



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS - UFAM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA TROPICAL – PGATR

**Caracterização das amilases produzidas por isolados de rizóbios e mutantes
de *Bacillus* sp. provenientes de solos amazônicos**

Cassiane Minelli de Oliveira

Manaus, Amazonas

Junho de 2013



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS - UFAM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA TROPICAL – PGATR

**Caracterização das amilases produzidas por isolados de rizóbios e mutantes
de *Bacillus* sp. provenientes de solos amazônicos**

Cassiane Minelli de Oliveira
Orientador: Professor Dr. José Odair Pereira
Co-orientador: Professor Dr. Spartaco Astolfi Filho

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Agronomia Tropical/UFAM, como parte dos requisitos
para obtenção do título de mestre em Ciências Agrárias.

Manaus, Amazonas

Junho de 2013

AGRADECIMENTOS

A Deus pela oportunidade de realizar este curso de pós-graduação e ter aprendido, não só as matérias ensinadas, mas também, a ver o mundo com olhos mais experientes.

À Universidade Federal do Amazonas, ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia Tropical e ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia pela estrutura necessária para a realização deste trabalho.

Ao professor Dr. José Odair Pereira por ter possibilitado a realização deste projeto, confiando no meu potencial desde o começo, pela amizade e o apoio durante todo o trabalho.

Aos queridos companheiros do Laboratório de Microbiologia do Solo do INPA, pelo companheirismo nas horas de trabalho.

Ao CNPq pela bolsa de estudo e suporte financeiro à pesquisa, através do projeto “Obtenção de microrganismos da Amazônia produtores de metabólitos de importância econômica e ecológica”, edital Bionorte.

À minha família, meu pai, Luiz Antonio de Oliveira, e à minha mãe Eliana Minelli de Oliveira. Vocês sempre me apoiaram e me ensinaram que com trabalho, dedicação e ética podemos alcançar todos os nossos objetivos.

Ao Mauro Emiliano Miranda de Araújo e sua família pelo companheirismo e incentivo com palavras amigas e orações para que tudo pudesse ser realizado com sucesso.

Às minhas amigas Renata Latife Abugoche Levy, Raphaela Levy, Lígia Guimarães, Michelle Sachetto, José Martiniano Neto e Edson Junior do Carmo pela paciência por me escutarem a falar sobre este trabalho e por sempre me dizerem que eu tenho capacidade para fazer tudo que me propunha a fazer.

Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Um dos maiores sucessos da agricultura brasileira é o Pró-Álcool, cuja base de sustentação é a cultura da cana-de-açúcar, que deixa um lapso de atividade na entressafra. Em vista disso, diversas usinas vêm investindo em outras culturas, onde o amido é a fonte primária para a produção do álcool. A busca de amilases termotolerantes em *Bacillus* sp. e em rizóbios de solos da Amazônia é uma estratégia a ser usada para que as bioindústrias reduzam ou parem de importá-las. Foi feita a mutação de dois *Bacillus* sp. contendo amilases com exposição à luz ultravioleta. Foram testadas também, 40 estirpes de rizóbio quanto à presença de amilases termotolerantes. Foram feitos ensaios enzimáticos para a verificação de atividade amilolítica em diferentes temperaturas, tempos, pHs, choque térmico e termoestabilidade. O mutante de *Bacillus* sp. ITAAM 023M mostrou maior índice de amilólise do que o ITAAM 010M. As amilases dos dois mutantes de *Bacillus* sp e dos rizóbios mostraram-se bem diversificadas quanto às suas características, indicando serem diferentes umas das outras. A temperatura com maior atividade das amilases dos mutantes ITAAM 010M e ITAAM 023M foi 100°C. A amilase do mutante ITAAM 010M mostrou maior atividade em 4,5, e a do ITAAM 023M em pH 7,5. Suas amilases mostraram alta sensibilidade ao choque térmico. A amilase do mutante ITAAM 010M mostrou maior termoestabilidade na temperatura de 90°C. A do ITAAM 023M, na temperatura de 80°C. A maior atividade mostrada pela amilase do ITAAM 010M foi de 1,6 U/mL e a do ITAAM 023M, 1,5 U/mL. Dos 40 rizóbios, 17 cresceram bem em meio de cultura contendo amido, 19 produziram halo amilolítico e 11 se mostraram termofílicos. Os rizóbios INPA R001 e INPA R020 mostraram os maiores índices de amilólise. Suas amilases mostraram maior atividade a 90°C. A amilase do INPA R001 mostrou maior atividade a 100°C, e a do INPA R020 a 30°C. A amilase do INPA R001 mostrou maior atividade no pH 4,5 e a do INPA R020 no pH 7,5. Suas amilases mostraram alta sensibilidade ao choque térmico. A amilase do INPA R020 mostrou maior termoestabilidade a 90°C e a do INPA R001 a 100°C. A maior atividade amilolítica mostrada pela amilase do rizóbio INPA R001 foi de 1,6 U/mL e a do rizóbio INPA R020, 7,5 U/mL.

Palavras-chave: Metabolismo microbiano; amilases microbianas; termoestabilidade enzimática.

ABSTRACT

One of the biggest successes of Brazilian agriculture is the Pro-Alcohol, whose base of support is the culture of sugar cane, which leaves a lapse of activity in the offseason. In view of this, several alcohol industries have been investing in other cultures, where the starch is the primary source for the alcohol production. The pursuit of amylase in thermotolerant *Bacillus* sp. and rhizobia from Amazonian soils is a strategy to be used for the bio-industries to reduce or stop importing them. Mutation was made from two *Bacillus* sp. containing amylases by exposure to ultraviolet light. Also tested were 40 strains of rhizobia for the presence of thermophilic amylases. Enzyme assays were performed to check for amylase activity at different temperatures, times, pHs, thermal shock and thermal stability. The *Bacillus* sp. ITAAM 023M mutant showed higher amylolyse than mutant ITAAM 010M. The amylases of the two *Bacillus* sp mutants and rhizobias proved quite diverse as their characteristics, indicating they are different from each other. The temperature with higher amylase activity of the mutants ITAAM 010M and ITAAM 023M was 100 °C. Amylase from the mutant ITAAM 010M showed greater activity in pH 4.5, and from the ITAAM 023M at pH 7.5. Their amylases showed high sensitivity to thermal shock. Amylase from mutant ITAAM 010M showed high thermostability at temperature of 90 °C. The amylase from ITAAM 023M, at a temperature of 80 °C. The highest activity shown by ITAAM 010M amylase was 1.6 U / ml and the ITAAM 023M, 1.5 U / mL. From the 40 rhizobia, 17 grew well in culture medium containing starch, 19 produced amylolytic halo, and 11 proved to be thermophiles. Rhizobia INPA INPA R001 and INPA R020 showed the highest rates of amylolyse. Their amylase showed greater activity at 90°C. Amylase of INPA R001 showed higher activity at 100°C, and from INPA R020, 30°C. Amylase from INPA R001 showed greater activity at pH 4.5 and from INPA R020, at pH 7.5. Their amylases showed high sensitivity to thermal shock. Amylase from INPA R020 showed higher thermostability at 90 °C and from INPA R001 at 100°C. The higher activity shown by amylase of rhizobia INPA R001 was 1.6 U/mL, and from INPA R020, 7.5 U/mL.

Key-words: Microbial metabolism, microbial amylases, enzymatic thermo stability.

LISTA DE TABELAS	Página
Tabela 1. Esquema do Método Dextrinizante – FUWA (1954).	41
Tabela 2. Crescimento das colônias de mutantes em meio com amido. Médias de quatro repetições.	45
Tabela 3. Índice de amilólise dos e mutantes de <i>Bacillus</i> sp. estudados	45
Tabela 4. Teste do iodo na presença do amido dos mutantes de <i>Bacillus</i> sp.	46
Tabela 5. Teste da turbidez na presença do amido dos mutantes de <i>Bacillus</i> sp.	47
Tabela 6. Crescimento, produção de amilase e sensibilidade termofílica dos Rizóbios em meio com amido até 12 dias.	65
Tabela 7. Índice de amilólise dos rizóbios estudados.	69
Tabela 8. Teste do iodo na presença do amido dos rizóbios.	70
Tabela 9. Teste da turbidez na presença do amido dos rizóbios.	71
Tabela 10. Comparação entre os testes realizados com os rizóbios e os mutantes de <i>Bacillus</i> sp.	86

LISTA DE FIGURAS	Página
Figura 1. Diluição em série de bactérias.	36
Figura 2. Construção da curva de mutantes.	36
Figura 3. Comparação entre o ITAAM 010 e o ITAAM 010M.	37
Figura 4. Comparação entre o ITAAM 023 e o ITAAM 023M	37
Figura 5. Metodologia de Oliveira e Magalhães (1999)	39
Figura 6. Curva de sobrevivência do ITAAM 010.	43
Figura 7. Curva de sobrevivência do ITAAM 023.	44
Figura 8. Colônia com halo de amilólise.	46
Figura 9. Atividade enzimática dos mutantes de <i>Bacillus</i> sp. na temperatura de 90°C por 10 minutos.	47
Figura 10. Atividade enzimática amilolítica do mutante de <i>Bacillus</i> sp. 010M sob diferentes temperaturas.	48
Figura 11. Atividade enzimática amilolítica do mutante de <i>Bacillus</i> sp. 023M sob diferentes temperaturas.	49
Figura 12. Atividade enzimática amilolítica do mutante de <i>Bacillus</i> sp. 010M sob diferentes pH's e temperaturas.	51
Figura 13. Atividade enzimática amilolítica do mutante de <i>Bacillus</i> sp. 023M sob diferentes pH's e temperaturas.	51
Figura 14. Atividade enzimática amilolítica do mutante de <i>Bacillus</i> sp. 010M em diferentes tempos de reação e temperaturas.	53
Figura 15. Atividade enzimática amilolítica do mutante de <i>Bacillus</i> sp. 023M em diferentes tempos de reação e temperaturas.	54
Figura 16. Atividade enzimática amilolítica do mutante de <i>Bacillus</i> sp. 010M após choque térmico.	55
Figura 17. Atividade enzimática amilolítica do mutante de <i>Bacillus</i> sp. 023M após choque térmico.	56
Figura 18. Termostabilidade da atividade enzimática amilolítica do mutante de <i>Bacillus</i> sp. 010M em tempos e temperaturas diferentes.	57

Figura 19. Termostabilidade da atividade enzimática amilolítica do mutante de <i>Bacillus</i> sp. 023M em tempos e temperaturas diferentes.	58
Figura 20. Ilustração do método de riscagem de Oliveira de Magalhães (1999).	61
Figura 21. Atividade amilolítica positiva (cor amarela) usando vapor de iodo.	62
Figura 22. Atividade enzimática dos rizóbios na temperatura de 90°C por 10 minutos.	72
Figura 23. Atividade enzimática amilolítica do rizóbio INPA R020 sob diferentes temperaturas.	73
Figura 24. Atividade enzimática amilolítica do rizóbio INPA R001 sob diferentes temperaturas.	73
Figura 25. Atividade enzimática amilolítica do rizóbio RB1203/8721 sob diferentes pH's e temperaturas.	74
Figura 26. Atividade enzimática amilolítica do rizóbio INPA R001 sob diferentes pH's e temperaturas.	76
Figura 27. Atividade enzimática amilolítica do rizóbio RB1203/8721 em diferentes tempos e de reação e temperaturas.	77
Figura 28. Atividade enzimática amilolítica do rizóbio INPA R001 em diferentes tempos de reação e temperaturas.	78
Figura 29. Atividade enzimática amilolítica do Rizóbio INPA R020 após choques térmicos.	79
Figura 30. Atividade enzimática amilolítica do Rizóbio INPA R001 após choque térmico.	80
Figura 31. Termostabilidade da atividade amilolítica do Rizóbio RB1203/8721 em tempos e temperaturas diferentes.	82
Figura 32. Termoestabilidades da atividade amilolítica do Rizóbio INPA R001 em tempos e temperaturas diferentes.	83
Figura 33. Atividade enzimática amilolítica de todos os rizóbios que foram avaliados no trabalho na temperatura de 90°C pelo tempo de 10 minutos.	84

SUMÁRIO		Página
AGRADECIMENTOS		iii
RESUMO		iv
ABSTRACT		v
LISTA DE TABELAS		vi
LISTA DE FIGURAS		vii
1. Introdução		1
2. Objetivos		5
3. Revisão bibliográfica		6
3.1. Microorganismos termófilos		6
3.2. <i>Bacillus</i> sp.		8
3.3. Rizóbios		8
3.4. Enzimas		9
3.4.1. Atividade enzimática		13
3.4.2. Estruturas e mecanismos		14
3.4.3. Especificidade		15
3.5. Amilases		16
3.6. Produção de etanol carburante		19
3.7. Hidrólise do amido		23
3.8. Mutagênese		24
3.8.1. Classificação das mutações		24
3.8.2. Bases moleculares da mutação		26
3.8.3. Mutações induzidas		27
3.8.3.1. Radiações ionizantes		27
3.8.3.2. Luz ultravioleta		28
3.8.3.2.1. Fotorreativação		28
3.8.3.2.2. Reparo por excisão (dark repair)		29
3.8.3.2.3. Reparo após a duplicação do DNA		30
3.8.3.3. O mecanismo de mutação por luz ultravioleta		30
3.8.3.4. Antimutagênicos		31

3.8.4. O conceito de clone	31
3.8.5. O uso de mutagênicos no isolamento de mutações em microrganismos	31
4. CAPÍTULO 1: Experimentos com bactérias do gênero <i>Bacillus</i> sp.	34
4.1. Introdução	34
4.2. Material e Métodos	35
4.2.1. Mutantes de <i>Bacillus</i> sp.	35
4.2.2. Exposição dos microrganismos ao agente mutagênico	35
4.2.3. Seleção dos mutantes produtores de amilase	38
4.2.4. Índice de amilólise dos mutantes de <i>Bacillus</i> sp.	39
4.2.5. Teste de iodo e turbidez em função do amido dos mutantes de <i>Bacillus</i> sp.	39
4.2.6. Atividade de enzimas amilolítica produzidas pelas enzimas dos clones mutantes	40
4.2.6.1. Ensaio enzimático a 90°C	41
4.2.6.2. Determinação da temperatura ótima	42
4.2.6.3. Determinação do pH ótimo	42
4.2.6.4. Tempo ótimo de incubação das enzimas dos mutantes e isolados	42
4.2.6.5. Choque térmico	42
4.2.6.6. Termoestabilidade	42
4.3. Resultados e Discussão	43
4.3.1. Mutação dos <i>Bacillus</i> sp.	43
4.3.2. Seleção dos mutantes do ITAAM 010 e ITAAM 023 produtores de amilase	44
4.3.3. Índice de amilólise dos mutantes de <i>Bacillus</i> sp.	45
4.3.4. Teste de iodo na presença do amido	46
4.3.5. Teste de turbidez na presença do amido	46
4.3.6. Atividade de enzimas amilolítica produzidas pelos clones mutantes	47

