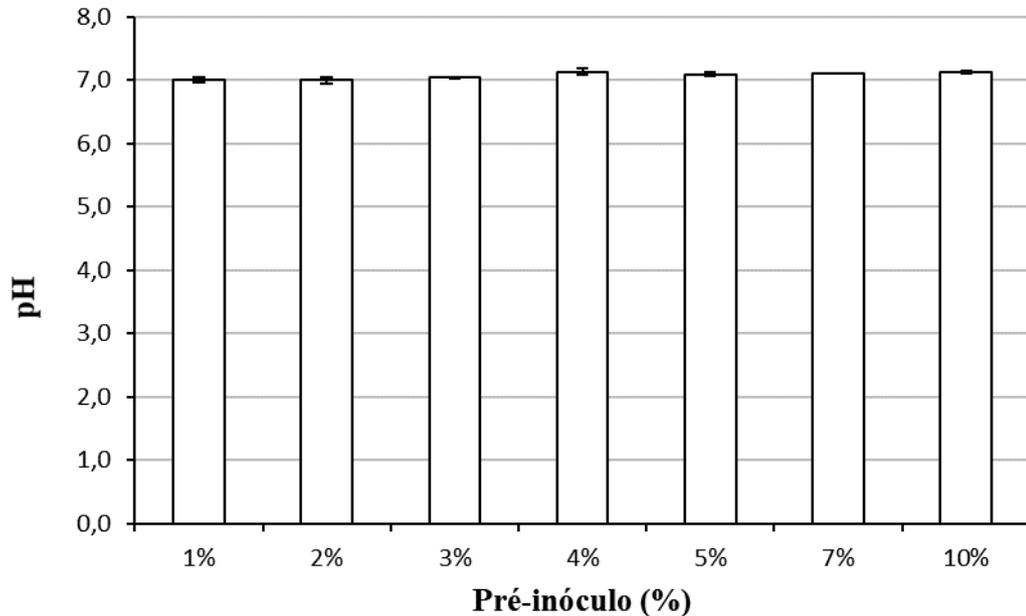


Figura 31. Valor de pH do meio de cultura após 24h de crescimento de *B.amyloliquefaciens* em diferentes concentrações de pré-inóculo. As barras representam o desvio padrão.



6.7 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE EXTRATO BRUTO ENZIMÁTICO E DA CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO NO MEIO REACIONAL PARA A ATIVIDADE DE α -AMILASE

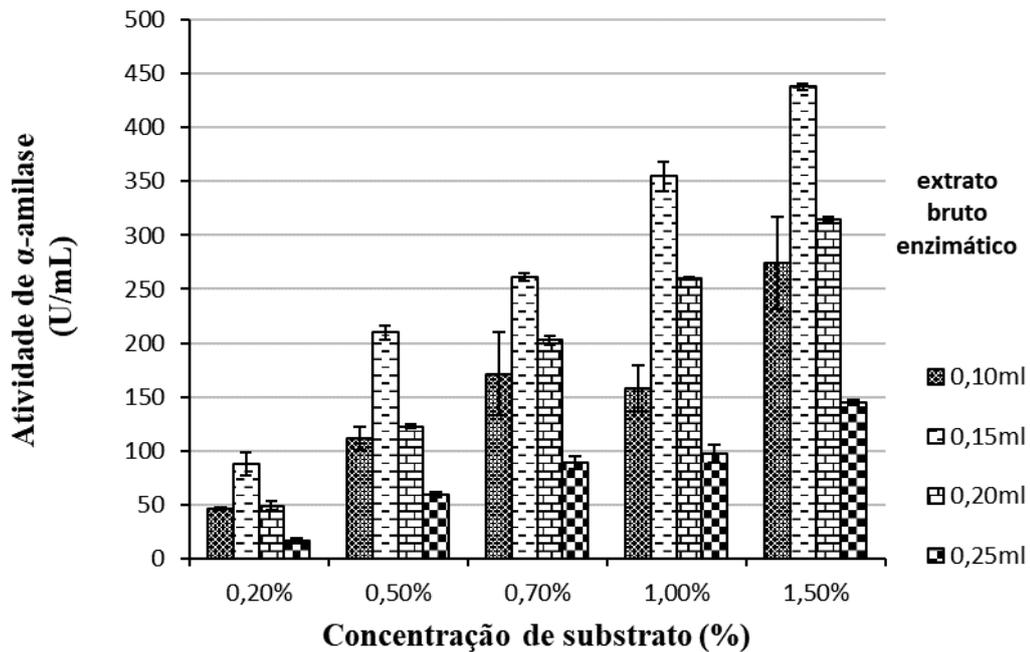
Para avaliar o efeito da concentração de extrato bruto enzimático no meio reacional sobre a atividade enzimática, foram experimentadas as concentrações de 0,1; 0,15; 0,2 e 0,25 mL de extrato bruto enzimático em meio reacional contendo 0,50 mL de solução de amido. Para se avaliar o efeito de diferentes concentrações de substrato no meio reacional, foram utilizadas as concentrações de 0,2; 0,5; 0,7, 1,0 e 1,5% de solução de amido. Os dois experimentos foram realizados concomitantemente. A atividade enzimática foi determinada de acordo com item 5.1.1 com exceção da temperatura de incubação e pH do meio, anteriormente otimizados. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 32.

Foi realizada análise de variância para se avaliar o efeito entre as diferentes concentrações de extrato bruto enzimático e as diferentes concentrações de substrato no meio

reacional, sob a atividade enzimática. A análise de variância está descrita em Anexo, Tabela 9.

A análise de variância evidenciou que houve efeito significativo nas diferentes concentrações das variáveis enzima e substrato, bem como houve efeito significativo na interação dessas duas variáveis, indicando que a atividade de α -amilase depende da interação da concentração de extrato bruto enzimático e da concentração de substrato no meio reacional, desta forma, procedeu-se ao desdobramento da interação da atividade de α -amilase dentro de cada fator avaliado.

Figura 32. Atividade de α -amilase de *B.amyloliquefaciens* VR002 sob efeito de diferentes concentrações de substrato e diferentes concentrações de extrato bruto enzimático. Microorganismo crescido a 30 °C, 150 rpm por 24h e pH inicial de 6,5 em meio de cultura contendo 1% de extrato de carne, como fonte de nitrogênio e 1% de fécula de batata como fonte de carbono. As barras representam o desvio padrão.



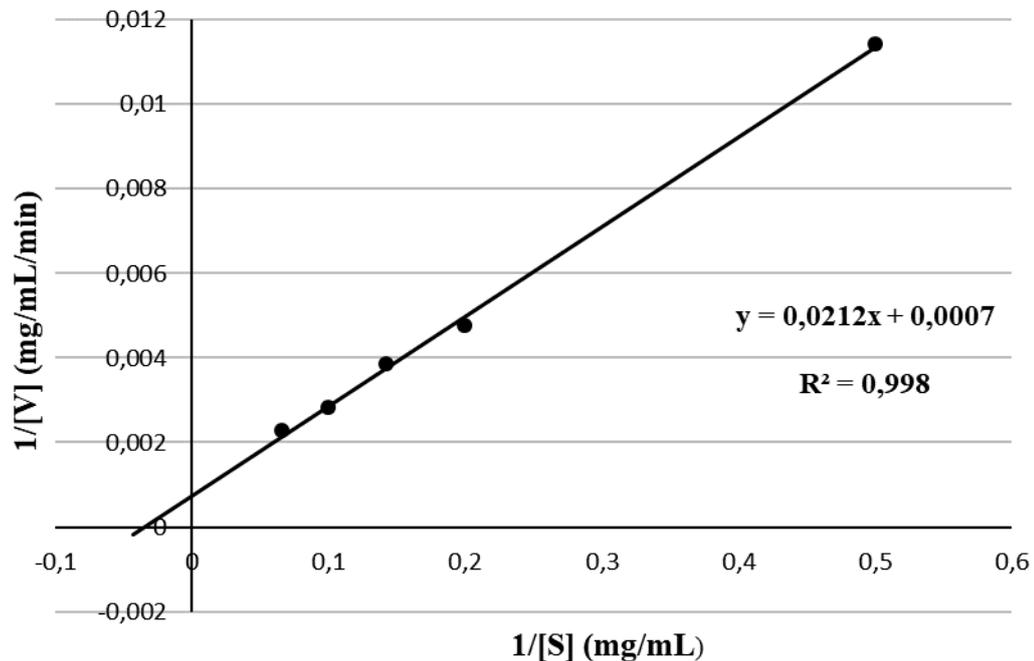
De acordo com a Figura 32, observa-se que à medida que a concentração de substrato aumenta, a atividade enzimática também aumenta, porém maiores concentrações de extrato bruto enzimático não aumentaram a atividade da enzima. Pode-se observar um aumento na atividade enzimática de 140% quando a concentração de substrato que era de 0,2% mudou

para 0,5%, quando o substrato aumentou para 0,7% a atividade enzimática aumentou aproximadamente 198%, com o substrato na concentração de 1% o aumento na atividade foi de 308%, aproximadamente e na concentração de 1,5% a atividade aumentou em 400%, indicando um crescimento constante na atividade da enzima em relação ao aumento de substrato, não só quando na concentração de 0,15 mL de extrato bruto enzimático mas também em todas as outras concentrações de extrato bruto enzimático. Esse aumento constante observado na atividade enzimática, promovido pela elevação da concentração de substrato não é observado quando se aumenta a concentração de extrato bruto enzimático, por exemplo, na concentração de substrato a 1,5%, observa-se um aumento de aproximadamente 76% na atividade quando a concentração de extrato bruto enzimático passa de 0,10 mL para 0,15 mL, já quando a concentração é aumentada para 0,20 mL a atividade cai cerca de 30% em relação ao resultado anterior, e quando a concentração de extrato bruto enzimático aumenta para 0,25 mL, a atividade enzimática cai cerca de 55%. Deste modo conclui-se que as concentrações mais adequadas para o extrato bruto enzimático é de 0,15 mL e para o substrato é de 1,5% de amido

Akassou e Groleau (2018) relataram que ao estudarem a produção de enzimas amilolíticas por *Thermus thermophilus* encontraram a concentração de substrato ótima de 2,5%. Foram avaliadas concentrações entre 0,1 e 3,5% de amido, onde se observou um aumento de atividade enzimática constante à medida que houve aumento da concentração de substrato no meio reacional, porém a atividade estabilizou-se quando concentrações maiores que 2,5% do substrato foram utilizadas.

As propriedades cinéticas de α -amilase foram determinadas em função das crescentes concentrações de substrato adicionadas ao meio reacional. Os cálculos dos resultados das constantes foram realizados pelo método de Lineweaver-Burk (1934). A atividade foi expressa em U/mL. O K_m determinado para a α -amilase de *B. amyloliquefaciens* VR002 foi de 0,0302 mg/mL e o valor de V_{max} foi de 1,428 mg/mL/min. A Figura 33 traz o efeito da concentração de amido (mg/mL) sobre a velocidade da reação catalisada pela α -amilase ($\mu\text{mol/mL/min}$).

Figura 33. Efeito da concentração de substrato sobre a velocidade da reação catalisada por α -amilase.



De acordo com Nelson e Cox (2011) a constante K_m é igual a concentração de substrato na qual a velocidade inicial da reação é metade da velocidade máxima. O K_m para uma reação e um substrato tem a dimensional moles pro litro e é independente da concentração enzimática. Desta forma a constante de Michaelis-Menten (K_m) é uma quantidade determinada experimentalmente definida de maneira operacional : a concentração do substrato em que a velocidade da reação é a metade da velocidade máxima.

Liu et al. (2014) caracterizando a α -amilase produzida por *Bacillus licheniformis* encontraram um K_m de 11,8 mg/mL para o tipo selvagem e K_m de 8,6 mg/mL em um mutante H281I, indicando uma maior afinidade pelo amido.

Wanderley et al. (2004) estudando a α -amilase produzida por *Cryptococcus flavus* encontraram um K_m de 0,056 mg/mL, similar ao presente estudo em que o K_m encontrado foi de 0,0302 mg/mL, indicando que ambas enzimas possuem uma alta afinidade pelo substrato.

Fincan et al. (2014) encontraram K_m 0,005 mM e V_{max} de 3,5 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{L}$ para α -amilase de *Anoxybacillus flavithermus*.

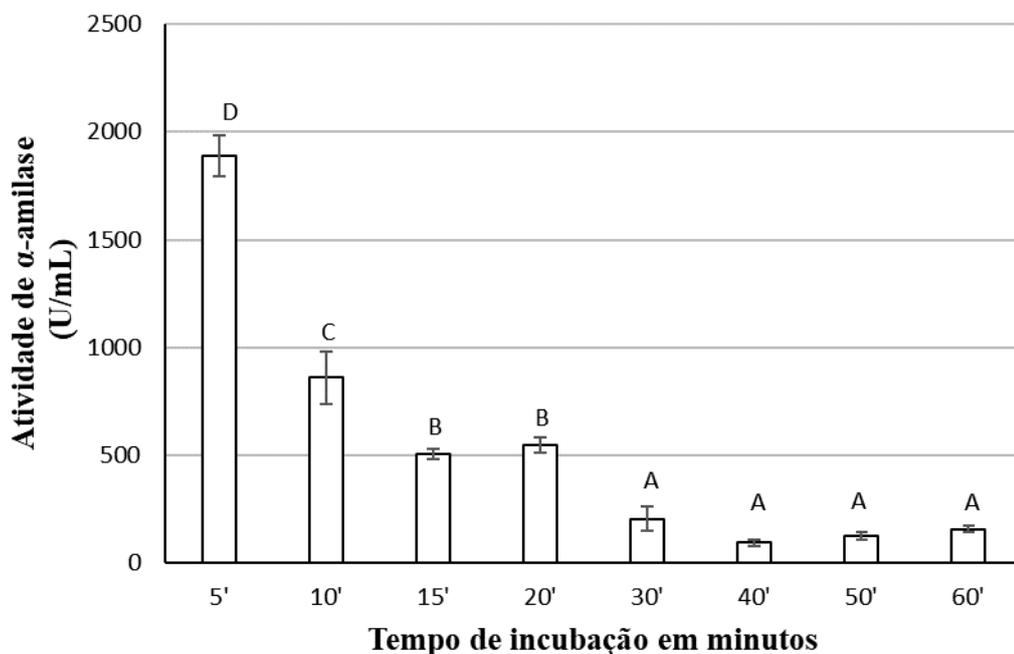
6.8 EFEITO DO TEMPO DE INCUBAÇÃO DO EXTRATO BRUTO ENZIMÁTICO SOBRE A ATIVIDADE DE α -AMILASE

Foi realizado experimento para se determinar o melhor tempo de incubação do meio reacional (extrato bruto enzimático + substrato) para a atividade de α -amilase, para tanto, foram investigados os tempo de incubação de 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 e 60 minutos

O meio de cultura foi incubado por 24h, na temperatura de 30 °C, a 150 rpm e com pH inicial de 6,5 e a atividade de α -amilase foi avaliada de acordo com item 5.1.1, porém com temperatura de 45 °C, pH 7, 0,15 mL de extrato bruto enzimático e concentração de substrato de 1,5%, otimizados anteriormente. Os resultados obtidos estão demonstrados na Figura 34.

Foi realizada análise de variância para se avaliar o efeito de diferentes tempos de incubação do extrato bruto enzimático sobre a atividade enzimática, onde se observou que houve efeito significativo. A análise de variância está descrita em Anexo, Tabela 10.

Figura 34. Atividade de α -amilase de *B.amyloliquefaciens* VR002 avaliada em diferentes tempos de incubação. Extrato bruto enzimático na concentração de 0,15 mL, incubado a 45 °C, em meio contendo substrato na concentração de 1,5% e pH 7. Micro-organismo crescido a 30 °C, 150 rpm por 24h e pH inicial de 6,5. As barras representam o desvio padrão.



*Letras iguais não diferem entre si estatisticamente, pelo teste de Scott-Knott com significância de 5%.

De acordo com a Figura 34, observa-se máxima atividade enzimática em U/ml no tempo de incubação de 5 minutos. Observa-se que os tempos de incubação de 30, 40, 50 e 60 minutos foram estatisticamente iguais e inferiores aos demais tempos de incubação, os tempos de 15 e 20 minutos foram estatisticamente iguais e superiores àqueles. De acordo com os resultados obtidos, pode-se observar uma atividade nove vezes maior no tempo de incubação de 5 minutos comparado com o tempo de 30 minutos, o qual era utilizado anteriormente.