4.3.6.1.	Ensaio enzimático a 90°C	47
4.3.6.2.	Determinação da temperatura ótima	48
4.3.6.3.	Determinação do pH ótimo	49
4.3.6.4.	Tempo ótimo de incubação das enzimas dos mutantes	52
4.3.6.5.	Choque térmico	54
4.3.6.6.	Termoestabilidade	56
4.4.	Conclusões	59
4.	CAPÍTULO 2: Experimentos com Rizóbios	60
4.1.	Introdução	60
4.2.	Material e Métodos	61
4.2.1.	Seleção de rizóbios produtores de amilase	61
4.2.2.	Teste termofílico dos rizóbios	62
4.2.3.	Índice de amilólise dos rizóbios	62
4.2.4.	Teste de iodo e turbidez em função do amido dos Rizóbios	63
4.2.5.	Atividade de enzimas amilolítica produzidas pelas enzimas dos rizóbios selecionados	63
4.2.5.1.	Ensaio enzimático a 90°C	63
4.2.5.2.	Determinação da temperatura ótima	63
4.2.5.3.	Determinação do pH ótimo	63
4.2.5.4.	Tempo ótimo de incubação das enzimas dos isolados	63
4.2.5.5.	Choque térmico	64
4.2.5.6.	Termoestabilidade	64
4.2.6.	Teste para avaliar a atividade de todos os rizóbios utilizados desde o início deste trabalho	64
4.3.	Resultados e Discussão	65
4.3.1.	Seleção de rizóbios que possuem bom crescimento em meio de cultura contendo amido	65
4.3.2.	Produção de amilase aparente	67
4.3.3.	Teste termofílico dos rizóbios	67
4.3.4.	Índice de amilólise dos rizóbios	68

4.3.5. Teste de iodo na presença do amido	69
4.3.6. Teste de turbidez na presença do amido	70
4.3.7. Atividade de enzimas amilolítica produzidas pelos rizóbios selecionados	71
4.3.7.1. Ensaio enzimático a 90°C	71
4.3.7.2. Determinação da temperatura ótima	72
4.3.7.3. Determinação do pH ótimo	74
4.3.7.4. Tempo ótimo de incubação das enzimas dos isolados	76
4.3.7.5. Choque térmico	78
4.3.7.6. Termoestabilidade	81
4.3.8. Atividade de todos os rizóbios utilizados desde o início deste trabalho	83
4.4. Conclusões	85
5. Comparações entre os resultados	86
6. Referências Bibliográficas	87
7. Anexos	100

1. Introdução

Um dos maiores sucessos da agricultura brasileira é o Pró-Álcool, ou Programa Nacional do Álcool, criado com o objetivo de substituir em larga escala, os combustíveis veiculares derivados de petróleo pelo álcool, financiado pelo governo do Brasil a partir de 1975 devido à crise do petróleo em 1973 e mais agravante depois da crise de 1979 (Wikipédia, 2013, acesso em 20/05/2013).

Esse programa tem como base de sustentação, a cultura da cana-de-açúcar, cuja produção anual deixa um lapso de atividade durante a entressafra. Em vista disso, diversas usinas estão investindo no plantio de sorgo, milho e outras culturas, onde o amido é a fonte primária para a produção do álcool. Na Amazônia, essa nova estratégia permitirá a produção de álcool a partir da mandioca, batata doce e até algumas espécies negligenciadas, como o babaçu.

Para isso, tornou-se importante a obtenção da enzima amilase, capaz de converter o amido em subprodutos que posteriormente são convertidos em álcool no processo de fermentação. Essa enzima ainda é, na sua maioria, importada, tendo em vista a produção interna ser muito pequena.

Na natureza, uma das principais fontes de produção de amilases são os microrganismos, principalmente os presentes nos solos.

Os microrganismos dos solos são componentes essenciais para o funcionamento sustentável dos ecossistemas, sendo fundamentais no processo de fragmentação e decomposição da matéria orgânica e na disponibilização de nutrientes do solo (MOREIRA; SIQUEIRA, 2002). Nos solos de baixa fertilidade de terra firme da Amazônia, a microbiota edáfica é um dos principais agentes da sustentabilidade dos sistemas biológicos, através da ciclagem dos nutrientes contidos na biomassa vegetal e animal, ao mineralizarem a matéria orgânica formadora da liteira na superfície do solo.

Nessa alta diversidade microbiológica podem ser encontrados microrganismos capazes de degradar o amido, uma das matérias primas para a produção de etanol, usando suas amilases, que é um produto ainda muito importado pelo Brasil para uso industrial. A busca de bactérias do gênero *Bacillus* sp. resistentes a altas temperaturas é uma estratégia para a obtenção de amilases termotolerantes essenciais para a bioindústria nacional.

Outra fonte de microrganismos produtores de amilase são as bactérias indutoras de nódulos em leguminosas, genericamente denominadas de rizóbios, por serem detentoras dessa enzima e por serem não patogênicas a plantas e animais, tornando-as altamente desejáveis como fonte enzimática para as bioindústrias (OLIVEIRA et al., 2007).

Portanto, a busca de amilases termotolerantes em *Bacillus* sp e em rizóbios isolados de solos da Amazônia é uma estratégia a ser usada para que as bioindústrias nacionais e internacionais operando no país, principalmente as usinas produtoras de etanol, reduzam ou parem de importá-la.

2. Objetivos

2.1 - Objetivo Geral

Avaliar a capacidade de produção de amilases termotolerantes por *Bacillus* sp. modificados geneticamente e por *Rhizobia* sp., caracterizando estas amilases em diferentes condições de pHs e temperaturas.

2.2 - Objetivos Específicos

- 1) Mutagenizar espécies de *Bacillus* sp. produtores de alfa-amilase com exposição à irradiação com luz ultravioleta;
- 2) Identificar os mutantes que melhor produzem amilase;
- 3) Identificar os rizóbios que produzem amilases;
- 4) Analisar e caracterizar as enzimas alfa-amilases secretadas pelos melhores rizóbios e mutantes;
- 5) Verificar a temperatura em que as amilases dos rizóbios e dos mutantes de *Bacillus* sp. apresentaram atividades mais elevadas;
- 6) Verificar o tempo em que as amilases dos rizóbios e dos mutantes de *Bacillus* sp. apresentaram atividades mais elevadas;
- 7) Verificar o pH em que as amilases dos rizóbios e dos mutantes de *Bacillus* sp. apresentaram atividades mais elevadas;
- 8) Verificar o tempo e temperatura em que as amilases dos rizóbios e dos mutantes de *Bacillus* sp. apresentaram atividades mais estáveis.

3. Revisão bibliográfica

3.1. Microrganismos termófilos

Uma das mais surpreendentes propriedades dos microrganismos é sua habilidade em adaptar-se a ambientes extremos, nos quais fatores como pH, temperatura, pressão e concentração de sal ultrapassam os valores considerados como padrões para a maioria dos seres vivos (LASA; BERENGER, 1993). Dentre todos esses fatores, a temperatura é o que mais influencia a função das biomoléculas e a manutenção das estruturas biológicas. De fato, a maioria dos organismos atualmente conhecida pode crescer somente dentro de uma faixa estreita de temperatura. Entretanto, a existência de ambientes geotermicamente estáveis tem permitido a seleção ou a persistência de microrganismos que não apenas resistem, mas também requerem altas temperaturas para sobreviver. Estes organismos são chamados de termófilos ou termofílicos (MADIGAN; OREN, 1999).

Esses organismos são designados extremófilos e podem se desenvolver em valores extremos de temperatura, pH, concentração de sais e pressão acima das convencionais. Alguns toleram também altos níveis de radiação ou de compostos tóxicos. Assim psicrófilos crescem bem a 15°C ou menos enquanto os hipertermófilos o fazem a 80°C ou mais (HUBER; STETTER, 1998).

Evidências sugerem que organismos hipertermófilos foram as primeiras formas de vida na Terra (GIULIO, 2000), e suas proteínas podem, portanto, servir como modelo para o entendimento da evolução das enzimas sob os pontos de vista biológico, químico e físico-químico (ARNOLD et al., 2001).

Existem mais de 70 espécies inseridas em 29 gêneros e 10 ordens de hipertermófilos conhecidos, sendo a maioria do Domínio Archaea. Entre os organismos hipertermófilos descritos, o *Pirococcus fumari* é o que consegue crescer em temperaturas mais elevadas, entre 90 e 113 °C (HUBER et al., 1986). No Domínio Bactéria, foram descritas algumas espécies hipertermofílicas como *Aquiflex pyrophilus*, *Fervidobacterium pennavorans*, *Thermotoga marítima*,

Thermocrinis rubber, *Aquiflex profundus* e *Thermotoga neapolitana* (VIEILLE; ZEIKUS, 2001; HUSER et al, 1986).

Na natureza, em ambiente mesofílico, os organismos termófilos moderados desenvolvem-se em processo de compostagem durante a fase de alta temperatura (acima de 40 °C), sucedendo a microflora mesofílica (MOUCHACCA, 1997; CHANG et al., 2006). Nesse processo, podem ser distinguidas três fases: na primeira, a microbiota mesofílica cresce aceleradamente, assimilando, preferencialmente, as fontes de carbono prontamente assimiláveis e solúveis (açúcares, aminoácidos e ácidos orgânicos) ou polímeros de acesso mais fácil, gerando calor por reações metabólicas exotérmicas e elevando a temperatura para aproximadamente 40 °C. Esse aumento de temperatura inibe o crescimento dos mesófilos e estimula a germinação dos esporos dos fungos e endósporos das bactérias termófilas, iniciando a segunda fase do processo. Nessa etapa, as fontes de carbono mais facilmente assimiláveis já estariam exauridas, restando os polissacarídeos constituintes da biomassa, como celulose, hemicelulose e pectina, cuja degradação requer intensa liberação de enzimas extracelulares. O resultado desse processo é a degradação do material vegetal a polímeros menores e um aumento da temperatura para próximo de 60°C. A terceira fase do processo caracteriza-se pela inibição do crescimento dos fungos e redução de atividade bioquímica no material, embora as atividades das bactérias extremófilas e hipertermófilas sejam continuadas (MAHESHWARI et al., 2000).

Alguns organismos crescem também em outras condições ambientais consideradas extremas, se comparados às condições humanas e às da maioria dos seres vivos. Os alcalófilos desenvolvem-se em valores de pH acima de 10,0 enquanto para os acidófilos o pH ideal está em torno de 3,0 ou menos. Outros extremófilos, como os halófilos, necessitam que a concentração de sais no meio de crescimento seja de 5-30% (HUBER; STETTER, 1998). Mais de uma dessas características pode estar presente em um mesmo organismo, ou seja, ele pode ser psicrófilo e acidófilo (SAID; PIETRO, 2004).

Processos biotecnológicos que ocorrem em altas temperaturas apresentam várias vantagens. Com o aumento da temperatura a solubilidade dos compostos orgânicos do meio reacional e/ou diminuição da viscosidade deste, facilitam a dispersão das substâncias e podem acelerar o processo todo, principalmente quando as reações envolvem substratos hidrofóbicos pouco solúveis como poliaromáticos, gorduras, compostos poliméricos como amido, celulose, hemicelulose e proteínas. A biodisponibilidade e a biodegradação de substratos insolúveis e poluentes podem também aumentar em temperaturas elevadas tornando um processo de bioremediação eficiente. Além dessas vantagens um processo que se desenvolve acima de 60°C apresenta menor risco de contaminação (NIEHAUS et al., 1999).

3.2. *Bacillus*

Euzéby (2013) cita 265 espécies e de 7 subespécies no gênero *Bacillus* spp, conforme o site www.bacterio.cict.fr/b/bacillus.html. Há mais de 172 espécies aceitas nesse gênero.

O gênero *Bacillus* pertence à família Bacillaceae, sendo extremamente heterogêneo tanto geneticamente (o G + C % das diversas espécies variam de 32 a 69) quanto fenotipicamente (tipo respiratório, metabolismo dos açúcares, composição da parede, etc).

Segundo Gomes (2013), as espécies do gênero *Bacillus* são bastonetes com extremidades retas ou arredondadas de tamanhos variáveis (0,5 X 1,2 µm até 2,5 x 10 µm), esporulados, Gram positivos ou Gram variáveis (coloração de Gram não é positiva nos cultivos jovens); Geralmente móveis graças aos cílios peritríquios. O *B. anthracis* e o *B. mycoides* são imóveis. Nas espécies móveis, a motilidade é variável, segundo a linhagem. Algumas espécies são capsuladas (*B. anthracis*, *B. licheniformis*, *B. megaterium* e *B. subtilis* podem elaborar cápsula formada de polímeros de ácido glutâmico); aeróbios ou anaeróbios; geralmente catalase positivos; são variáveis ao teste da oxidase.

O cultivo desses microrganismos pode ser difícil, visto que algumas espécies podem exigir inúmeros fatores de crescimento; aspecto colonial no agar são variáveis e o fenômeno de dissociação são freqüentes. São bactérias com forma de bastonetes, sendo em geral patogênicas para os seres humanos e demais mamíferos, como é o caso do *Bacillus anthracis*, causador do antraz. O *Bacillus cereus* causa gastroenterites e outras infecções (GOMES, 2013).

Todas as espécies pertencentes ao gênero *Bacillus* produzem endosporos, muitos produzem toxinas. A palavra bacilo, de uma forma mais geral, também pode ser usada para designar bactérias em forma de bastonetes, não necessariamente pertencentes ao gênero *Bacillus*.

Segundo Gomes (2013), as espécies do gênero *Bacillus* são classificadas em três grupos, segundo a morfologia do esporo e do esporângio.