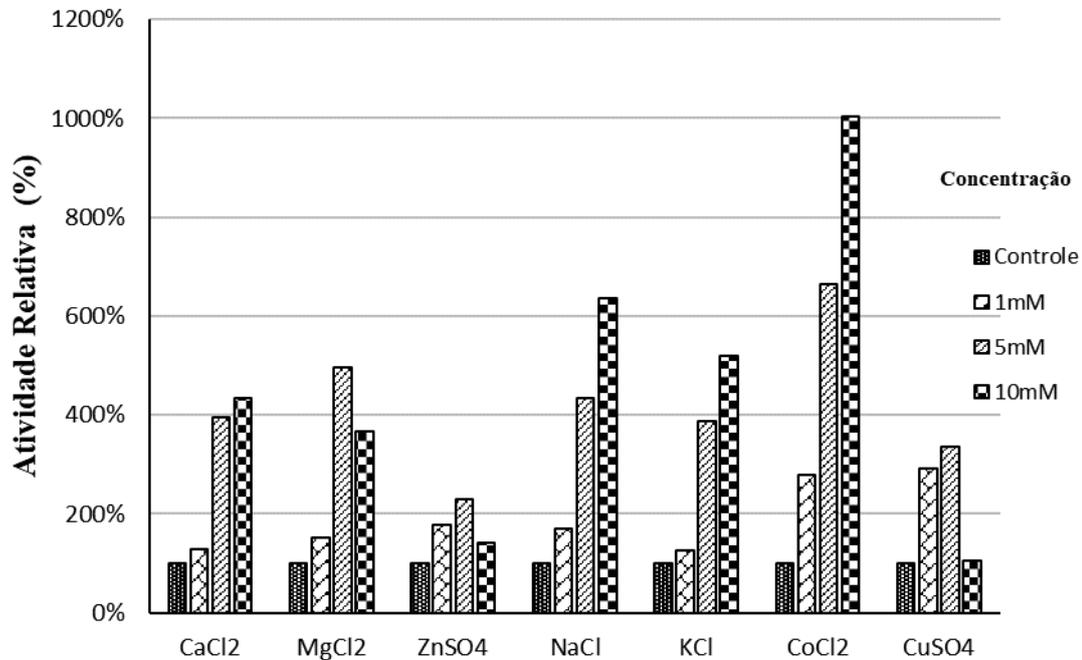
Deb et al. (2013) ao estudarem a produção de α -amilase por *Bacillus amyloliquefaciens* encontraram resultado que destoa do presente trabalho, verificaram que no tempo de incubação da enzima de 40 minutos obteve-se máxima atividade enzimática, para tanto, foram verificados os tempo 5 a 50 minutos em intervalos de 5 minutos observando-se um aumento crescente até o tempo de 35 minutos e logo após a estabilização da atividade enzimática.

6.9 EFEITO DE CÁTIONS SOBRE A ATIVIDADE DE α -AMILASE

Foi realizado experimento para se avaliar o efeito de cátions sobre a atividade da enzima α -amilase, desta forma, o meio de cultura foi incubado por 24h, na temperatura de 30 °C, a 150 rpm e com pH inicial de 6,5 e para a avaliação da atividade enzimática de α -amilase, o extrato bruto enzimático foi incubado no gelo por 10 minutos na presença de Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Co^{2+} , Zn^{2+} e Cu^{2+} , individualmente, nas concentrações de 1, 5 e 10 mM. A atividade enzimática residual foi determinada de acordo com o item 5.1.1, porém com a temperatura, pH, concentração de extrato bruto enzimático, concentração de substrato e tempo de incubação, já otimizados. O extrato bruto enzimático foi incubado na ausência de metais, como controle, e o resultado foi considerado como 100% de atividade, os resultados estão apresentados na Figura 35. Foi realizada análise de variância para se avaliar o efeito de diferentes cátions em diferentes concentrações sobre a atividade enzimática. A análise de variância está descrita em Anexo, Tabela 11.

De acordo com a Figura 35, observa-se que não houve inibição da atividade enzimática por nenhum dos cátions, pelo contrário, a presença de cátions no meio reacional estimulou a atividade de α -amilase. Zn^{2+} foi o íon que menos estimulou a atividade enzimática, por sua vez, a adição de CoCl_2 ao extrato bruto enzimático aumentou a atividade enzimática em aproximadamente 1004%.

Figura 35. Atividade relativa de α -amilase de *B. amyloliquefaciens* VR002 sob o efeito de diferentes cátions. A atividade é expressa como porcentagem da atividade obtida na ausência de cátions (Controle =100% de atividade enzimática).



De acordo com a Figura 35, observa-se que a adição de cálcio na concentração de 10 mM aumentou em 4,3 vezes a atividade de α -amilase, o magnésio na concentração de 5 mM aumentou em 4,9 vezes a atividade, já a adição de potássio na concentração de 10 mM aumentou em 5,2 vezes a atividade da enzima; a adição de sódio na concentração de 10 mM aumentou em 6,3 vezes a atividade, porém nada comparável quando se utilizou o cobalto na concentração de 10 mM, aumentando assim em 10 vezes a atividade de α -amilase. Os cátions que registraram desempenho menor, porém satisfatórios, foram cobre e zinco, ambos na concentração de 5 mM, aumentando a atividade em 3,3 e 2,3 vezes, respectivamente. Portanto, o cobalto na concentração de 10 mM foi o cátion mais adequado, dentre os cátions analisados, para se obter a máxima atividade enzimática de α -amilase.

Muitas amilases são metaloenzimas, possuindo um íon metálico com importante papel na atividade catalítica (LÉVÊQUE et al., 2000). Geralmente, as α -amilases requerem Ca^{2+} para sua função e estabilização (SAJEDI et al., 2005). Neste sentido, Teodoro e Martins (2000) concluíram que a adição de 10 mM de cálcio no meio de cultura aumentou em 1,2 vezes, aproximadamente, a síntese de α -amilase por *Bacillus sp.*, assim como Konsula e Liakopoulou-Kyriakides (2007) investigando o efeito de cátions divalentes inseridos no meio

de cultura de *Bacillus subtilis* para a produção de α -amilase, relataram que a utilização de íons cálcio na concentração de 0,0075% w/v foi fundamental para a síntese da enzima. No presente trabalho, a adição de cálcio no meio reacional influenciou positivamente a atividade da enzima, na concentração de 10 mM o cálcio aumentou a atividade enzimática aproximadamente 4,3 vezes, porém outros cátions obtiveram resultados melhores.

Contudo, em outros trabalhos como o de Singh et al. (2012), que investigando a produção de α -amilase por *Streptomyces sp* na presença de diferentes íons metálicos no meio de cultura, identificaram que Mn^{2+} , Mg^{2+} e Co^{2+} estimularam a produção da enzima, Mg^{2+} e Co^{2+} , ambos na concentração de 0,05% aumentaram a atividade em aproximadamente 17 e 15 %, respectivamente, já os cátions Pb^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mo^{2+} , Ca^{2+} e Sn^{2+} inibiram a produção de α -amilase, enquanto que Hg^{2+} não influenciou a produção da enzima. Resultado semelhante foi descrito por Mitidieri et al. (2006) estudando o efeito de vários íons metálicos, na concentração de 4 mM, sobre a atividade enzimática de α -amilase por *Aspergillus niger*, descobriram que quando se adicionou ao meio reacional Cu^{2+} , Zn^{2+} e Fe^{2+} a atividade enzimática caiu drasticamente, sendo que com a adição de Cu^{2+} a atividade da enzima caiu aproximadamente 96%, já na presença de Ca^{2+} e Mg^{2+} a atividade enzimática não foi afetada. Neste sentido, Sajedi et al. (2005) relataram que a presença de K^+ , Mg^{2+} , Na^+ e Ca^{2+} na concentração de 5 mM não influenciaram na atividade de α -amilase produzida por *Bacillus sp.* diferente do presente trabalho, onde todos esses cátions influenciaram positivamente a atividade da enzima elevando a atividade em pelo menos 26%.

Algumas amilases não requerem obrigatoriamente nenhum tipo de íon metálico divalente para a atividade, nem são estimuladas na presença desses íons (YANG e LIU, 2004), desta forma, Ali et al. (2015) investigando a produção de α -amilase por *Aspergillus penicillioides*, estudaram o efeito de diferentes íons metálicos, no meio reacional na concentração de 2 mM, sobre a atividade enzimática e identificaram que a utilização de $CaCl_2$ aumentou a atividade enzimática discretamente, já com $ZnCl_2$, na mesma concentração a atividade caiu drasticamente, sendo que a adição de $MgCl_2$ não alterou a atividade enzimática. Hashim et al. (2005), observaram um efeito inibitório de α -amilase produzida por *Bacillus halodurans* quando na presença de Ca^{2+} , Cu^{2+} e Mn^{2+} no meio reacional, na concentração de 5mM, sendo que na presença de Ca^{2+} a atividade caiu aproximadamente 40% e para os cátions Cu^{2+} e Mn^{2+} não foi registrada atividade enzimática, no entanto, a presença de Co^{2+} , na concentração de 1 mM, aumentou a atividade em 5%, diferente do presente trabalho, onde foi registrado aumento da atividade enzimática de α -amilase na presença destes mesmos cátions nas concentrações de 1, 5 e 10 mM.

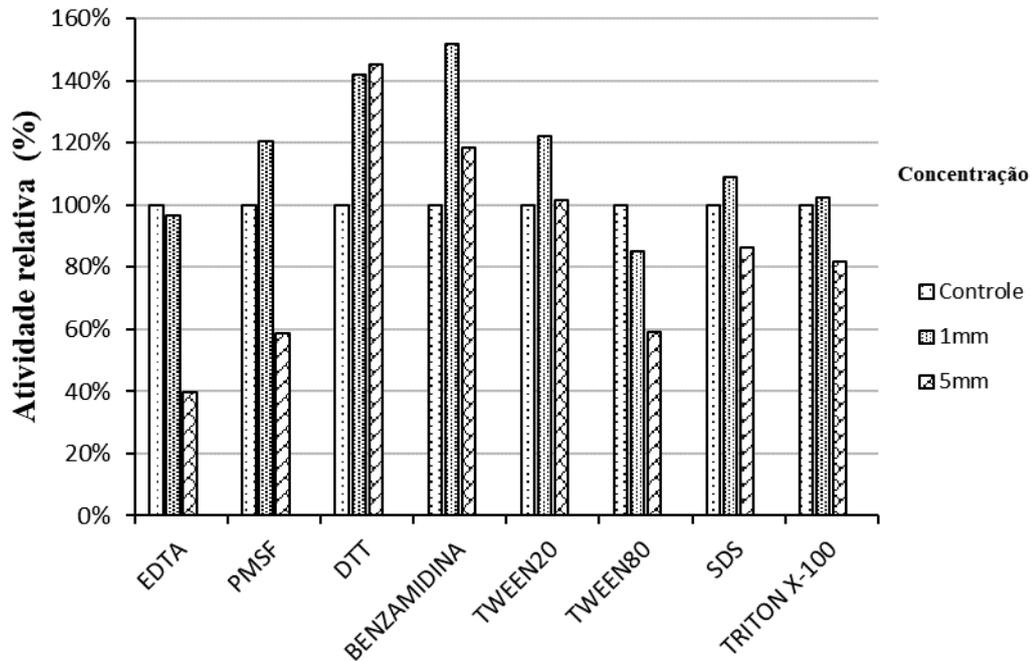
Srivastava e Baruah (1986) relataram que os íons Ca^{2+} , Mg^{2+} e Ba^{2+} induziram a produção de α -amilase, enquanto que Cu^{2+} e Fe^3 inibiram sua produção, e íons Zn^{2+} e Mn^{2+} não afetaram a produção da enzima por *Bacillus stearothermophilus*, em contraste com os mencionados autores a amilase de *B. amiloliquefaciens* VR002 não sofreu inibição, tampouco ficou indiferente à exposição aos diferentes cátions, havendo aumento de atividade na presença de Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} e Zn^{2+} tanto nas concentrações de 1, 5 e 10 mM.

Desta forma, conclui-se que, embora as α -amilases possuam função catalítica semelhante, elas possuem cadeias de aminoácidos diferentes, além disso provêm de uma diversidade de organismos (HOMAEI et al., 2016), deste modo cada α -amilase é afetada de maneiras distintas na presença de íons metálicos, embora o mais relatado na literatura seja o estímulo causado na presença de cálcio, constata-se que não é uma regra.

6.10 EFEITO DE INIBIDORES E DETERGENTES SOBRE A ATIVIDADE DE α -AMILASE

Para a determinação do efeito de alguns inibidores e detergentes na atividade de α -amilase foi realizado experimento incubando-se o meio de cultura por 24h, na temperatura de 30 °C, a 150 rpm e com pH inicial de 6,5 e para a avaliação da atividade de α -amilase, o extrato bruto enzimático foi incubado no gelo por 10 minutos na presença de SDS (dodecil sulfato de sódio), EDTA (ácido etileno diamino tetracético), PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonil), DTT (ditiotretol), Benzamidina, TRITON X100, TWEEN 20 e TWEEN 80, individualmente, na concentração final de 1 e 5 mM. Após o período de pré-incubação foi adicionado à mistura, 0,5ml de substrato (solução de amido 1,5%). A atividade enzimática residual foi determinada de acordo com o item 5.1.1, porém com o temperatura, pH, concentração de extrato bruto enzimático, concentração de substrato e tempo de incubação, já otimizados. O extrato bruto enzimático foi incubado na ausência de quaisquer substâncias, como controle, e o resultado foi considerado como 100% de atividade, os resultados estão apresentados na Figura 36. Foi realizada análise de variância para se avaliar o efeito de diferentes inibidores e detergentes em diferentes concentrações sobre a atividade enzimática. A análise de variância está descrita em Anexo, Tabela 12.

Figura 36. Atividade relativa de α -amilase de *B. amyloliquefaciens* VR002 sob efeito de inibidores e detergentes. A atividade é expressa como porcentagem da atividade obtida na ausência de qualquer substância (Controle = 100% de atividade enzimática).



De acordo com a Figura 36, pode-se observar que a adição de EDTA no meio reacional na concentração de 1 mM provocou uma queda na atividade da enzima de aproximadamente 4%, já na concentração de 5 mM a atividade caiu cerca de 60%. Na presença de PMSF na concentração de 1 mM a atividade aumentou em aproximadamente 24%, já na concentração de 5 mM houve decréscimo da atividade de aproximadamente 40%. Na presença de benzamidina, a atividade de α -amilase aumentou nas duas concentrações analisadas, sendo maior na concentração de 1 mM, cerca de 52%. Na presença de Tween 20, houve aumento na atividade enzimática, sendo maior na concentração de 1 mM, aproximadamente 20%, já na presença de Tween 80 houve decréscimo da atividade enzimática nas concentrações de 1 e 5 mM. A adição de Triton x-100 no meio reacional não interferiu na atividade da enzima quando utilizado na concentração de 1 mM. O uso de SDS, um detergente aniônico, potente agente desnaturante de proteína, no meio reacional aumentou a atividade enzimática, na concentração de 1 mM, em aproximadamente 12%. Quando se utilizou o DTT no meio reacional, houve aumento da atividade em todas as concentrações

analisadas, na concentração de 5 mM, o aumento foi de aproximadamente 45%, sugerindo a ausência de quaisquer grupos dissulfeto críticos

Resultado semelhante foi relatado por Ballschmiter et al. (2006) que ao estudarem o efeito de DTT sobre a atividade enzimática de α -amilase produzida por *Thermotoga maritima* observaram um aumento na atividade de aproximadamente 350% com o uso de DTT na concentração de 10 mM. No presente trabalho também foi observado aumento na atividade enzimática de aproximadamente 45% com a adição de DTT na concentração de 5 mM.

Além de possuir estabilidade ao pH e à temperatura, a amilase apropriada para uso em detergentes deve também possuir estabilidade na presença de substâncias que compõe sua fórmula, como surfactantes, agentes quelantes e oxidantes (SAXENA et al., 2007)

Konsula e Liakopoulou-Kyriakides (2007) investigando a produção de α -amilase por *Bacillus subtilis* verificaram que a adição de Tween 20 e Triton X-100 nas concentrações de 0,01 e 0,1 % respectivamente, no meio de cultura, suprimiram o crescimento bacteriano e a produção da enzima. No presente trabalho a presença de Tween 20 e Triton X-100 no meio reacional na concentração de 1 mM não diminui a atividade enzimática, porém o na concentração de 5 mM de Triton x-100 provocou queda de aproximadamente 20% na atividade de α -amilase, já o uso de Tween 20, nesta mesma concentração, não alterou a atividade da enzima.