O grupo I é formado por bacilos Gram positivos, apresentam esporo central ou terminal; esféricos ou ovóides; não deformam a célula. O grupo I é subdividido em outros dois subgrupos: a) O grupo Ia constituído de bacilos de diâmetro superior a 1 μm , apresentando inclusões de poli-beta-hidroxibutirato (*B. anthracis*, *B. cereus*, *B. megaterium*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. thuringiensis*, *B. weihenstephanensis*); e b) O grupo Ib constituído de bacilos com diâmetro inferior a 1 μm e desprovidos de inclusões de poli-beta-hidroxibutirato (*B. coagulans*, *B. firmus*, *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. pumilus*)

O grupo II é constituído de espécies Gram variáveis; apresenta esporo oval, central ou terminal que deformam a parede celular (*B. circulans*, *B. stearothermophilus*).

O grupo III é caracterizado por bacilos Gram variáveis; apresentam um esporo esférico terminal ou subterminal que deformam a parede celular (*B. globisporus*, *B. insolitus*). O *B. thuringiensis*, sintetiza um cristal composto de toxinas letais para insetos. A elaboração do para-esporo não é único no gênero *Bacillus*, pois o *Lysinibacillus fusiformis*, *Lysinibacillus sphaericus*, *Paenibacillus popilliae*, *Brevibacillus laterosporus* e certas linhagens do *Paenibacillus lentimorbus* são capazes de produzir tais cristais.

O gênero *Bacillus* é um dos mais importantes e investigados grupos de bactérias produtoras de amilase comercial (PANDEY et al., 2000).

3.3. Rizóbios

Entre os microrganismos fixadores de nitrogênio, as bactérias conhecidas como rizóbios constituem o grupo melhor estudado. A utilização da simbiose leguminosa-rizóbio é uma das alternativas mais promissoras para a agricultura de baixos insumos nas regiões tropicais e subtropicais.

Segundo Chen et al. (2005), Kuykendall e Dazzo (2005) e Kuykendall et al. (2005), a ordem *Rhizobiales* é classificada em dez famílias: *Aurantimonadaceae*, *Bartonellaceae*, *Beijerinckiaceae*, *Bradirhizobiaceae*, *Brucellaceae*, *Hypomicrobiaceae*, *Methylobacteriaceae*, *Methylocystaceae*, *Phyllobacteraceae*, *Rhizobiaceae*. Na *Rhizobiaceae* encontram os seguintes gêneros: *Agrobacterium* (SETUBAL, 2009), *Allorhizobium* (SESSITSCH et al., 2002), *Carbophilus* (EUZÉBY e KUDO, 2001), *Chelatobacter* (KAMPFER et al., 2002), *Kaistia* (WEON et al., 2008), *Rhizobium* (SAWADA et al., 2003), *Sinorhizobium/Ensifer* (MARTENS et al., 2008), *Candidatus* (DE VOS et al., 2005).

Excetuando-se o complexo nitrogenase, que catalisa a conversão do N_2 a NH_3 , pouco se sabe sobre o perfil enzimático dessas bactérias (OLIVEIRA, 2006). Além da capacidade de fixar nitrogênio, contribuindo para o balanço desse nutriente nos ecossistemas, alguns isolados de rizóbio são capazes de solubilizar fosfatos pouco solúveis, disponibilizando o fósforo para as plantas e para si mesmos (CHABOT et al., 1998). O rizóbio, e algumas espécies de bactérias do gênero *Pseudomonas* e *Bacillus*, estão entre os microrganismos mais eficientes em solubilizar fosfatos inorgânicos pouco solúveis, presentes no solo (RODRIGUEZ; FRAGA, 1999).

Oliveira et al. (2006a), ao estudarem em meios solidificados a capacidade de 67 isolados de rizóbio nativos da Região Amazônica em produzir enzimas hidrolíticas, reportaram a atividade amilolítica como sendo a mais frequente, ocorrendo em 1/3 das bactérias.

Programas para selecionar novas fontes microbianas para a produção de enzimas estão crescendo em todas as partes do planeta. As nitrogenases e hidrogenases presentes nas bactérias referidas como rizobia, são enzimas chaves na fixação biológica do nitrogênio atmosférico pelas plantas leguminosas e, portanto, as de maior interesse biotecnológico na área agrônômica. Porém, não se pode negligenciar as potencialidades de uso dessas bactérias como fontes de outras enzimas de reconhecido valor industrial, caso das amilases, lipases, pectinases e proteases (KIRK et al., 2002; VAN BEILEN, 2002).

Uma das exigências para que um microrganismo possa ser fonte de enzimas de potencial uso nas indústrias de alimentos, é que esse não cause qualquer tipo de problema ao consumo animal. E nesse contexto enquadram-se as bactérias rizobias, uma vez que até o momento, não se tem qualquer relato de toxidez causada por esse grupo de bactérias ao organismo humano (OLIVEIRA et al., 2006 a,b).

3.4. Enzimas

Enzimas são um grupo de substâncias orgânicas de natureza normalmente proteica (existem também enzimas constituídas de RNA (Howard Hugues), as ribozimas), com atividade intra ou extracelular que catalisa reações químicas que, sem a sua presença, dificilmente aconteceriam. Isso é conseguido através do abaixamento da energia de ativação necessária para que se dê uma reação química, resultando no aumento da velocidade da reação e possibilitando o metabolismo dos seres vivos. A capacidade catalítica das enzimas torna-as adequadas para aplicações industriais, como na indústria farmacêutica ou na alimentar.

Os microrganismos são dotados de um imenso potencial de degradação de material orgânico, produzindo um “pool” de enzimas, o qual tem sido explorado comercialmente ao longo dos anos (JAYANI et al., 2005). Além disso, a caracterização das enzimas é um passo importante para que se conheçam suas propriedades de atividade ótima de atuação e de estabilidade em diferentes valores de pH e temperatura. O conhecimento dessas propriedades permite avaliar o seu potencial de aplicação em diferentes processos (KASHYAP et al., 2001; ALKORTA et al., 1998).

As enzimas são substâncias orgânicas específicas compostas por polímeros de aminoácidos e que atuam como catalisadores no metabolismo dos seres vivos. São substâncias naturais envolvidas em todos os processos bioquímicos que ocorrem nas células vivas, desde os mais simples, como vírus, bactérias e outras formas unicelulares de vida, aos mais desenvolvidos, como as plantas e animais. A maioria das enzimas se encontra e atua no interior das células (endocelulares), enquanto algumas são excretadas para fora da célula viva (exocelulares) para atuarem externamente, como por exemplo, as amilases fúngicas (SPIER, 2005). As enzimas de origem microbiana representam as melhores fontes devido à sua ampla diversidade bioquímica e sua susceptibilidade de manipulação genética (ALTAMIRANO et al., 2000).

Diferentemente das enzimas vegetais e animais, as de origem microbiana não dependem das intempéries climáticas, uma vez que são produzidas em fermentadores onde as condições de cultivo são finamente controladas por monitores eletrônicos. Some-se a este fato a enorme biodiversidade de microrganismos disponíveis nos mais variados habitats da natureza. Microrganismos que vivem em condições extremas, por exemplo, de pH ou temperatura, sintetizam enzimas que propiciam sua sobrevivência nestas condições. Assim, há microrganismos que sintetizam amilases que degradam a molécula de amido a 30°C, mas se um processo requer a degradação do amido a 98°C, esta enzima não poderá ser aplicada e deverá ser substituída por amilases termoresistentes, extraídas de microrganismos termofílicos (SAID; PIETRO, 2004).

Além disso, atualmente, é mais simples o cultivo de microrganismos geneticamente modificados ou não, do que de cultivo de células de organismos superiores. A utilização de técnicas de engenharia genética pode também auxiliar e modificar propriedades de enzimas já consideradas adequadas para aprimorar sua atividade (SAID; PIETRO, 2004).

Pelo exposto acima é que as enzimas de origem microbiana ocupam lugar de destaque no mercado biotecnológico, sendo inúmeras as aplicadas em processos industriais e comercializadas em grandes quantidades, como as proteases bacterianas na indústria de detergentes e couro, as amilases fúngicas e bacterianas na indústria do amido e panificação, as celulases e pectinases na indústria têxtil e de sucos naturais entre outras (SAID; PIETRO, 2004).

As enzimas são de especial importância em fermentações industriais, uma vez que todos os processos de fermentação resultam da atividade enzimática de microrganismos. As enzimas são proteínas vitais que catalisam reações bioquímicas com grande especificidade, sendo capazes de aumentar em até 10^{14} vezes a velocidade de algumas reações sem necessitar de condições extremas de pH, pressão e temperatura (OLIVEIRA et al., 2006).

Em muitos processos, as enzimas podem substituir substâncias químicas sintéticas e contribuir para os processos de produção ou gerar benefícios para o meio ambiente, através da biodegradabilidade e do menor consumo de energia. Elas são mais específicas em sua ação do que as substâncias químicas sintéticas (UEDA et al., 1999).

As enzimas hemicelulolíticas apresentam potencial de aplicação em vários setores, como alimentício na panificação, na formulação de ração animal e na produção de xilitol; ainda nos setores farmacêutico, químico, de papel e celulose e, mais recentemente, na produção de etanol a partir de resíduos hemicelulolíticos. Assim, a busca por microrganismos que apresentem um “pool” de enzimas características que levem à diminuição de custos de produção e ao aumento da disponibilidade dos produtos de hidrólise é de interesse constante

para o setor industrial (JAYANI et al., 2005).

O setor têxtil já utiliza várias enzimas, principalmente na fiação, tingimento, acabamento e no tratamento de resíduos poluidores. Segundo Auterinen (2006), a primeira enzima de origem microbiana utilizada foi a α -amilase, que serve para a retirada da goma natural. Atualmente, outras enzimas também são empregadas no setor têxtil, como a pectinase, a lipase e a hemicelulase. No acabamento do índigo há o uso da celulase para dar efeito de “stonewashed”, em que a pedra pome pode ser substituída ou utilizada em conjunto para desbotar a cor do tecido. No tratamento dos resíduos de corantes, existem diversas enzimas que degradam os corantes com a lignina e manganês. São elas a peroxidase, do fungo *Phanerochaete chrysosporium* e a azoredutase do *P. chrysosporium*, *Pseudomonas sp*, ou *Sphingomonas sp*. da azocorantes (KUNS; DURAN, 2002).

Segundo Maldonado e López (1995), Buléon et al. (1998) e Thomas e Atwell (1999), o amido pode ser degradado utilizando-se hidrólise ácida, ácida-enzimática, ou apenas enzimática, mas a utilização de enzimas amilolíticas, em substituição às substâncias químicas, na produção de derivados de amido, tem apresentado algumas vantagens. Primeiro, quanto à especificidade das enzimas na produção de xaropes de açúcar com propriedades químicas e físicas conhecidas e segundo que a hidrólise enzimática é mais branda resultando em poucas reações intermediárias e menor escurecimento. Várias enzimas capazes de degradar o amido são hidrolíticas, quebrando ligações do tipo α -1,4, sendo classificadas como amilases ou quebrando ligações do tipo α -1,6 e classificadas como amilases desramificantes. Basicamente, existem quatro grupos de enzimas amilolíticas de interesse industrial: endoamilases, exoamilases, enzimas desramificantes e transferases.

As enzimas termoestáveis, de maneira geral, apresentam vantagens para a aplicação na indústria, visto que processos biotecnológicos conduzidos em elevadas temperaturas têm o risco de contaminação por microrganismos mesófilos, que são a maioria em um ambiente industrial, significativamente reduzido (PALMA-FERNANDEZ; GOMES, 2002). Por outro lado, as temperaturas

mais elevadas favorecem a solubilidade de substratos e produtos, e aumentam as taxas de reação por redução da viscosidade e por aumento do coeficiente de difusão dos substratos. Ainda, as enzimas extracelulares constituem importante modelo para entendimento dos mecanismos de termoestabilidade e de atividade em altas temperaturas, os quais são usados nos processos de engenharia de proteínas (ADAMS; DEPLOYED, 1978; McCARTHY, et al., 2005). Outra característica das enzimas termoestáveis é sua maior resistência à ação de proteases, uma vez que, quanto mais rígida for a molécula, menos expõe seu sítio de proteólise (ASGHARI et al, 2004). A maior resistência à desnaturação por alguns solventes orgânicos também tem sido relatada como uma propriedade das proteínas termoestáveis (COWAN, 1997).

3.4.1. Atividade Enzimática

As enzimas convertem uma substância, chamada de substrato, em outra denominada produto, e são extremamente específicas para a reação que catalisam. Isso significa que, em geral, uma enzima catalisa um e só um tipo de reação química. Conseqüentemente, o tipo de enzimas encontradas numa célula determina o tipo de metabolismo que a célula efetua. A velocidade da reação é catalisada por uma enzima e aumentada devido ao abaixamento da energia de ativação necessária para converter o substrato no produto. O aceleração da reação pode ser da ordem dos milhões de vezes: por exemplo, a enzima orotidina-5'-fosfato descarboxilase diminui o tempo da reação por ela catalisada de 78 milhões de anos para 25 milissegundos (RADZICKA; WOLFENDEN, 1995).

Como são catalisadores, as enzimas não são consumidas na reação e não alteram o equilíbrio químico dela. A atividade enzimática pode depender da presença de determinadas moléculas, chamadas de cofatores. A natureza química dos cofatores é muito variável, podendo ser, por exemplo, um ou mais íons metálicos (como o ferro), ou uma molécula orgânica (como a vitamina B12). Estes cofatores podem participar ou não diretamente na reação enzimática. Algumas substâncias podem inibir a atividade de algumas enzimas, diminuindo-a

ou eliminando-a totalmente; são os chamados inibidores enzimáticos (RADZICKA; WOLFENDEN, 1995).

Pelo fato de serem proteínas com estrutura terciária ou quaternária, as enzimas são dotadas de dobramentos tridimensionais em suas cadeias polipeptídicas, o que lhes confere uma forma característica e exclusiva. Assim, diferentes enzimas têm diferentes formas e, portanto, diferentes papéis biológicos. Para que uma enzima atue, é necessário que os substratos "se encaixem" na enzima. Esse "encaixe", porém, depende da forma, isto é, do "contorno" da enzima. Por isso, substratos que se "encaixam" em uma determinada enzima não se "encaixam" em outras diferentes, e a reação não ocorre; daí a especificidade das enzimas quanto aos substratos em que atuam. Uma vez ocorrido o "encaixe", forma-se o complexo enzima-substrato, que se assemelha ao sistema "chave-fechadura". O local da enzima onde o substrato se "encaixa" e denominado sítio ativo (ou centro ativo). No caso de substâncias que reagem entre si, sob a ação catalisadora das enzimas, a reação é facilitada, tornando-se mais rápida, pois a proximidade entre as moléculas "encaixadas" acelera o processo reativo; após a reação, a enzima desliga-se do substrato e permanece intacta (RADZICKA; WOLFENDEN, 1995).

3.4.2. Estruturas e mecanismos das enzimas

As enzimas são proteínas, e podem ter um tamanho desde 62 resíduos de aminoácidos, como é o caso do monômero da enzima 4-oxalocrotonato tautomerase, até um tamanho de 2.500 resíduos, como é o caso da sintase de ácidos gordos. A atividade das enzimas é determinada pela sua estrutura quaternária. A maioria das enzimas são maiores do que o substrato sobre o qual atuam, e só uma pequena porção da enzima (cerca de 3-4 aminoácidos) está envolvida na catalise. A região que contém estes resíduos catalíticos, que se liga-se ao substrato e que desempenha a reação, é denominada de sítio ativo (The Catalytic Site Atlas at The European Bioinformatics Institute, 2007).

As enzimas também podem ter sítios onde se ligam cofatores, que são necessários às reações catalíticas. Algumas enzimas também podem ter sítios de ligações para pequenas moléculas, que são produtos ou substratos, diretos ou indiretos, da reação catalisada. Estas ligações servem para aumentar ou diminuir a atividade da enzima, providenciando um meio de regulação por *feedback* (The Catalytic Site Atlas at The European Bioinformatics Institute, 2007).

Tal como todas as proteínas, as enzimas são formadas por longas cadeias lineares e aminoácidos que sofrem um enovelamento que tem como resultado um produto com estrutura tridimensional. Cada sequência única de aminoácidos produz também uma estrutura tridimensional única que tem propriedade específicas. Cadeias individuais de proteínas podem por vezes agrupar-se para formar um complexo proteico. A maioria das enzimas pode sofrer desnaturação, isto é, a sua estrutura pode sofrer desagregação e inativação pelo aumento de temperatura, o que provoca alterações na conformação tridimensional da proteína. Dependendo da enzima, a desnaturação pode ter efeitos reversíveis ou irreversíveis (The Catalytic Site Atlas at The European Bioinformatics Institute, 2007).

3.4.3. Especificidade das enzimas

As enzimas possuem normalmente uma alta especificidade em relação às reações que catalisam e aos substratos que estão envolvidos nessas reações. A forma complementar, carga e características hidrofílicas/hidrofóbicas, são responsáveis por esta especificidade. As enzimas exibem também elevados níveis de estereoespecificidade, regioselectividade e quimioselectividade. Algumas das enzimas que apresentam maior especificidade e precisão estão envolvidas na cópia e expressão do genoma. Estas enzimas possuem mecanismos de *proof-reading* (revisão). Um destes casos é a DNA polimerase, que catalisa uma reação num primeiro passo, para em seguida confirmar, num segundo passo, se o produto é o correto. Este processo em duas etapas resulta em médias de taxa de erro muito diminutas, na ordem de uma para cem milhões de reações, no caso de polimerases de mamíferos. Mecanismos de revisão

similares também podem ser encontrados na RNA polimerase, na aminoacil-tRNA sintetases e em ribossomas (BERG et al., 2002).

Algumas enzimas que produzem metabolitos secundários são descritos como *promiscuos*, visto que podem atuar num largo espectro de diferentes substratos. Tem sido sugerido que este tipo de especificidade alargada e importante nos processos de evolução de novas vias de biossíntese (BERG et al., 2002).

3.5. Amilases

A maioria dos processamentos industriais do amido envolve a hidrólise desse polímero. Os chamados “hidrolisados de amido” englobam todos os produtos resultantes do fracionamento do amido, independentemente do catalisador ou do grau de fracionamento. São incluídos nesta denominação diferentes tipos de produtos, como xaropes de glicose, maltose, frutose, maltotetrose, dextrinas e ciclodextrinas (TEAGUE; BRUMM, 1992).

A composição de um hidrolisado que se deseja obter é definida em função do direcionamento da aplicação do mesmo. Cada tipo de xarope requer, portanto, diferentes combinações de enzimas amilolíticas. Durante muito tempo, o amido foi hidrolisado quimicamente, por ação de ácidos. Esse processo, no entanto, gerava subprodutos indesejáveis, como compostos coloridos ou de “flavor”, além de dificultar o controle dos teores dos produtos finais. Nos últimos 30 anos, as amilases substituíram o tratamento ácido (GOMES et al., 2006).

O processamento enzimático do amido ocorre em altas temperaturas e envolve dois passos importantes, a liquefação e a sacarificação. Na produção industrial de xaropes a α -amilase termoestável de *Bacillus licheniformis* ou de *Bacillus stearothermophilus* hidrolisa parcialmente as ligações α -1,4, liberando maltodextrinas, com redução acentuada da viscosidade. Após a liquefação, o pH é ajustado a 4,2-5,0 e a temperatura baixada para 55–60 °C seguindo-se a etapa de sacarificação, na qual o amido liquefeito é convertido em sacarídeos de baixo

peso molecular. Xaropes contendo 95-96% de glicose são produzidos usando-se, nessa segunda etapa, uma mistura de pululanase e glucoamilase de *Aspergillus niger* ou de *Aspergillus oryzae*, enquanto que xaropes com 80-85% de maltose são produzidos usando pululanase e β -amilase de *Bacillus polymyxa* (NIGAM; SINGH, 1995).

O amido é um polissacarídeo muito abundante na natureza, sendo encontrado principalmente em sementes de cereais como o milho, cevada, trigo e arroz e em tubérculos ou raízes como batata e mandioca. Possui longas cadeias de moléculas de glicose, retas e ramificadas ligadas entre si. Entretanto, apresenta o inconveniente de não ser diretamente fermentado pela levedura, necessitando de um processo de hidrólise preliminar, em que as amilases atuam nesse processo de quebra do amido (GIORDANO, 1992).

É composto de dois glucanos, a amilose linear, contendo unidades de D-glicose unidas por ligações $\alpha(1-4)$, e a amilopectina ramificada, que consiste de resíduos de D-glicose unidos por ligações $\alpha(1-4)$ contendo, além disso, ramificações formadas por ligações $\alpha(1-6)$ (FRAZIER; WESTHOFF, 1988). Quanto à natureza das ligações hidrolisadas, as amilases podem ser reunidas em cinco classes, α -amilases, β -amilases, isoamilases, glucoamilases, ciclodextrina-glucanotransferase. As amilases são classificadas em várias formas, dependendo de como atuam sobre as moléculas de amido (CORNELIS, 1987).

As amilases termoestáveis, que apresentam atividade em altas temperaturas, são utilizadas tanto na indústria de alimentos quanto na farmacêutica e química. Elas são responsáveis pela quebra do amido em componentes de menores tamanhos e de interesse pelo ser humano devido sua larga utilização nas indústrias alimentícias, de papel, têxtil, grande potencial para a indústria química gerando perspectivas enormes como fonte renovável de energia (MORAES, 2004). Cada aplicação das amilases requer uma peculiaridade quanto à especificidade, estabilidade, temperatura e pH. Basicamente, existem quatro tipos de enzimas conversoras de amido: endoamilases, exoamilases, enzimas desramificadoras e transferases (MORAES, 2004).

As amilases são enzimas que catalisam a hidrólise da amilopectina, da amilose e do glicogênio. A hidrólise do amido pode ser de meia vida operacional (ZANIN, 1989). Para crescerem e se multiplicar, os microrganismos precisam quebrar e captar compostos orgânicos e minerais e para isso usam diversas enzimas. Ao utilizarem o amido como fonte de carbono, eles o hidrolisam com as enzimas alfa-amilase e a amiloglicosidase (AMG). A primeira atua no interior da cadeia de amido, quebrando-a em oligossacarídeos de menor peso molecular. A amiloglicosidase, por sua vez, atua nas extremidades da molécula, liberando sucessivamente unidades de glicose (GIORDANO, 1992).

As α -amilases são endoamilases que catalisam a hidrólise das ligações glicosídicas α (1-4) internas do amido ao acaso, porém não são capazes de hidrolisar as ramificações α (1-6). São chamadas de enzimas liqueficientes, pois reduzem a viscosidade da solução de amido gelatinizada (CRABB; MITCHINSON, 1997; SURMELY et al., 2003).

Microrganismos do solo, principalmente fungos e bactérias, são as fontes mais comuns de α -amilases. Diferentemente das enzimas vegetais e animais, as de origem microbiana não dependem de situações climáticas favoráveis, pois podem ser produzidas em fermentadores onde as condições de cultivo podem ser controladas e monitoradas eletronicamente (TEODORO; MARTINS, 2000; MORAES, 2004).

Atualmente as α -amilases comercializadas são produzidas por *B. licheniformis* e *B. amyloliquefaciens* por fermentação submersa e tem como principal característica, serem resistentes a elevadas temperaturas. Essas enzimas apresentam aplicações nos seguintes segmentos industriais: têxtil, alimentícia, farmacêutica, de bebidas, de detergentes, de papel e atualmente sua importância vem aumentando por participar do processo de produção de etanol carburante a partir de substratos amiláceos (CRABB; MITCHINSON, 1997).

As vantagens de se utilizar amilases termorresistentes em processos industriais incluem a diminuição do risco de contaminação, melhor solubilidade dos substratos e diminuição da viscosidade da solução (ARIKAN, 2008; CRABB; MITCHINSON, 1997).

Nos solos da Amazônia observou-se uma abundância de sequências correspondentes ao gene 16S rRNA oriundos de microrganismos do gênero *Bacillus* (CANNAVAN, 2007). Estes microrganismos utilizam como estratégia de sobrevivência, um crescimento rápido na presença de grandes quantidades de nutrientes, sendo a sua maioria cultivável em meios de cultura. Esse gênero apresenta bactérias resistentes a altas temperaturas e podem servir para a obtenção de enzimas termoestáveis e úteis como produtos biotecnológicos.

Bactérias termofílicas pertencentes ao gênero *Bacillus* produzem uma grande variedade de enzimas extracelulares, nas quais as amilases se destacam como uma das que apresentam maior aplicabilidade industrial (TEODORO; MARTINS, 2000; MORAES, 2004). Microrganismos termofílicos são adaptados para crescerem em temperaturas acima de 55°C. Estes microrganismos são uma fonte interessante de enzimas que possuem tanto termoatividade quanto termoestabilidade (ARIKAN, 2008).

3.6. Produção de Etanol Carburante

As fontes renováveis têm sido as soluções, tanto para minimizar os problemas ambientais, como para aumentar a segurança no suprimento de energia, uma vez que elas podem, em muitos casos, substituir as fontes convencionais de origem fóssil (SANTOS, 2007).

A substituição da utilização de gasolina por etanol em veículos automotores reduz em até 90% a emissão de dióxido de carbono, o que justifica o interesse na utilização de bioetanol como fonte de energia renovável e a grande atenção que este assunto tem recebido nos últimos anos (LAOPAIBOON et al., 2010; SERNASALDIVAR et al., 2009).

Depois de passadas algumas décadas desde as primeiras produções de etanol no Brasil e de crises do setor petrolífero mundial, ressurgiu, nos dias atuais, a proposta de estudar novas fontes de sua obtenção para inserção na matriz energética, uma vez que o etanol possui a vantagem de ser obtido a partir de fontes renováveis, de ser produzido no país com autossuficiência e de não ser tóxico (COSTA NETO et al., 2000).

O etanol (álcool etílico), $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$, é um dos principais álcoois existentes. Trata-se de um líquido incolor, inflamável e de odor característico, miscível em água e em outros compostos orgânicos. Apresenta ponto de fusão de $-114,1^\circ\text{C}$ e ponto de ebulição de $78,5^\circ\text{C}$ (REIS, 2006). Possui várias aplicações, sendo as mais comuns o chamado uso potável, alimentício e farmacêutico, além de usos menos nobres como o industrial (BRINGHENTI, 2004).

O etanol pode ser obtido por vários processos, tendo vegetais como fontes de matérias-primas. Ele possui aproximadamente 35% de oxigênio em sua composição e uma combustão pouco poluente, ou seja, sua queima resulta predominantemente em calor, sem presença de fuligem típica dos combustíveis de origem do petróleo (BRINGHENTI, 2004).

A preocupação para a utilização de biocombustíveis alternativos veio inicialmente com o desabastecimento de combustíveis no período da Primeira Guerra Mundial, amadurecendo a ideia de produção de etanol no Brasil com a obrigatoriedade de adição de 5% e posteriormente 22% de álcool na gasolina importada (GARNERO, 1980; SACHS, 2005). Na atualidade, as questões ambientais e acordos internacionais também têm contribuído para a valorização dos biocombustíveis, que em suma, são ditados pelos fatores econômicos, ecológicos e geopolíticos.

O álcool, a partir da cana, apresentou melhores condições na implantação de sua estrutura, em detrimento ao álcool produzido de outras fontes vegetais como, por exemplo, a mandioca, que não dispunha de meios produtivos desenvolvidos e confiáveis (MARCOCCIA, 2007). Entretanto, a produção de

álcool de mandioca poderia ser incentivada em regiões nas quais as condições de solo são impróprias para o cultivo da cana-de-açúcar e apropriadas para essa raiz, pouco exigente em fertilidade do solo. A produção, portanto, poderia ser feita em regiões de baixa densidade demográfica e de baixa renda per capita, como forma de melhorar a distribuição de renda no País e a transferência de tecnologias (CEREDA et al., 2003).

A utilização de etanol como combustível não é a única destinação que se pode dar a este produto. O uso como futuro elemento na geração de energia elétrica em células a combustíveis, equipamentos com eficiência energética superiores aos motores de combustão interna, é uma das possibilidades, além da elaboração de seus derivados e subprodutos como: amida, butila, etila, vinila, borrachas sintéticas, PVC e compostos plásticos em substituição a diversos elementos hoje provenientes do petróleo (MARCOCCIA, 2007).

Os processos atuais de produção do etanol se dividem basicamente em dois: o primeiro na utilização da fermentação direta dos açúcares existentes nas matérias-primas, como caldo de cana, melaço, caldo de sorgo; o segundo na fermentação indireta das matérias-primas, que tenham características amiláceas ou celulósicas como grão de cereais, mandioca, batata. Deste modo, o processo completo envolve as etapas de preparo do substrato, correção do mosto, preparo do inóculo, fermentação e destilação (MENEZES, 1980 *apud* MARCOCCIA, 2007).