Ali et al. (2015) investigando a produção de α -amilase por *Aspergillus penicillioides* constataram que o uso de EDTA no meio reacional na concentração de 2 mM inibiu a atividade enzimática. Resultado semelhante foi encontrado no presente trabalho onde o uso de EDTA nas concentrações de 1 e 5 mM ocasionou queda na atividade enzimática de aproximadamente 3 e 60%, respectivamente.

Hashim et al. (2005) estudando a produção de α -amilase por *Bacillus halodurans*, verificaram que a presença no meio reacional de DTT não influenciou a atividade enzimática, tanto na concentração de 1 mM quanto na de 5 mM, já a presença de EDTA na concentração de 1 mM, a atividade enzimática caiu cerca de 40% e na concentração de 5 mM, não foi registrada atividade enzimática. A adição de SDS ao meio reacional nas concentrações de 0,1; 0,5 e 1% não afetou a atividade da enzima, porém na concentração de 5% a atividade caiu cerca de 57%. No presente trabalho, a adição de EDTA no meio reacional na concentração de 5 mM diminuiu a atividade em cerca de 60%, resultado diferente foi encontrado por Sajedi et al. (2005), que relataram que a presença EDTA na concentração de 5 mM não influenciou a atividade de α -amilase produzida por *Bacillus sp.*

Srivastava e Baruah (1986) relataram que a adição de Tween 80 e Triton X-100 no meio de cultura de *Bacillus stearothermophilus* aumentaram a biomassa, porém suprimiram a síntese de α -amilase.

Singh et al. (2012), investigando a produção de α -amilase por *Streptomyces sp* na presença de diferentes substâncias no meio de cultura, identificaram que a presença de EDTA na concentração de 0,05% w/v, a atividade da enzima caiu cerca de 10%, na presença de Triton X-100 na concentração de 1% v/v houve queda na atividade enzimática de aproximadamente 30%, porém na presença de Tween 80 na concentração de 1% v/v foi constatado aumento na atividade, cerca de 11%.

7 CONCLUSÕES

A otimização das condições de cultivo e do meio de cultura influenciaram positivamente a produção da enzima e a atividade de α -amilase.

Como era de se esperar a fonte de carbono mais adequada para a produção de α -amilase foi um polissacarídeo, a fécula de batata, aumentando a produção enzimática cerca de 70%. A utilização de glicose como fonte de carbono inibiu completamente a produção enzimática. Desta forma, a secreção de α -amilase por *Bacillus amyloliquefaciens* VR002 demonstrou ser do tipo indutiva.

A produção de α -amilase por *Bacillus amyloliquefaciens* VR002 demonstrou ser independente do crescimento do micro-organismo.

A otimização do meio reacional e das condições de incubação do extrato bruto enzimático influenciaram fortemente a atividade enzimática.

A enzima demonstrou atividade ótima em pH neutro, bem como ótima atividade a temperatura de 45 °C, podendo ser aplicada em processos que sejam próximos as condições fisiológicas.

A α -amilase de *Bacillus amyloliquefaciens* VR002 foi positivamente afetada na presença de íons metálicos. Observou-se que a adição de 10 mM de cobalto aumentou a atividade enzimática em aproximadamente 1.004%.

A atividade de α -amilase na presença de inibidores e detergentes foi afetada, no geral, de forma positiva. A α -amilase demonstrou ser tolerante na presença de detergentes e na presença de EDTA. Na concentração de 1 mM a atividade não foi afetada.

Neste contexto, a α -amilase produzida por *Bacillus amyloliquefaciens* VR002 deve ser mais investigada para possíveis aplicações, o estudo de termoestabilidade e de estabilidade ao pH são importantes, assim como a purificação da enzima.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRAWAL, Manoj et al. Hidrolysis of starch by amylase from *Bacillus sp* KCA102: a statistical approach. *Process Biochemistry*, v.40, n.7, p.2499-2507, 2005.
- AHLAWAT, S. et al. Pectinase production by *Bacillus subtilis* and its potential application in biopreparation of cotton and micropoly fabric. *Process Biochemistry*, v.44, p.521-526, 2009.
- AKASSOU; GROLEAU. Optimization of the production of an extracellular and thermostable amyolytic enzyme by *Thermus thermophilus* HB8 and basic characterization. *Extremophiles*, v.22, n.2, p.189-202, 2018.
- ALEXANDER, S.; MATHIE, A.; PETERS, J. Enzymes. *Bristish Journal of Pharmacology*, v.164, p.279-324, 2011.
- ALI, Imran et al. Purification and characterization of a polyextremophilic α -amylase from an obligate halophilic *Aspergillus penicillioides* isolate and its potential for souse with detergents. *Biomed Research International*, p.8, 2015.
- ALIKHAJEH, J. Structure of *Bacillus amyloliquefaciens* alpha-amylase at high resolution: implications for thermal stability. *Acta Crystallogr.*, v.66, p.121-129, 2010.
- ASGHER, M. et al. A thermostable α -amylase from a moderately thermophilic *Bacillus subtilis* strain for starch processing. *Journal Food Process Engineering*, v.79, p.950-955, 2007.
- BALASUBRAMANIAN, Abinaya et al. Isolation, purification and characterization of proteinaceous fungal alpha amylase inhibitor from rhizome of *Cheilocostus speciosus* (J. Koenig) C.D.Specht. *International Journal of Biological Macromolecules*, v.111, p.39-51, 2018.
- BALL, Steven G.; MORREL, Matthew k. From bacterial glycogen to starch: Understanding the biogenesis of the plant starch granule. *Annual Review of Plant Biology*, v.54, p.207-233, 2003.
- BALLSCHMITER et al. Identification and characterization of a novel intracellular alkaline α -amylase from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima* MSB8. *Applied and Environmental Microbiology*, v.72, n.3, p.2206-2211, 2006.
- BARRY, M.V; MARILYN A.A. Hydrolysis of α -d-glucans and α -d-gluco-oligosaccharides by *cladosporium resinae* glucoamylases. *Carbohydrate Research*, v.86, n.1, p.77-96, 1980.
- BERNFELD, P. Amylases α e β . *Meth. Enzymol*, v.1 p.149-158, 1955.
- BETINI, J.H.A. et al. Xylanases from *Aspergillus niger*, *Aspergillus niveus* and *Aspergillus ochraceus* produced under solid-state fermentation and their application in cellulose pulp bleaching. *Bioprocess Biosystems Engineering*, v.32, n.6, p.819-824, 2009.

BORZANI, W. et al. *Biotecnologia Industrial*. v.1. 1 ed. São Paulo: Edgard Blücher. 2001. 288p.

BURHAN A. et al. Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from alkaliphilic *Bacillus sp.* isolate ANT-6. *Process Biochemistry*, v.38, n.10, p.1397-1403, 2003.

CARVALHO, Raquel Vieira. *Produção e caracterização de alfa amilase por Bacillus sp. SIMIA-2 termofílico utilizando proteínas do soro de leite, e algumas aplicações da enzima*. Campos dos Goytacazes, 2007. 54 f. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, 2007.

CARVALHO et al. Otimização das condições de cultivo para a produção de amilases pelo termofílico *Bacillus sp.* e hidrólise de amido pela ação da enzima. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.28, n.2, p.380-386, 2008.

CHI, Z. et al. *Saccharomycopsis fibuligera* and its application in biotechnology. *Biotechnology Advances*, v.27, n.4, p.423-431, 2009.

CORDEIRO, A.M.C; MARTINS, M.L.L; LUCIANO A.B. Production and properties of alpha amylase from thermophilic *Bacillus sp.* *Brazilian Journal of Microbiology*, v.33, n.1, p.57-61, 2002.

COUTO, S.R.; SANROMÁN, M.A. Application of solid-state-fermentation to food industry – A review. *Journal of Food Engineering*, v.76, p.291-302, 2006.

CHU, M.I.; LEE, C.; LI, T.S. Production and degradation of alkaline protease in batch cultures of *Bacillus subtilis* ATCC 14416. *Enzyme and Microbial Technology*, v.14, p.755-761, 1992.