A produção de álcool a partir de amido de mandioca possui algumas etapas no processo que são diferentes dos usados no processamento de cana-de-açúcar, os quais se baseiam principalmente no preparo da matéria prima e no sistema de fermentação. A cana-de-açúcar passa apenas por um processo simples para extração e fermentação do açúcar que se encontra no seu colmo. A mandioca, por possuir amido, passa por etapas de conversão deste amido em açúcares e depois sua fermentação, que ocorre por liquefação e sacarificação com o uso de enzimas (ABAM, 2006). Entretanto, a mandioca possui quantidades maiores de carboidratos por unidade de matéria prima, conseqüentemente tendo

bons rendimentos, o que justifica os investimentos na produção de etanol de amido de mandioca.

Os avanços biotecnológicos têm proporcionado condições ideais e ganhos de produtividade na fermentação de amido pela melhoria dos usos de linhagens de leveduras e de produção de enzimas bioengenheiradas.

As indústrias alimentícias são as maiores consumidoras de amido. Entretanto, é usado também em diversos fins industriais como espessante, ligante ou estabilizante em diferentes segmentos da indústria de alimentos nos processos de acabamento nas indústrias têxteis, e em vários produtos da indústria papelreira, tendo aplicações ainda na indústria química, metalúrgica, plástica, lavanderias (LEONEL; CEREDA, 2002; SILVA, 2006) e recentemente este produto tem atraído substancialmente a atenção do setor energético para a produção de etanol carburante (LEONEL; CEREDA, 2002).

No Brasil, uma das culturas com grande potencial na produção de amido para o setor de combustíveis é a de mandioca, de onde os hidrolisados podem ser elaborados com vantagens competitivas, através de processos mais rentáveis e com menor investimento. Isso é devido às características particulares dos substratos amiláceos, tais como maior concentração de açúcares, menor tempo de geleificação e menores teores de proteínas e lipídeos (SURMELY et al., 2003).

A obtenção de combustíveis a partir de biomassa tem se estabelecido como um desafio que transita desde políticas governamentais, sustentabilidade ambiental, reflexos sociais, econômicos e obrigatoriamente, pesquisas em diferentes áreas do conhecimento humano. A dependência dos combustíveis fósseis, a propalada extinção da matéria prima (petróleo) e o comprometimento da qualidade de vida no planeta, tem motivado a busca por diferentes alternativas (CUNHA; SEVERO FILHO, 2010).

3.7. Hidrólise do Amido

O amido é um dos mais abundantes polímeros encontrados na natureza e é constituído de dois compostos de elevado peso molecular, a amilose e a amilopectina (AGUERO, 1998; GONÇALVES, 2007). A amilose é formada por resíduos de α -D-glicose unidos por ligações α -1,4. A amilopectina é uma estrutura altamente ramificada, na qual os resíduos de α -D-glicose unidos por ligações α -1,4 são interconectadas por ligações α -1,6 (LEHNINGER, 2006). O conteúdo desses dois polímeros varia com a fonte de amido.

O amido pode ser desdobrado em moléculas menores tanto pela hidrólise química quanto pela hidrólise enzimática (CARIOCA; ARORA, 1984). No processo químico são usados ácidos minerais, tendo como principais produtos a pirodextrina e glicose. É um tratamento barato e bastante difundido nas indústrias brasileiras; porém, apresenta maiores dificuldades na obtenção de produtos de boa qualidade e exige cozimento sob pressão com temperatura alta (CEREDA et al., 2003; SURMELY et al., 2003). Na hidrólise enzimática, apesar dos custos um pouco mais elevados, existem diversas vantagens na obtenção dos hidrolisados de amido. Os produtos são de simples obtenção indo de glicose a dextrinas com menos resíduos indesejáveis. Neste processo faz-se o uso de enzimas amilolíticas que vão agir mais facilmente sobre o amido na presença de água e calor (SURMELY et al., 2003).

Diferentes amilases são utilizadas industrialmente para a produção de oligos ou monossacarídeos a partir do amido. Independente da origem do amido e dos produtos resultantes há três passos no tratamento do amido (BERTOLDO; ANTRANIKIAN, 2002; RAID, 2007).

O primeiro passo é feito com a solubilização do amido, que acontece em meio aquoso a altas temperaturas, pois os polímeros de amilose são insolúveis em água na temperatura ambiente, havendo alcalinização e posterior adição de cálcio no meio. A liquefação do amido é o segundo passo, que acontece por uso de endoamilases, como α -amilases termoestáveis de origem microbiana.

Ocorre em faixas de pH entre 6,0 e 6,2 a 95°C, produzindo dextrinas ramificadas e oligossacarídeos lineares. Por último, a finalização da liquefação ocorre por redução do pH da solução para o terceiro passo, a sacarificação, que ocorre a 60°C em faixas de pH entre 4,2 a 4,5 por cerca de 96 horas, sendo utilizadas exoamilases como glicoamilases de origem fúngica e amilases desramificadoras como a pululanase; neste passo, o uso de diferentes enzimas pode fornecer produtos e subprodutos diferenciados (BERTOLDO; ANTRANIKIAN, 2002; RAID, 2007).

3.8. Mutagênese

Segundo Azevedo (2008), a mutagênese pode ser definida como:

O material genético de um microrganismo, seja ele DNA ou RNA (no caso de certos vírus), pode ser modificado permanentemente e essa modificação, que é então capaz de se transmitir aos descendentes, é chamada de mutação. O resultado é o aparecimento de um indivíduo mutante distinguível do tipo original em uma ou mais características genéticas.

3.8.1. Classificação das mutações

Existem vários modos de classificar as mutações. Uma delas distingue dois tipos principais; o primeiro é a mutação espontânea. Sua frequência é específica para cada organismo e para cada gene, e resulta de alterações do material genético por erros que ocorrem na duplicação normal do ácido nucléico. Esses erros podem surgir por substituições ou ainda por inserções ou perdas de bases nitrogenadas no DNA, sem que haja um mecanismo de reparo dessas modificações. O segundo tipo, mutação induzida, é provocado por agentes físicos ou químicos denominados mutagênicos e que causam modificações no material genético (AZEVEDO, 2008).

Uma segunda classificação de mutações distingue aquelas que são devidas a alterações grosseiras nos cromossomos, as chamadas mutações ou aberrações cromossômicas, e aquelas que são devidas à substituição, adição ou

elisão de uma ou poucas bases nitrogenadas nos ácidos nucleicos e que são chamadas mutações gênicas ou de ponto (AZEVEDO, 2008).

Por sua vez, as aberrações cromossômicas podem ser numéricas quando há alteração no número de cromossomos, ou estruturais quando as alterações se verificam na estrutura dos cromossomos. As aberrações numéricas podem ser do tipo chamado de euploidia, quando há variação em uma série completa de cromossomos; assim, um organismo que é diplóide e tem seu número de cromossomos dobrado torna-se um tetraplóide. A tetraploidia é, portanto, um tipo de aberração cromossômica numérica euplóide (AZEVEDO, 2008).

Outro tipo de aberração cromossômica numérica é chamado aneuploidia, que se manifesta pela perda ou adição de um ou poucos cromossomos, mas não da série cromossômica completa (AZEVEDO, 2008).

Outro tipo de aberração cromossômica é a chamada estrutural. Nesse caso, a variação cromossômica se manifesta não no número de cromossomos, mas na sua estrutura. Se ocorrer perda da parte de um cromossomo, a aberração é chamada de deficiência, deleção ou depleção; se ocorrer aumento de um segmento cromossômico, ela é chamada de duplicação cromossômica. Pode ainda ocorrer inversão ou translocação de um segmento cromossômico dentro de um mesmo cromossomo ou entre diferentes cromossomos. Recentemente, foi descrito, do ponto de vista molecular, um sistema pelo qual uma sequência de nucleotídios pode ser transposta originando inserções e depleções, mediadas por elementos transponíveis, os transposons (AZEVEDO, 2008).

As mutações gênicas, ou de ponto, referem-se à alteração de uma ou poucas bases nos ácidos nucleicos. Elas podem ocorrer por substituição de uma base por outra e, nesse caso, podem ser do tipo de transição (uma purina ou pirimidina, substituída por outra purina ou outra pirimidina, respectivamente) ou transversão (uma purina substituída por uma pirimidina ou vice-versa) (AZEVEDO, 2008).

Um segundo tipo de mutação gênica é a causada pela adição ou depleção de uma ou poucas bases no material genético. De fato, essas mutações, embora consideradas gênicas, são diferentes apenas em qualidade das mutações estruturais dos tipos duplicação e depleção, respectivamente, afetando, em geral, vários genes. Aliás, desde já se deve ter em mente que os fenômenos biológicos ocorrem geralmente em um gradiente, não existindo limites rígidos entre eles. É o pesquisador que, por finalidade de maior clareza, define classes dividindo processos que, na realidade, são contínuos (AZEVEDO, 2008).

3.8.2. Bases moleculares da mutação

Os ácidos nucléicos, especialmente o DNA, que é o material genético da maioria dos seres vivos, apresentam uma duplicação bastante fiel. Isso significa que o DNA tem sua sequência de bases muito pouco modificada cada vez que uma célula dá origem a duas células. Todavia, ocorrem modificações e algumas delas não alteram a sequência de bases nitrogenadas: são, por exemplo, metilações que modificam as bases sem alterar suas propriedades de pareamento ou de transcrição. Outras modificações, no entanto, sejam elas por substituição de bases ou mesmo por adição e perda de bases, são mutacionais (AZEVEDO, 2008).

As principais propriedades para que uma macromolécula atue como material genético são a sua duplicação e a mutação. A duplicação permite, se fiel, a manutenção das características genéticas da espécie. No entanto, essa fidelidade de duplicação impede a variação, característica geral dos seres vivos. A existência de diferentes espécies de seres vivos e a grande variabilidade existente, mesmo dentro de uma única espécie, mostram que, apesar de o material genético ser o mesmo, ou seja, um ácido nucléico, ele nem sempre produz o mesmo fenótipo. Isso é devido à mutação espontânea por modificações permanentes na molécula do DNA. Até 1927, o estudo das mutações sofria uma séria limitação, pois não se conhecia um modo de aumentar o pequeno número de mutantes que espontaneamente aparecia (AZEVEDO, 2008). Muller (1927) verificou pela primeira vez, que as mutações poderiam ser induzidas por

radiações e, em anos subsequentes, uma série de outros agentes capazes de induzir mutações foi descoberta.

3.8.3. Mutações induzidas

São muitos os agentes físicos e químicos capazes de aumentar a frequência de mutação. No entanto, nem todos têm sido estudados com relação às alterações que eles causam em moléculas de ácidos nucleicos. Dos mutagênicos químicos, os que têm o processo de causa de modificações em ácidos nucleicos bem definidos são, entre outros, os análogos de bases, o ácido nitroso, a hidroxilamina, as acridinas e os agentes alquilantes. Dentre os agentes físicos, salientam-se as radiações ionizantes e a luz ultravioleta (AZEVEDO, 2008).

3.8.3.1. Radiações ionizantes

Radiações, como os raios X e as radiações gama, são altamente mutagênicas. Os raios X tem, por exemplo, comprimento de onda bem curta (0,1 a 10 Å) e são bastante penetrantes. Na sua penetração, as radiações colidem com átomos, retiram elétrons deles e estes ficam em estado iônico. Daí provém o nome de radiações ionizantes. Quanto maior é a dose de radiação, maior é o número de mutantes induzidos. Devido a essa correlação entre dose e mutação, vários autores propuseram a teoria do alvo em que o gene, funcionando como alvo e sendo atingido, sofreria mutação. Através de depleções terminais (um evento) ou intersticiais (dois eventos) em cromossomos, verifica-se que a teoria do alvo se aplica bem aos resultados obtidos em grande número de casos. No entanto, além do efeito direto, a radiação pode também indiretamente causar mutações. A ionização da água produz H e OH que na presença de oxigênio forma H₂O₂ (AZEVEDO, 2008).

Os peróxidos são extremamente reativos e podem ser os responsáveis por mutações causadas por radiações ionizantes. Contudo, a maioria das mutações

causadas por radiações ionizantes é cromossômica, embora uma fração seja gênica (AZEVEDO, 2008).

As radiações ionizantes exercem efeitos que podem ser reparados pelas células. Um dos mecanismos de reparo que ocorre é o rápido (até uma hora após a radiação) e o outro é o lento. Esses mecanismos devem envolver enzimas de reparo, como também ocorre com a luz ultravioleta e outros agentes (AZEVEDO, 2008).

3.8.3.2. Luz ultravioleta

A luz ultravioleta causa mutações gênicas e também, em doses maiores, mutações cromossômicas. Estudos *in vitro* mostram que esse mutagênico provoca a formação de dímeros de pirimidina no DNA. Duas pirimidinas adjacentes são assim ligadas por um anel ciclobutano. Em bactérias, a maioria dos dímeros (50%) é de timina, seguindo-se os de timina-citosina (40%) e os de citosina (10%). Também, em pequena escala, ela pode hidratar a citosina que então se comporta como uracila (AZEVEDO, 2008).

Em *E. coli*, uma irradiação de 1 erg/mm^2 dá seis dímeros de pirimidinas por genoma. À semelhança do que ocorre com outros mutagênicos, os efeitos lesivos da luz ultravioleta podem ser também reparados (AZEVEDO, 2008).

3.8.3.2.1. Fotorreativação

Se após a irradiação uma bactéria for colocada na presença de luz visível, os dímeros formados por luz ultravioleta são monomerizados por rompimento do anel ciclobutano. Existe uma enzima que é ativada por luz visível, e que faz esse trabalho. De fato, existem mutantes, os *Phr-* (*photoreactivation*), que não possuem essa enzima ativa e, portanto, não monomerizam os dímeros. Mutantes *Phr-* são bastante sensíveis à luz ultravioleta, mesmo na presença da luz visível. Por exemplo, mutantes resistentes à estreptomicina são dez vezes mais freqüentes em linhagem *Phr-* que em linhagens normais. O reparo pela enzima PRE ou

fotoliase, como é chamada a enzima fotorreativadora, ocorre *in situ*, ou seja, os dímeros são monomerizados na própria molécula. O gene *PhrA*, cuja expressão é controlada pelo produto de outro gene, o *PhrB*, está envolvido no processo em *E. coli* (AZEVEDO, 2008).

3.8.3.2.2. Reparo por excisão (dark repair)

Nesse caso, não há necessidade de luz visível para que ocorra reparo. Os dímeros de pirimidina são removidos por quebras feitas por endonucleases (enzimas que rompem internamente o DNA) em regiões próximas aos dímeros, seguida da retirada de segmentos de DNA, contendo o dímero, feita por exonucleases, enzimas que degradam o DNA a partir das extremidades. Vem, em seguida, uma nova síntese de DNA na região extirpada, utilizando como molde, a outra fita de DNA; essa síntese é feita por enzimas, as DNA-polimerases. Finalmente, outra enzima, a polinucleotídeo ligase, codificada pelo gene *lig A*, junta o pedaço recém-sintetizado ao outro. Esse deve ser o mecanismo mais importante de reparo do DNA. Como ele envolve várias enzimas, é de se esperar que ocorram diferentes mutantes, detectados pela sua maior sensibilidade à luz ultravioleta, que apresentam defeitos no sistema *Hcr* (*Host cell reactivation*). Células *Hcr* não têm seus dímeros retirados após irradiação; mesmo os fagos irradiados e colocados dentro dessas células não têm efeitos danosos da ultravioleta reparados. Enquanto linhagens *Hcr+* dão 0,4 mutantes resistentes à estreptomicina por 10^7 células tratadas com 120 ergs/mm^2 de irradiação, as *Hcr* dão 200 mutantes. Outros mutantes, como *UvrA*, *UvrB* e *UvrC*, também tem o sistema de reparo alterado (AZEVEDO, 2008).

O reparo por excisão pode ocorrer por retirada da base lesada (excisão de base) e colocação de outra não-lesada, mas, em geral, o que se verifica é a retirada por nucleases de regiões adjacentes ao ponto de lesão, as quais podem ter até dezenas ou milhares de bases (AZEVEDO, 2008).

3.8.3.2.3. Reparo após a duplicação do DNA

Esse tipo de mecanismo de reparo ocorre após a duplicação. Mutantes que afetam a recombinação, portanto, são mais sensíveis à luz ultravioleta. Os mutantes *recA*, *recB* e *recC*, que têm recombinação ausente ou diminuída, são então bastante sensíveis à luz ultravioleta, por não efetuarem o mecanismo de reparo após a duplicação do DNA (AZEVEDO, 2008).

3.8.3.3. O mecanismo de mutação por luz ultravioleta

Diversas são as hipóteses para explicar a mutação causada pela luz ultravioleta e o assunto é complexo. Se o dímero de pirimidina não for retirado, ele não pode ser copiado, resultando então “vazios” de cerca de 1.000 nucleotídeos. Como células mutantes *recA* e *lexA*, apesar de serem sensíveis à luz ultravioleta, não sofrem mutação por esse mutagênico, supõe-se que todo o efeito mutagênico dessa irradiação ocorra durante o mecanismo de reparo na duplicação. Por outro lado, mutantes *Uvr*, que tem defeitos no sistema de reparo por excisão, são mutáveis por luz ultravioleta, indicando que não é esse sistema o responsável por erros de cópia. Mutantes *recB* e *recC* também são menos mutáveis que as linhagens originais selvagens. Com base nesse e em outros resultados, foi proposto o sistema de reparo chamado SOS, em que a mutação por luz ultravioleta dependeria de uma função induzível pela própria luz ultravioleta, como também ocorre quando o fago lambda de lisogênico passa a lítico em células bacterianas. Para a indução dessa função, os produtos dos genes *recA* e *lexA* são necessários.

O DNA danificado emitiria um sinal regulador que causaria depressão de várias funções para promover a sobrevivência da bactéria, mesmo com dímeros de timina em seu DNA (funções SOS). No entanto, esse sistema de reparo, em que atuam os produtos de *recA* e *lexA*, é sujeito a erros. A hipótese é válida para ultravioleta e outros agentes que provocam a introdução de estruturas anômalas no DNA, como é o caso de dímeros de pirimidina. A mutação por ultravioleta seria, assim, devida a erros de reparo, quando falhas no DNA do fio complementar ao que possui o dímero são preenchidas (AZEVEDO, 2008).

3.8.3.4. Antimutagênicos

Certas substâncias, em lugar de aumentar, acarretam uma diminuição na frequência de mutantes. Essas substâncias são então chamadas de antimutagênicas. A espermidina, além de outras, são antimutagênicas. Pode ser que elas atuem em sistemas de reparo, diminuindo o número de erros (AZEVEDO, 2008).

3.8.4. O conceito de clone

Um ser vivo só pode ser estudado geneticamente se apresentar mutantes que sejam diferentes do tipo original ou selvagem. A obtenção de mutantes em microrganismos é, assim, extremamente importante para o seu estudo genético. À primeira vista, pode parecer difícil que, em organismos microscópicos, sejam obtidos diferentes tipos com características hereditárias distintas e bem definidas. Entretanto, a maioria dos microrganismos pode se originar de uma célula que, por divisões celulares, dá, em progressão geométrica, muitas células que formam colônias em meios de cultura sólidos. Assim, uma colônia, visível a olho nu, representa na realidade um clone, isto é, um grupo de células todas iguais geneticamente. Portanto, na prática, a análise de uma colônia representa a análise de um único indivíduo ou célula que deu origem a essa colônia. Em uma colônia, diferenças macroscópicas podem ser detectadas por comparação com outras, sendo possível a detecção de mutantes sem o uso sequer de microscópio. Nesse particular, a genética microbiana se assemelha à genética de qualquer outro ser vivo, inclusive planta e animais (AZEVEDO, 2008).

São muitos os tipos de mutantes que podem ser encontrados e estudados em fungos, bactérias e outros microrganismos.

3.8.5. O uso de mutagênicos no isolamento de mutantes em microrganismos.

Como a mutação é um evento raro, é aconselhável o uso de agentes mutagênicos físicos ou químicos que produzem um acréscimo na frequência de

mutação, sendo mais fácil a obtenção de mutantes dos vários tipos quando mutagênicos são utilizados. A escolha do mutagênico vai depender muito do tipo de microrganismo, das disponibilidades do laboratório onde o experimento é realizado e das finalidades da mutação que se quer obter. Em geral, a luz ultravioleta – de baixo custo, encontrada facilmente em laboratórios, e de fácil e segura manipulação, desde que a vista do operador seja protegida com óculos – é o agente mutagênico de escolha. No entanto, para microrganismos com altas quantidades de pigmento, ela não funciona adequadamente. Nesse caso, outros mutagênicos – as radiações ionizantes ou os agentes químicos – são bastante empregados. Porém, esses agentes são, em geral, carcinogênicos e tóxicos, devendo-se ter muito cuidado com sua manipulação (PIZZIRANI-KLEINER et al., 1998).

A utilização de um microrganismo em um processo biotecnológico geralmente envolve a produção de algum composto de interesse. No entanto, as espécies encontradas na natureza normalmente não produzem grandes quantidades de metabólitos secundários, ou seja, produzem somente o necessário para a sua sobrevivência. Por isso, cabe ao biotecnologista melhorar essa produção e aplicá-la em escala industrial. A manipulação genética é utilizada pela biotecnologia, consistindo em uma ferramenta muito útil para: i) aumentar o rendimento da produção de um dado composto de interesse, ii) melhorar a qualidade do processo de produção, iii) melhorar as características do produto obtido ou iv) obter produtos novos não encontrados na natureza (PIZZIRANI-KLEINER et al., 1998).

A modificação do material genético pode ser feita de duas formas: ação de agentes mutagênicos (químicos ou físicos) ou engenharia genética, visando à obtenção de DNA recombinante. As duas metodologias permitem a obtenção de genótipos diferentes do original, sendo que a recombinação permite a inserção de material genético de várias fontes em um só microrganismo, enquanto a mutagênese permite a modificação aleatória dos genes (PIZZIRANI-KLEINER et al., 1998).

Mutantes podem ser obtidos por meio de irradiação por luz ultra-violeta (UV). Nesse caso, o aumento da produção do composto de interesse pode ser obtido com a duplicação do mesmo gene presente na célula e, conseqüentemente, com o aumento do seu nível de expressão. Para a obtenção de mutantes por meio de UV, é necessário realizar uma curva de sobrevivência, a qual será utilizada como padrão, para determinar qual tempo de irradiação (exposição à luz UV) permite a obtenção de 5% de sobreviventes do microrganismo em estudo. Essa frequência de sobreviventes (5%) é a que permite a obtenção de um maior número de mutantes, sendo de fundamental importância determinar o tempo de exposição à luz UV que a forneça (PIZZIRANI-KLEINER et al., 1998).

5. CAPÍTULO 1: Experimentos com bactérias do gênero *Bacillus* sp.

5.1. INTRODUÇÃO

Atualmente, as α -amilases comercializadas são produzidas por *Bacillus licheniformis* e *Bacillus amyloliquefaciens* por fermentação submersa e tem como principal característica, serem resistentes a elevadas temperaturas. Essas enzimas apresentam aplicações nos seguintes segmentos industriais: têxtil, alimentícia, farmacêutica, de bebidas, de detergentes, de papel e atualmente sua importância vem aumentando por participar do processo de produção de etanol carburante a partir de substratos amiláceos (MOREIRA; SIQUEIRA, 2002).

Microrganismos do solo, principalmente fungos e bactérias, são as fontes mais comuns de α -amilases para uso comercial e para a pesquisa científica. Diferentemente das enzimas vegetais e animais, as de origem microbiana não dependem de situações climáticas favoráveis, pois podem ser produzidas em fermentadores onde as condições de cultivo podem ser controladas e monitoradas eletronicamente (MOREIRA; SIQUEIRA, 2002).

Na Amazônia, há poucos estudos realizados com microrganismos produtores de enzimas cultiváveis a partir de solo. Devido à importância industrial das α -amilases, foi proposto nesse projeto, a mutação de duas estirpes pertencentes ao gênero *Bacillus* sp. obtidas de solos do Amazonas e a caracterização de alfa-amilases secretadas por esses mutantes.

5.2. MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1. Mutantes de *Bacillus* sp.

Para obtenção da mutação, foram escolhidos os dois melhores isolados a partir de ensaios enzimáticos já realizados (OLIVEIRA, 2010). Os mutantes adquiridos neste trabalho foram denominados Mutantes Isolados Termofílicos Amilolíticos do Amazonas (M-ITAAM).

5.2.2. Exposição dos microrganismos ao agente mutagênico

A exposição à irradiação com luz ultravioleta foi utilizada para obter uma curva de sobrevivência dos microrganismos, determinando o tempo que promoveu 5% de sobrevivência e aparecimento de mutantes. Obteve-se curva de sobrevivência que foi utilizada como referência para um tempo de tratamento que resulte numa maior frequência de mutantes em relação aos sobreviventes.

Para a construção da curva, geração e seleção dos mutantes, colônias dos microrganismos em estudo foram transferidas para erlenmeyers contendo meio de cultura LB, onde passaram 48 horas na temperatura de 55°C para crescimento. Quando retirados da estufa, foram contados em câmara de Neubauer para calcular a concentração de células e planejar quantas diluições seriam necessárias para ter no final, cerca de 10^4 UFC. mL⁻¹. Essa suspensão final foi usada (5 mL) em cada placa de Petri (Figura 1), procedendo-se a exposição direta à UV na capela de fluxo laminar pelos tempos planejados de 0 (controle), 7, 14, 21 e 28 minutos, planejando-se obter 5% de mutantes.

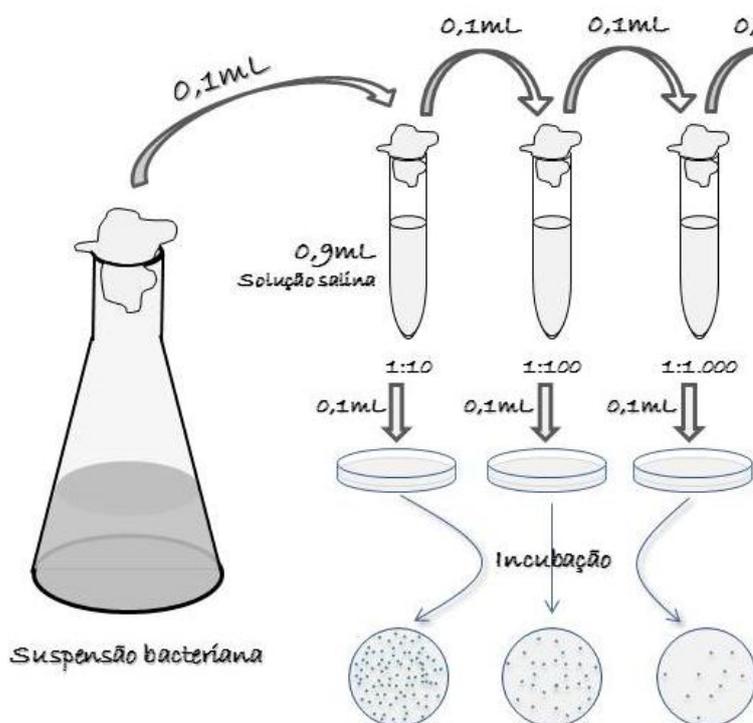


Figura 1. Diluição em série de bactérias.

Após cada tempo de exposição à UV (Figura 2), foram retirados 100 μ L da suspensão bacteriana e inoculado em placa de Petri contendo meio de cultivo LB contendo amido 1% para crescimento. As culturas foram incubadas por 48 horas a 55°C para o fornecimento do título de sobrevivência, em comparação com o tratamento controle, sem irradiação com UV (Tempo Zero). Decorrido este período foi observado o crescimento das colônias e calculada a frequência das mesmas, comparando com a frequência do controle. Dessa forma determinou-se qual o tempo que promove uma taxa de sobrevivência de 5% das células irradiadas, as quais foram escolhidas para estudo.