DAIHA, Karina de Godoy et.al. Enzyme technology in Brazil: trade balance and research community. *Brazilian Journal of Science and Technology*, v.3 n.1. p.1-13, 2016.

DEB, P. et al. Production and partial characterization of extracellular amylase enzyme from *Bacillus amyloliquefaciens* P-001. *Springer Plus*, v.2, n.1, 2013.

DECLERCK, Nathalie et al. Probing structural determinants specifying high thermostability in *Bacillus licheniformis* alpha amylase. *Journal of Molecular Biology*, v.301, n.4, p.1041-1057, 2000.

DEMIRKAN, Elif Sarikava 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.

DJEKRIF-DAKHMOCHE, S. et al. Application of a statistical design to the optimization of culture medium for alpha amylase production by *Aspergillus niger* ATCC16404 grow on orange waste powder. *Journal of Food Engineering*, v.73, n.2, p.190-197, 2006.

FERREIRA, D.F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. *In...*45ª Reunião Anual da Região Brasileira da Sociedade Internacional de Biometria. UFSCar, São Carlos, SP, p.255-258, 2000.

FINCAN et al. Purification and characterization of thermostable α -amylase from thermophilic *Anoxybacillus flavithermus*. *Carbohydrate Polymers*, v.102, p.144-150, 2014.

Focus on Catalysts. Global industrial enzymes market: a comprehensive analysis. *Science Direct*. Elsevier B.V. v.2011, n.1, p.1-2, 2011.

GALDINO, Alexandro Sobreira. Clonagem e expressão de uma alfa amilase de *Cryptococcus flavus* e sua aplicação na degradação do amido. Brasília, 2008. 123 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

GOMES, E. et al. Thermostable enzymes: sources, production and industrial applications. *Química Nova*, v.30, n.1, p.136-145, 2007.

GOMES, I. et al. Highly thermostable amylase and pullulanase of the extreme thermophilic eubacterium *Rhodothermus marinus*: production and partial characterization. *Bioresource Technology*, v.90, p.207-214, 2003.

GOYAL, N.; GUPTA, J.K.; SONI, S.K. A novel raw starch digesting thermostable α -amylase from *Bacillus sp.* I-3 and its use in the direct hydrolysis of raw potato starch. *Enzyme Microbiology Technology*, v.37, p.723-734, 2005.

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

HAKI, G.D. RAKSHIT, S.K. Developments in industrially important thermostable enzymes. *Bioresource Technology*, v.89, n.1, p.17-34, 2003.

HAMILTON, L.M.; KELLY, C.T.; FOGARTY, W.M. Production and properties of the raw starch digesting α -amylase of *Bacillus sp.* IMD 435. *Process Biochemistry*, v.35, p.27-31, 1999.

HAMZAH, F. et al. Preliminary study on enzymatic hydrolysis of treated oil palm (*Elaeis*) empty fruit bunches fibre by using combination of cellulose and β 1,4 glucosidase. *Biomass Bioenergy*, v.35, p.1055-1059, 2011.

HAQ, I. et al. Production of alpha amylase by *Bacillus licheniformis* using an economical medium. *Bioresource Technology*, v.87, n.1, p.57-61, 2003.

HAQ, I. et al. Pearl millet, a source of alpha amylase production by *Bacillus licheniformis*. *Bioresource Technology*, v.96, n.10, p.1201-1204, 2005.

HASHIM, S.O. et al. Alkaline active maltohexaose forming α -amylase from *Bacillus halodurans* LBK 34. *Enzyme and Microbial Technology*, v.36, p.139-146, 2005.

HMIDET, N. et al. Alkaline proteases and thermostable α -amylase co-produced by *Bacillus licheniformis* NH1: Characterization and potential application as detergent additive. *Biochemical Engineering Journal*, v.47, p.71-79, 2009.

HOMAEI, Ahmad; GHANBARZADEH, Mehri; MONSEF, Ferial. Biochemical features and kinetic properties of alpha amylases from marine organisms. *International Journal of Biological Macromolecules*, v.83, p.306-314, 2016.

IBRAHIM et al. *Bacillus licheniformis* BT5.9 isolated from Changar Hot Spring, Malang, Indonesia, as a potential producer of thermostable α -amylase. *Tropical Life Sciences Research*, v.24, n.1, p.71-84, 2013.

International Union of Biochemistry and Molecular Biology. Disponível em <<http://sbcs.qmul.ac.uk/iubmb/EC3/2/1/1.html>>. Acesso 23 de outubro de 2018.

IULEK, J. et al. Purification, biochemical, characterisation and partial primary structure of a new α -amylase inhibitor from *Secale cereale*. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, v.32, p.1195-1204, 2000.

JAEGER, Karl Erich; REETZ, Manfred T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends in Biotechnology*, v.16, n.9, p.396-403, 1998.

JIN, F. et al. Thermostable α -amylase and α -galactosidase production from the thermophilic and aerobic *Bacillus sp.* JF strain. *Process Biochemistry*, v.36, n.6, p.559-564, 2001.

JOO, Han-Seung; CHANG, Chung-Soon. Production of protease from a new alkalophilic *Bacillus sp.* I-312 grow on soybean meal: optimization and some properties. *Process Biochemistry*, v.40, p.1263-1270, 2005.

KIRK, Ole; BORCHERT Torben Vedel; FUGLSANG Claus Crone. Industrial enzyme application. *Current Opinion in Biotechnology*, v.13, n.4, p.345-351, 2002.

KOCABAY, Samet et al. Characterization of thermostable β -amylase isozymes from *Lactobacillus fermentum*. *International Journal of Biological Macromolecules*, v.93, p.195-202, 2016.

KONSOULA, Zoe; LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES, Maria. Hydrolysis of starches by the action of an alpha amylase from *Bacillus subtilis*. *Process Biochemistry*, v.39, p.1745-1749, 2004.

KONSOULA, Zoe; LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES, Maria. Co-production of alpha amylase and beta galactosidase by *Bacillus subtilis* in complex organic substrates. *Bioresource Technology*, v.98, n.1, p.150-157, 2007.

KUMAR, C. Ganesh; TAKAGI, Hiroshi. Microbial alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint. *Biotechnology Advances*. v. 17, n. 4, p.561-594, 1999.

KÜHNE, F.W. Untersuchungen aus dem Physiologischen. *Institute Heidelberg*, v.1, p.291-324, 1878.

KUNAMNENI, A.; PERMAUL, K.; SINGH, S. Amylase production in solid-state fermentation by the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v.100, n.2, p.168-171, 2005.

KRISHNAN, T; CHANDRA, A.K. Purification and characterization of alpha amylase from *Bacillus licheniformis* CUM305. *Applied and Environmental Microbiology*, v.46, n.2, p.430-437, 1983.

LAJOLO, F.M; MENEZES, E.W. *Carbohidratos en alimentos regionales iberoamericanos*. São Paulo: Universidade de São Paulo. 2006. 648p.

LEMOS, J. et al. Xylanase production by *Aspergillus awamori* in solid-state-fermentation and influence of different nitrogen sources. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.91, n.3, p.681-689, 2001.

LÉVÊQUE, E. et al. Thermophilic archaeal amylolytic enzymes. *Enzyme and Microbial Technology*, v.26, n.1, p3-14, 2000.

LI, Zhu et al. Improving the reversibility of thermal denaturation and catalytic efficiency of *Bacillus licheniformis* α -amylase through stabilizing a long loop in domain B. *Plos one*, v.12, n.3, 2017.

LIN, Long-Liu; CHYAU, Charng-Cherng; HSU, Wen-Hwei. Production and properties of a raw starch degrading amylase from the thermophilic and alkaliphilic *Bacillus sp.*TS-23. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, v.28, n.1, p.61-68, 1998.

LINEWEAVER, H; BURK. D. The determination of enzyme dissociation constants. *Journal of the American Chemical Society*, v.56, n.3, p.658-666, 1934.

LIU et al. A highly active alpha amylase from *Bacillus licheniformis*: Directed evolution, enzyme characterization and structural analysis. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, v.24, n.7, p.898-904, 2014.

MAAREL Marc J.E.C et al. Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. *Journal of Biotechnology*, v.94, p.137-155, 2002.

MADHU, A; CHAKRABORTY, J.N. Developments in application of enzymes for textile processing. *Journal of Cleaner Production*, v.145, p.114-133, 2017.

MELO, Priscila Siqueira et al. Composição fenólica e atividade antioxidante de resíduos agroindustriais. *Ciência Rural*, v.41, n.6, p.1088-1093, 2011.

MESSAOUD, E. et al. Purification and properties of a maltoheptaose and maltohexaose forming amylase produced by *Bacillus subtilis* US116. *Enzyme and Microbial Technology*, v.34, n.7, p.662-666, 2004.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, v.31, n.3, p.426-428, 1959.

- MITIDIERI, S. et al. Enzymatic detergent formulation containing amylase from *Aspergillus Niger*: A comparative study with commercial detergent formulations. *Bioresource Technology*, v.97, p.1217-1224, 2006.
- NEERAJ, S. et al. Effect of different carbon and nitrogen sources on alpha-amylase production from *Bacillus amyloliquefaciens*. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, v.3, n.4, p.1161, 2012.
- NELSON, David L; COX, Michael M. *Princípios de bioquímica de Lehninger*. 5 ed. Porto Alegre: Artmed. 2011. 1274p.
- NIELSEN, J.E.; BORCHERT, T.V. Protein engineering of bacterial alpha amylases. *Biochimica Et Biophysica Acta*, v.1543, n.2, p.253-274, 2000.
- NIGAM, Poonam; SINGH, Dalel. Enzyme and microbial systems involved in starch processing. *Enzyme and Microbial Technology*, v.17, n.9, p.770-778, 1995.
- NOVOZYMES. Disponível em <<http://novozymes.com>>. Acesso 24 de julho de 2017.
- PANDEY, A. et al. Advances in microbial amylases. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, v.31, n.2, p.135-152, 2000.
- PANDEY, A. et al. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. *Bioresource Technology*, v.74, n.1, p.69-80, 2000.
- PEDERSEN, H.; NIELSEN, J. The influence of nitrogen sources on the α -amylase productivity of *Aspergillus oryzae* in continuous cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.53, n.3, p.278-281, 2000.
- PELCZAR, Michael J. Jr.; CHAN, E.C.S; KRIEG, Noel R. *Microbiologia; conceitos e aplicações*. v.1. 2 ed. São Paulo: Pearson Makron Books. 1997. 524p.
- PELCZAR, Michael J. Jr.; CHAN, E.C.S; KRIEG, Noel R. *Microbiologia; conceitos e aplicações*. v.2. 2 ed. São Paulo: Pearson Education do Brasil. 1997. 517p.
- PELIZER, L.H.; PONTIERI, M.H.; MORAES, I.O. Utilização de resíduos agroindustriais em processos biotecnológicos como perspectiva de redução de impacto ambiental. *Journal of Technology Management and Innovation*, v.2, n.1, p.118-127, 2007.
- PIMENTEL, F.G. *Curso de estatística experimental*. 14 ed. Piracicaba: Nobel, 2000. 477p.
- RAY, R.R; NANDA G. Microbial beta amylases: biosynthesis, characteristics and industrial applications. *Critic Review Microbiology*, v.22, p.181-199, 1996.
- SAJEDI, R.H. et al. A Ca independent α -amylase that is active and stable at low pH from the *Bacillus sp.* KR-8104. *Enzyme and Microbial Technology*, v.36, p.666-671, 2005.
- SALMAN et al. Medium optimization for the production of amylase by *Bacillus subtilis* RM16 in shake –flask fermentation. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.29, n.2, p.439-444, 2016.

- SANCHEZ, O.J.; CARDONA, C.A. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresource Technology*, v.99, n.13, p.5270-5295, 2008.
- SANTOS, Rafaela Cristiane Andrade, et al. Evaluation of temperature and moisture response surface on the lipase from pumpkin seeds fermentation using *Aspegillus niger*. *Acta Scientiarum Technology*, v.34, n.3, p.255-260, 2012.
- SARIKAYA, Elif et al. Comparison of degradation abilities of alpha amylase and beta amylase on raw starch granules. *Process Biochemistry*, v.35, n.7, p.711-715, 2000.
- SAXENA, Rajendra Kumar et al. A highly thermostable and alkaline amylase from a *Bacillus* sp. PN5. *Bioresource Technology*, v.98, n.2, p.260-265, 2007.
- SENNUR, O. et al. Optimization of thermostable alpha-amylase production from *Geobacillus* sp. D413. *The Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Science*, v.6, n.1, p.698-694, 2016.
- SHARMA, A. e SATYANARAYANA, T. Optimization of medium components and cultural variables for enhanced production of acid high maltose forming and Ca⁺ independent α -amilase by *Bacillus acidicola*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v.111, n.5, p.550-553, 2011.
- SHARMA, K. et al. Isolation, identification and optimization of culture conditions of *Bacillus* sp. strain PM1 for alkalo-thermostable amylase production. *British Microbiology Research Journal*, v.4, n.4, p.369-380, 2014.
- SIMAIR et al. Production and partial characterization of α -amylase enzyme from *Bacillus* sp BCC 01-50 and potential applications. *Biomed Research International*, v.2017, p.1-9, 2017.
- SINGH, Narpinder et al. Morphological, thermal and rheological properties of starch from different botanical sources. *Food Chemistry*, v.81, n.2, p.219-231, 2003.
- SINGH, Renu; KAPOOR, Vishal; KUMAR, Vijay. Production of thermostable, Ca⁺² independent, maltose producing alpha amylase by *Streptomyces* sp. MSC702 (MTCC 10772) in submerged fermentation using agro residues as sole carbon source. *Annals of Microbiology*, v.62, n.3, p.1003-1012, 2012.
- SODHI, H.K. et al. Production of thermostable α -amylase from *Bacillus* sp. PS-7 by solid-state fermentation and its synergistic use in the hydrolysis of malt starch for alcohol production. *Process Biochemistry*, v.40, p.525-534, 2005.
- SOUZA, P.M.; MAGALHÃES P.O. Application of microbial α -amylase in industry – a review. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.41, p.850-861, 2010.
- SPREINANT, A.; ANTRANIKIAN. Purification and properties of a thermostable pullulanase α from *Clostridium thermosulfurogenes* EM1 which hydrolyses both α -1,6 and α -1,4 glycosidic linkages. *Appl. Microbiology Biotechnology*, v.33, p.511-518, 1990.

SREEKANTH, M. et al. Effect of carbon and nitrogen sources on simultaneous production of α -amylase and green food packaging polymer by *Bacillus sp.* CRF67. *Journal of Food Science and Technology*, v.50, n.2, p.404-408, 2013.

SRIVASTAVA, R.A.K; BARUAH, J.N. Culture conditions for production of thermostable amylase by *Bacillus stearothermophilus*. *Applied and Environmental Microbiology*, v.52, n.1, p.179-184, 1986.

STAMFORD, T.L. et al. Production and characterization of a thermophilic alpha amylase from *Nocardiopsis sp.* endophyte of yam bean. *Bioresource Technology*, v.76, p.137-141, 2001.

STEPHENSON, Atsushi et al. The influence of protein folding on late stages of the secretion of alpha amylases from *Bacillus subtilis*. *FEBS Letters*, v.430, n.3, p.385-389, 1998.

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

SUVD, Duvjir et al. Crystal structure of *Bacillus stearothermophilus* α -amylase: Possible factors determining the thermostability. *Journal of Biochemistry*, v.129, n.3, p.461-468, 2000.

TANAKA, Atsushi; HOSHINO, Eiichi. Thermodynamic and activation parameters for the hydrolysis of amylose with *Bacillus* alpha amylase in a diluted anionic surfactant solution. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v.93, n.5, p.485-490, 2002.

TANYILDIZI, M.S; ÖZER, D; ELIBOL, M. Optimization of α -amylase production by *Bacillus sp.* using response surface methodology. *Process Biochemistry*, v.40, n.7, p.2291-2296, 2005.

TEODORO, Carlos Eduardo de Souza; MARTINS, Meire Lelis Leal. Culture conditions for the production of thermostable amylase by *Bacillus sp.* *Brazilian Journal of Microbiology*, v.31, n.4, p.298-302, 2000.

TESTER, Richard F.; KARKALAS, John; QI, Xin. Starch – composition, fine structure and architecture. *Journal of Cereal Science*, v.39, n.2, p.151-165, 2004.