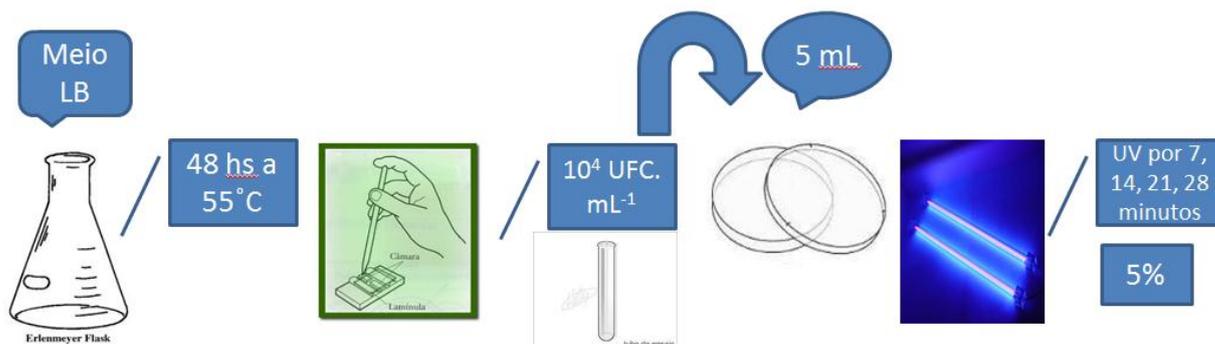


Figura 2. Construção da curva de mutantes.

O aspecto morfológico das colônias alteradas em relação à linhagem selvagem utilizada como controle foi comparado por observação direta e os microrganismos sobreviventes foram selecionados quanto à produção de amilase (Figuras 3 e 4).



Figura 3. Comparação entre o ITAAM 010 e o ITAAM 010M

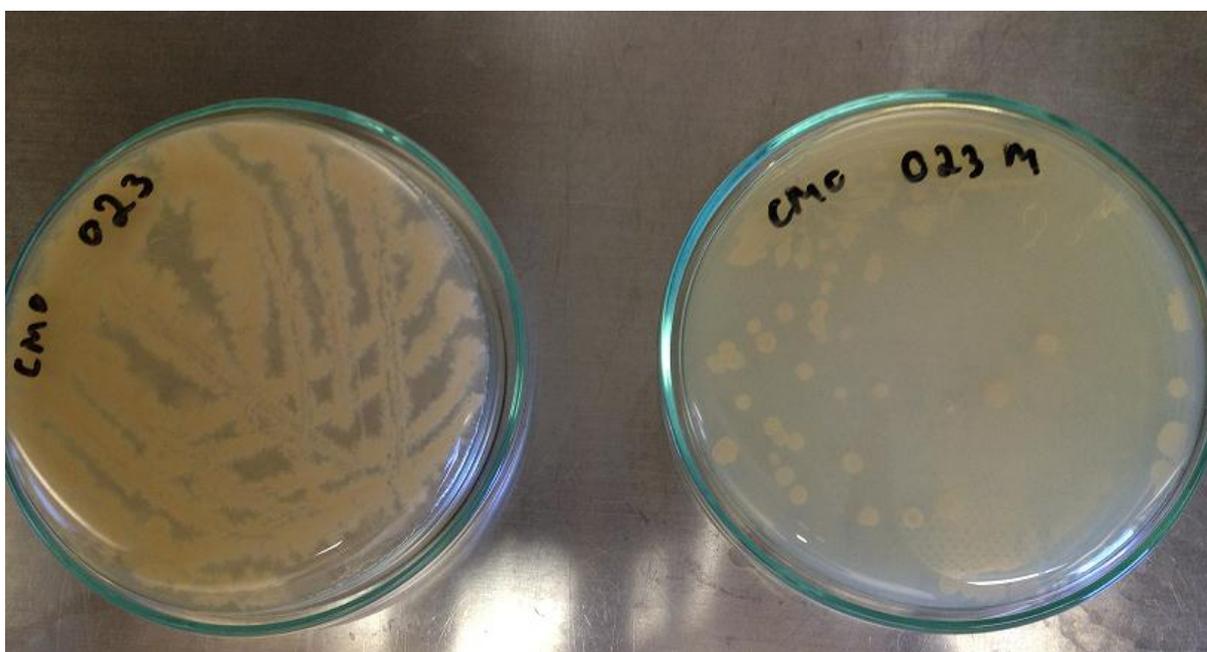


Figura 4. Comparação entre o ITAAM 023 e o ITAAM 023M

Procedimento para bactérias

- a) Foi inoculada uma colônia pura em meio de cultura LB contendo amido 1% e incubada a 55°C por 48 horas;
- b) Decorrido este período, homogeneizou-se em vortex e retirou-se uma alíquota para leitura da densidade óptica (OD);
- c) Procedeu-se à diluição do inóculo inicial, transferindo 1mL da cultura para 9mL de solução salina;
- d) Para o tempo zero (controle positivo): retirou-se 1mL da suspensão 10^{-1} , procedendo-se uma série de diluição (10^{-2} a 10^{-3} em solução salina). Semeou-se 100 μ L no meio de cultura utilizando alça de Drigalski, vedou-se as placas já identificadas com filme PVC. Incubou-se durante 48 horas a 55°C. Essas placas forneceram o título de sobrevivência no tempo zero, ou seja, sem irradiação;
- e) O restante da suspensão (9mL) foi colocado em uma placa de Petri esterilizada em fluxo laminar. Em seguida, submeteu-se a placa com a suspensão de células à irradiação por UV, em diferentes tempos de exposição (7, 14, 21 e 28 minutos).
- f) Após a retirada do volume no tempo de 7 minutos, voltou-se a placa contendo a suspensão, continuando a irradiação nos demais tempos;
- g) Incubou-se as placas a 55°C durante 48 horas.

Após o crescimento, foi verificado qual o tempo de irradiação que irá ocasionar a sobrevivência de somente 5% de cada isolado. Os tempos e as porcentagens obtidos neste experimento estão esquematizados nas figuras 6 e 7.

5.2.3. Seleção dos mutantes produtores de amilase

Após a irradiação com luz ultravioleta, foram selecionados os mutantes que apresentaram maiores médias de crescimento pela metodologia de Oliveira e Magalhães (1999). As colônias de bactérias isoladas foram crescidas por 48 horas na temperatura de 55°C em meio de cultivo LB contendo amido 1% para testes enzimáticos.

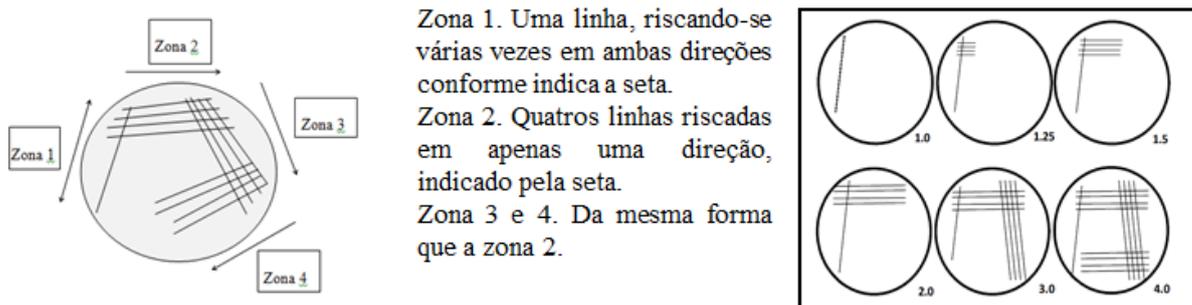


Figura 5. Metodologia de Oliveira e Magalhães (1999)

5.2.4. Índice de Amilólise

Os mutantes selecionados foram testados quanto à formação de halo no meio de cultivo usando-se a coloração de vapor de iodo para determinação do índice de amilólise (IA), que foi definido como a razão entre o diâmetro da colônia e o diâmetro do Halo.

Na metodologia, foram colocados grânulos de iodo em placas de petri vazias e, acima dessas placas foram colocadas as placas de petri contendo as culturas de bactérias crescidas em meio LB contendo amido a 1%, que foram abertas e viradas para baixo. Dessa forma, pôde-se verificar a formação de halo por vapor de iodo.

As colônias que apresentaram maiores índices foram selecionadas para os estudos subsequentes das enzimas secretadas pelos mutantes (HANKIN e ANAGNOSTAKIS, 1975).

5.2.5. Teste de iodo e turbidez em função do amido dos mutantes de *Bacillus* sp.

Os mutantes de *Bacillus* sp. foram testados quanto à turbidez e iodo em meio líquido contendo amido, sendo avaliados no dia do inóculo, com 1, 2 e 3 dias de incubação.

Na metodologia de iodo, se inocula as bactérias em meio de cultivo líquido contendo amido a 1% (neste caso foi utilizado o meio LB) e se tira uma pequena alíquota de 1mL a cada dia de observação. Essa alíquota é colocada em microtubo de volume 1,5mL onde é colocada uma gota de iodo líquido, verificando-se, assim, a coloração apresentada.

Na metodologia de turbidez, se inocula as bactérias em meio de cultivo líquido contendo amido a 1% (neste caso foi utilizado o meio LB) e se faz observação visual de turbidez. O amido deixa o meio turvo e, com a ação da amilase produzida pela bactéria, vai se tornando mais límpido após cada dia de observação.

5.2.6. Atividade de enzimas amilolíticas produzidas pelos clones mutantes selecionados

Os caldos enzimáticos ou sobrenadantes utilizados nestes testes foram obtidos se inoculando as bactérias em meio LB líquido contendo amido a 1% e esperando que essas crescessem.

Após o crescimento se fez a contagem de células pela câmara de Neubauer e centrifugação inóculo. As células foram descartadas e o sobrenadante foi diluído com meio de cultura LB sem amido até chegar a uma concentração que se equivale a 10^6 de células.

Ensaio para alpha-amilase, Método Dextrinizante – FUWA (1954).

O substrato para reação enzimática foi preparado dissolvendo-se por fervura, 1,0g de amido solúvel em 100mL de água, seguido de resfriamento até 40°C. O reagente de FUWA foi confeccionado misturando-se as soluções de KI a 10%, I₂ a 1% e de água destilada nas proporções de 1V/1V/3V. O ensaio consistiu da incubação de 6µL do caldo enzimático a ser estudado, 4µL de tampão acetato de sódio 0,5M pH 6,5 e 10µL de amido solúvel a 1% por 10 minutos a 90°C, paralisando-se a reação com a adição de 20µL de ácido acético 1M.

Tabela 1. Esquema do Método Dextrinizante – FUWA (1954).

	Branco	Zero	Controle	Teste
	-----µL-----			
Sol. amido 1%	0	10	0	10
Tampão Acetato pH 6,5	20	10	14	4
Enzima	0	0	0	6
Incubar a mistura a 90°C por 10 minutos				
Ácido acético 1M	20	20	20	20
Enzima	0	0	6	0
Reagente de FUWA	20	20	20	20
Água destilada	940	940	940	940
Total	1000	1000	1000	1000
Homogeneizar por inversão; Medir a absorbância em 660 nm Uma unidade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para hidrolisar 0,1 mg de amido (FUWA, 1954).				

Em seguida, adicionou-se 940µL de água e 20µL de reagente FUWA, homogeneizando-se o sistema por inversão e medindo-se a degradação do amido pela diminuição da absorbância a 660nm em relação ao branco preparado com: 940µL de água, nada de amido, 20µL de tampão acetato de sódio, 20µL de ácido acético e 20µL do reagente FUWA (1954) (Tabela 1).

- Todos os ensaios enzimáticos foram realizados pelo método de FUWA (1954).
- Todos os testes relacionados à temperatura foram feitos em termomixer.
- A concentração de células de todos os microrganismos para a obtenção dos sobrenadantes enzimáticos foi padronizada para 10⁶ UFC/mL.

5.2.6.1. Ensaio enzimático a 90°C

Foram feitos ensaios enzimáticos com as enzimas dos clones mutantes (M-ITAAM) para testar suas atividades enzimáticas na temperatura de 90°C por 10 minutos. A partir desse primeiro ensaio, foi permitida a escolha dos outros ensaios a serem feitos.

5.2.6.2. Determinação da temperatura ótima

Foram testadas as temperaturas de 20°C, 30°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C, 80°C, 90°C e 100°C por um tempo de 10 minutos, para definir quais as temperaturas que apresentaram maiores atividades das enzimas dos mutantes selecionados.

5.2.6.3. Determinação do pH ótimo

Foram realizados ensaios com os tampões Acetato de Sódio nos pH's 3,5, 4,5, 5,5, 6,5, 7,5 e 8,5 para testar quais os pH's que apresentaram melhores atividades enzimáticas referentes às enzimas dos microrganismos nas temperaturas que mostraram melhores resultados no teste anterior.

5.2.6.4. Tempo ótimo de incubação das enzimas dos mutantes

As enzimas dos mutantes foram testadas a 80°C, 90°C e 100°C. Os testes foram realizados nos tempos de 5, 10, 15, 20, 30 e 45 minutos para verificar os tempos que apresentam maiores atividades enzimáticas.

5.2.6.5. Choque térmico

As enzimas dos microrganismos foram testadas a 70°C, 80°C e 90°C pelos tempos de 5, 10, 15, 20, 30 e 45 minutos. Após esse tempo, foram colocadas em gelo para resfriamento e depois submetidas ao ensaio dextrinizante (FUWA, 1954) nos melhores tempos e temperaturas já estipulados nos testes anteriores para verificar sua resistência a mudanças bruscas de temperatura.

5.2.6.6. Termoestabilidade

As enzimas dos mutantes de *Bacillus* sp. foram testadas quanto à termoestabilidade nas temperaturas 70°C, 80°C, 90°C e 100°C, nos tempos de 40, 50, 60, 70, 80 e 90 minutos para verificar suas estabilidades em altas temperaturas

5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1. Mutação dos *Bacillus* sp.

No experimento de mutação para a obtenção de *Bacillus* sp. com elevadas características biotecnológicas, o objetivo foi encontrar um tempo de irradiação com luz ultravioleta em que somente 5% dos microrganismos sobrevivessem. O tempo de irradiação que proporcionou essa taxa de sobrevivência foi o de 28 minutos para ambos os isolados testados de *Bacillus* sp., em que o ITAAM 010 (Figura 6) apresentou taxa de sobrevivência de 5,23% e o ITAAM 023 (Figura 7) apresentou 5,11% em uma concentração final de 10^3 UFC/mL.