THARANATHAN, Rudrapatnam N. Food derived carbohydrates structural complexity and functional diversity. *Critical Reviews in Biotechnology*, v.22, n.1, p.65-84, 2002.

TORTORA, Gerard, J.; FUNKE, Berdell, R.; CASE, Christine, L. – Microbiologia. 8 ed. Porto Alegre: Artmed. 2005. 894p.

VAN DER VEEN, Bart A. et al. The three transglycosylation reactions catalyzed by cyclodextringlycosyltransferase from *Bacillus circulans* (strain 251) proceed via different kinetic mechanisms. *European Journal of Biochemistry*, v.267, n.3, p.658-665, 2000.

VANDEPUTTE, G.E.; DELCOUR, J.A. From sucrose to starch granule to starch physical behavior: a focus on rice starch. *Carbohydrate Polymers*, v.58, n.3, p.245-266, 2004.

WANDERLEY et al. Biochemical characterization of α -amylase from the yeast *Cryptococcus flavus*. *FEMS Microbiology Letters*, v.231, n.2, p-165-169, 2004.

WANG et al. Characterization and optimization of amylase production in Wang-LB a high producing strain of *Bacillus*. *Appl Biochem Biothechnol*, v.180, n.1, p.136-151, 2016.

YANG, C.H.; LIU, W.H. Purification and properties of a maltotriose producing α -amylase from *Thermobifida fusca*. *Enzyme and Microbial Technology*, v.35, p.254-260, 2004.

YARAS, Ali; SELEN, Veyis; ÖZE, Dursun. Synergistic effects of agro-industrial wastes on alpha amylase production by *Bacillus amyloliquefaciens* in semi solid substrate fermentation. *Pamukkale University Journal of Engineering Sciences*, v.21, n.7, p.314-318, 2015.

YU, L.J. et al. A GH57 family amylopullulanase from deep-sea *Thermococcus siculi*: expression of the gene and characterization of the recombinant enzyme. *Current Microbiology*, v.62, p.222-228, 2011.

ZAREIAN, A. et al. Purification and characterization of a novel amylopullulanase that converts pullan to glucose, maltose and maltotriose and starch to glucose and maltose. *Enzyme and Microbial Technology*, v.46, p.57-63, 2010.

ZEIKUS, J.G. Thermophilic bacteria: Ecology, physiology and technology. *Enzyme and Microbial Technology*, v.1, n.4, p.243-252, 1979.

ANEXO

Tabela 2. Resumo da análise de variância dos dados obtidos do efeito do tempo de cultivo de *B. amyloliquefaciens* VR002 e da concentração de amido no meio de cultura sobre a produção de α -amilase.

| Fator de variação | GL | QM | P>0,05 |
|-------------------|----|----------|--------|
| Tempo (t) | 3 | 43753,96 | * |
| Concentração (C) | 2 | 903,74 | * |
| t x C | 6 | 550,76 | * |
| Erro | 24 | 288,68 | |
| Total | 35 | | |

CV = 9,09%

*Significativo a 5% de significância pelo teste F.

Tabela 3. Resumo da análise de variância dos dados obtidos do efeito da temperatura de cultivo de *B. amyloliquefaciens* VR002 e da temperatura de incubação do extrato bruto enzimático sobre a atividade enzimática.

| Fator de variação | GL | QM | P>0,05 |
|-------------------|----|----------|--------|
| Cultivo (Tc) | 3 | 66509,45 | * |
| Incubação(Ti) | 4 | 1233,4 | * |
| Tc x Ti | 12 | 131,91 | * |
| Erro | 40 | 41,23 | |
| Total | 59 | | |

CV= 9,1%

*Significativo a 5% de significância pelo teste F.

Tabela 4. Resumo da análise de variância dos dados obtidos do efeito do pH inicial no meio de cultura de *B. amyloliquefaciens* VR002 e do pH de incubação da enzima sobre a atividade enzimática.

| Fator de variação | GL | QM | P>0,05 |
|-------------------|----|-----------|--------|
| pH inicial (pHi) | 5 | 122490,89 | * |
| pH Enzima (pHE) | 6 | 4704,53 | * |
| pHi x pHE | 30 | 367,27 | * |
| Erro | 42 | 39,82 | |
| Total | 83 | | |

CV= 10,87%

*Significativo a 5% de significância pelo teste F.

Tabela 5. Resumo da análise de variância dos dados obtidos do efeito de diferentes fontes de nitrogênio no meio de cultura de *B. amyloliquefaciens* sobre a produção de α -amilase.

| Fator de variação | GL | QM | P>0,05 |
|-----------------------|----|---------|--------|
| Fonte nitrogênio (fN) | 7 | 4617,79 | * |
| Erro | 8 | 49,11 | |
| Total | 15 | | |

CV= 8,38%

*Significativo a 5% de significância pelo teste F.

Tabela 6. Resumo da análise de variância dos dados obtidos do efeito de diferentes concentrações de extrato de carne, como fonte de nitrogênio no meio de cultura sobre a produção de α -amilase.

| Fator de variação | GL | QM | P>0,05 |
|-------------------------------------|----|-------|--------|
| Concentração extr. de carne (Ec) | 5 | 244,6 | * |
| Erro | 6 | 26,23 | |
| Total | 11 | | |

VC= 2,82%

*Significativo a 5% de significância pelo teste F.

Tabela 7. Resumo da análise de variância dos dados obtidos do efeito de diferentes fontes de carbono no meio de cultura sobre a produção de α -amilase

| Fator de variação | GL | QM | P>0,05 |
|-------------------|----|---------|--------|
| Fontes carb. (Fc) | 8 | 5424,71 | * |
| Erro | 9 | 29,51 | |
| Total | 17 | | |

CV= 9,36%

*Significativo a 5% de significância pelo teste F.

Tabela 8. Resumo da análise de variância dos dados obtidos do efeito de diferentes concentrações de pré-inóculo no meio de cultura sobre a produção de α -amilase.

| Fator de variação | GL | QM | P>0,05 |
|-------------------|----|-------|--------|
| Pré-inóculo (In) | 6 | 577,9 | * |
| Erro | 7 | 11,3 | |
| Total | 13 | | |

VC= 1,46%

*Significativo a 5% de significância pelo teste F.

Tabela 9. Resumo da análise de variância dos dados obtidos do efeito de diferentes concentrações de substrato e diferentes concentrações de extrato bruto enzimático na atividade de α -amilase.

| Fator de variação | GL | QM | P>0,05 |
|-------------------|----|----------|--------|
| Enzima (E) | 8 | 61926,94 | * |
| Substrato (S) | 4 | 67651,73 | * |
| E x S | 12 | 3223,84 | * |
| Erro | 20 | 220,43 | |
| Total | 39 | | |

CV= 8,56%

*Significativo a 5% de significância pelo teste F.

Tabela 10. Resumo da análise de variância dos dados obtidos do efeito de diferentes tempos de incubação da enzima sobre a atividade de α -amilase.

| Fator de variação | GL | QM | P>0,05 |
|-----------------------------|----|------------|--------|
| Tempo de incubação (Tin) | 7 | 1095212,47 | * |
| Erro | 16 | 3650,26 | |
| Total | 23 | | |

VC= 11,03%

*Significativo a 5% de significância pelo teste F.

Tabela 11. Resumo da análise de variância dos dados obtidos do efeito de diferentes cátions em diferentes concentrações sobre a atividade de α -amilase de *B. amyloliquefaciens* VR002.

| Fator de variação | GL | QM | P>0,05 |
|-------------------|----|-----------|--------|
| Cátion (C) | 6 | 872033,1 | * |
| Concentração (c) | 3 | 3780815,9 | * |
| C x c | 18 | 394521 | * |
| Erro | 28 | 6294,3 | |
| Total | 55 | | |

CV= 9,13%

*Significativo a 5% de significância pelo teste F.

Tabela 12. Resumo da análise de variância dos dados obtidos do efeito de diferentes inibidores e detergentes em diferentes concentrações sobre a atividade de α -amilase.

| Fator de variação | GL | QM | P>0,05 |
|----------------------------------|----|-----------|--------|
| Inibidores e Detergentes (ID) | 7 | 790417,3 | * |
| Concentração (c) | 2 | 1636497,7 | * |
| I x c | 14 | 160457,7 | * |
| Erro | 24 | 6881,3 | |
| Total | 47 | | |

CV= 5,73%

*Significativo a 5% de significância pelo teste F.