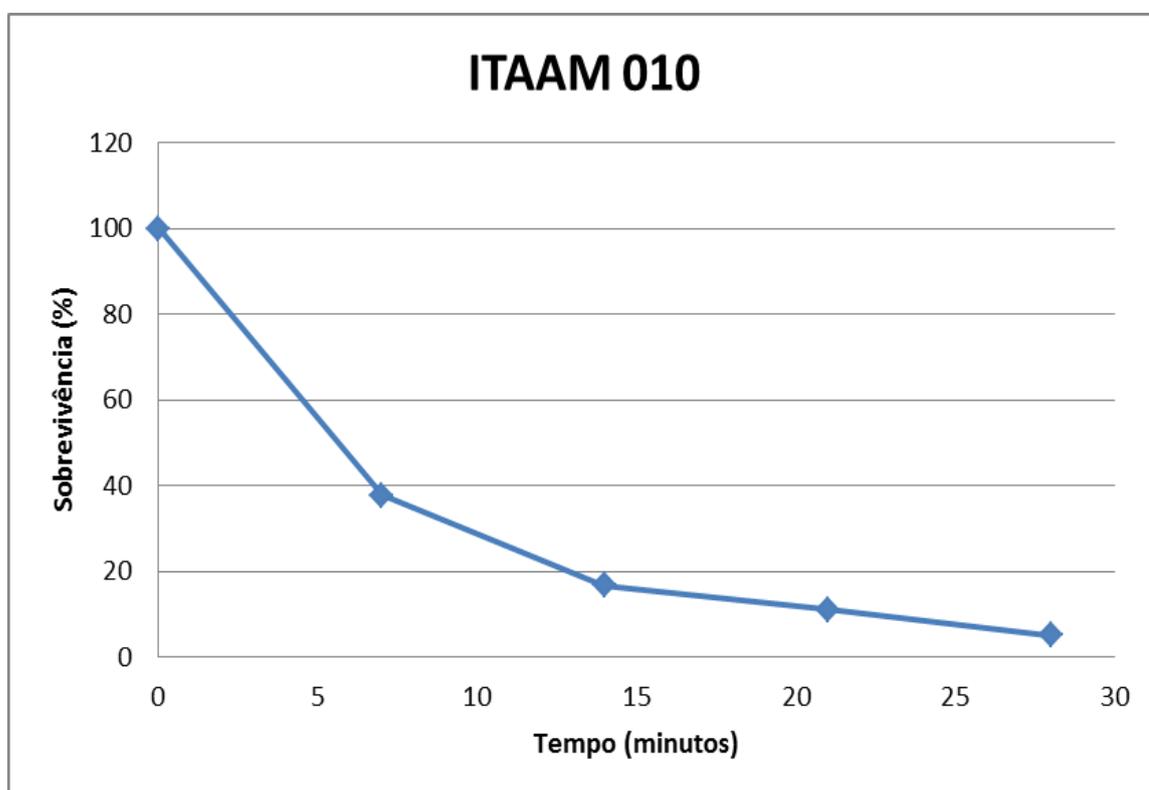


Figura 6. Curva de sobrevivência do ITAAM 010.

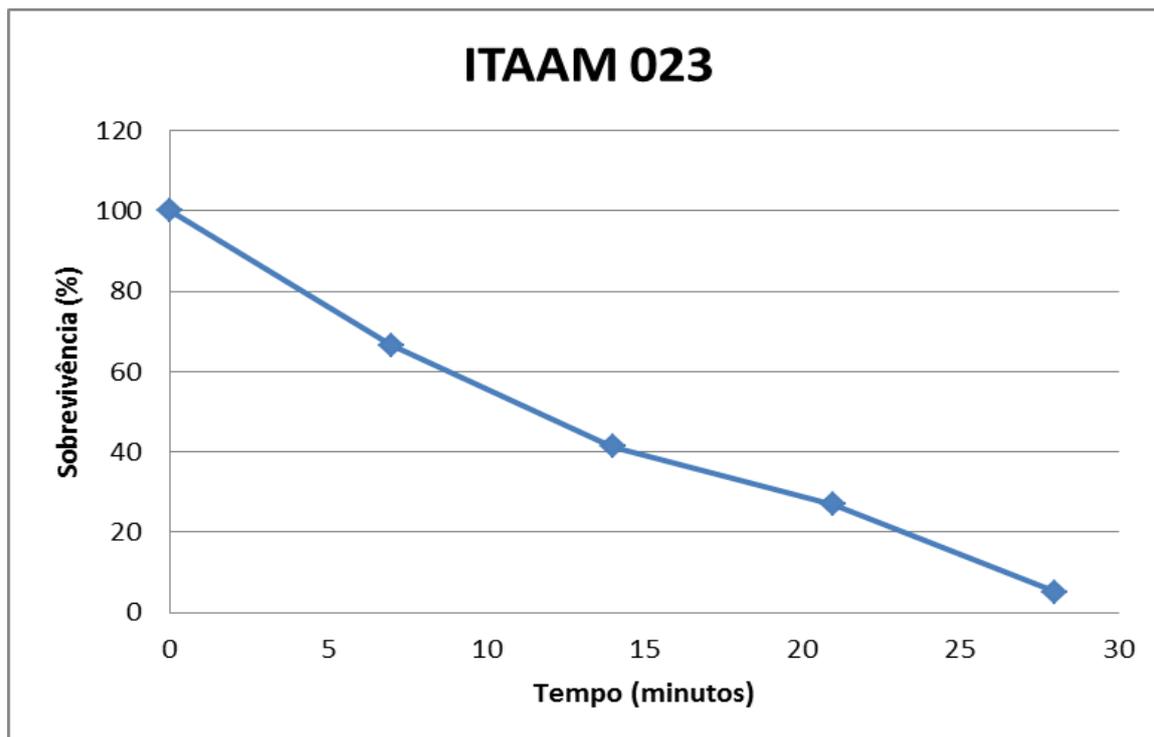


Figura 7. Curva de sobrevivência do ITAAM 023.

5.3.2. Seleção dos mutantes do ITAAM 010 e ITAAM 023 produtores de amilase

Foram escolhidas seis colônias de mutantes numeradas de 1 a 6 de cada isolado e inoculadas em meio LB contendo amido a 1% para verificar o crescimento em 3 dias na temperatura de 55°C.

Na tabela 2 observa-se que as colônias que mostraram maior crescimento foram 010-3 (mutante do ITAAM 010) com crescimento de valor 3,88 e a 023-3 (mutante do ITAAM 023), com crescimento de valor 4,00 no final da análise. As colônias escolhidas foram nomeadas como 010M e 023M, sendo utilizadas para os testes posteriores juntamente com as estirpes de rizóbios.

Tabela 2. Crescimento das colônias de mutantes em meio com amido. Médias de quatro repetições.

Mutantes da ITAAAM 010		Mutantes da ITAAM 023	
Colônia	Nota de crescimento	Colônia	Nota de crescimento
1	2,50	1	3,25
2	2,75	2	2,00
3	3,88	3	4,00
4	3,50	4	2,75
5	3,00	5	2,75
6	2,75	6	3,00

Obs.: Notas segundo Oliveira e Magalhães (1999).

5.3.3. Índice de amilolise dos mutantes de *Bacillus* sp.

A verificação da atividade enzimática visual dos mutantes selecionados foi determinada pelo índice de amilolise, determinado por meio da relação entre o diâmetro do halo e o diâmetro da colônia após a coloração com o vapor de iodo (HANKIN; ANAGNOSTAKIS, 1975).

Neste teste foi verificado que o mutante 023M mostrou o maior valor, com índice de 1,5, enquanto que o mutante 010M mostrou valor 1,2 (Tabela 3).

Tabela 3. Índice de amilolise dos mutantes de *Bacillus* sp. estudados.

	Bactérias	Diâmetro		IA (dh/dc)
		Halo (dh)	Colônia (dc)	
		----- cm -----		
1	010M	2,9	2,4	1,2
2	023M	1,8	1,2	1,5

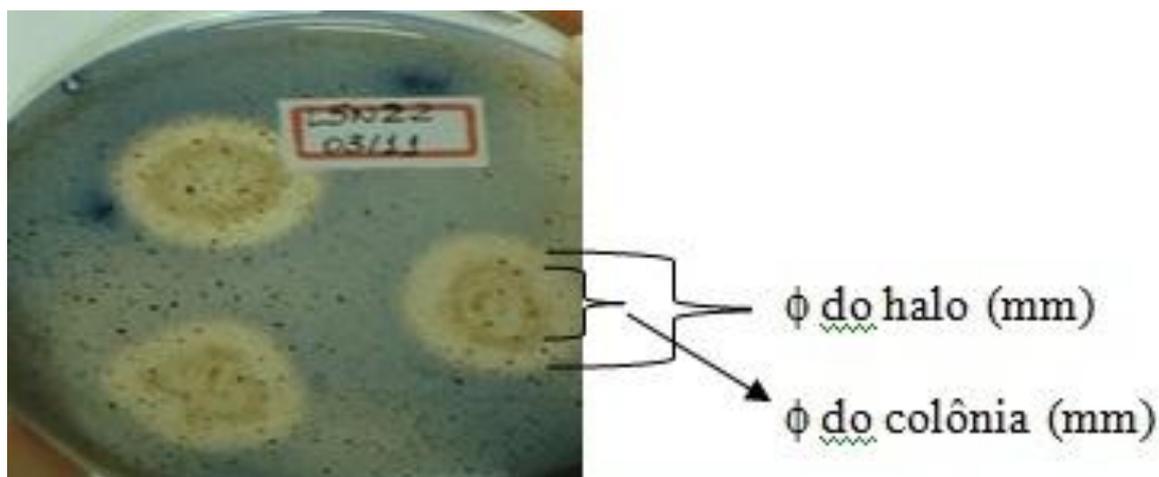


Figura 8. Colônia com halo de amilolise.

5.3.4. Teste do iodo na presença do amido

Verificou-se que nenhum microrganismo teve atividade amilolítica que resultou no aparecimento da cor amarela durante o experimento. Porém, com três dias de observação, o mutante ITAAM 010M apresentou coloração roxo claro e o mutante ITAAM 023M apresentou coloração cinza (Tabela 4) Pela sequência de cores e números (1-5) dados, azul (1) representa ausência de amilolise e amarelo (5), alta atividade enzimática.

Tabela 4. Teste do iodo na presença do amido dos mutantes de *Bacillus* sp.

<i>Bacillus</i> sp.		Dias após o inóculo			
		0	1	2	3
1	010M	1	1	2	3
2	023M	1	1	3	4

1- azul escuro; 2 - roxo azulado; 3 - roxo claro; 4 – cinza; 5 – amarelo.

5.3.5. Teste da turbidez na presença do amido

Quanto à turbidez, visualmente, obteve-se valor 3 (Tabela 5) em ambos os mutantes. Por essa metodologia e sequência numérica observada (1-4), turvo (1) representa ausência de amilolise e não turvo (4), alta atividade enzimática.

Tabela 5. Teste da turbidez na presença do amido dos mutantes de *Bacillus* sp.

<i>Bacillus</i> sp.		Dias após o inóculo			
		0	1	2	3
1	010M	1	2	2	3
2	023M	1	2	2	3

1- turvo; 2 - menos turvo; 3 - pouco turvo; 4 - não turvo

5.3.6. Atividade de enzimas amilolíticas produzidas pelos clones mutantes de *Bacillus* sp.

5.3.6.1. Ensaio enzimático a 90°C

Foram testadas pelo método de FUWA (1954) a 90°C por 10 minutos, as enzimas dos dois mutantes de *Bacillus* sp. nomeados anteriormente como 010M e 023M (Figura 9).

Os mutantes de *Bacillus* sp. 010M e 023M apresentaram atividade de 0,06 U/mL e 0,3 U/mL respectivamente durante este teste.

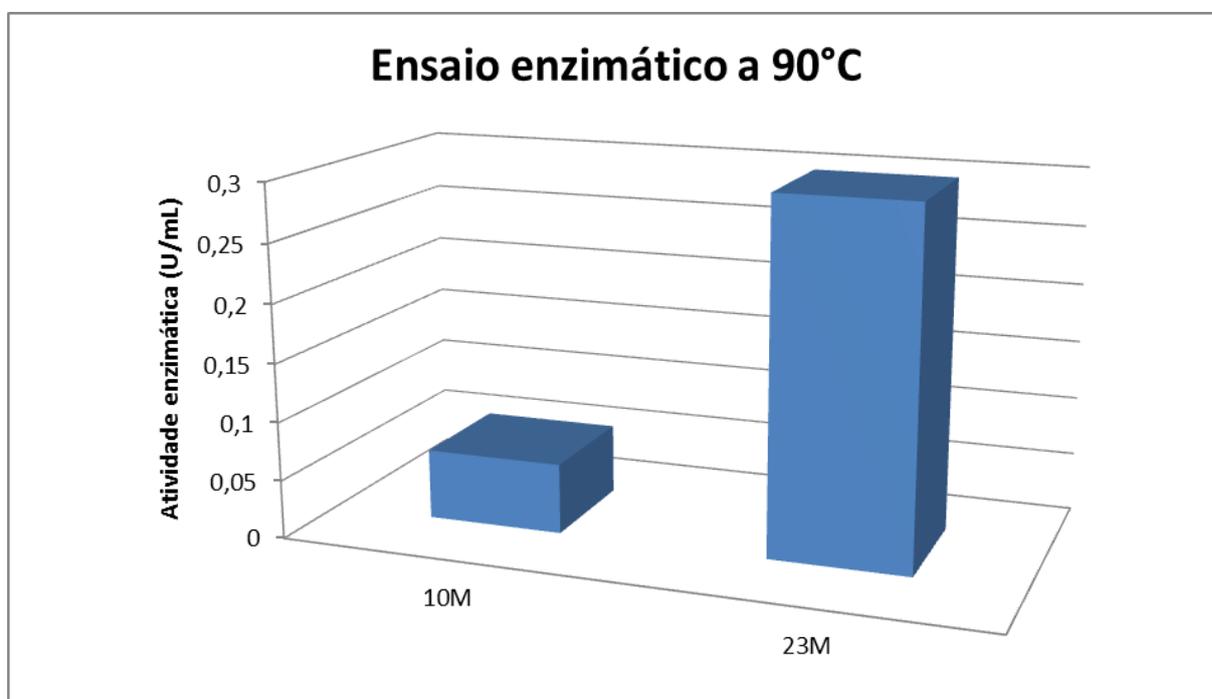


Figura 9. Atividade enzimática dos mutantes de *Bacillus* sp. na temperatura de 90°C por 10 minutos.

5.3.6.2. Determinação da temperatura ótima

As enzimas dos mutantes foram testadas nas temperaturas de 20°C, 30°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C, 80°C, 90°C e 100°C e tampão acetato de sódio com pH 6,5, para se verificar qual a temperatura ideal de reação.

No caso do mutante de *Bacillus* sp. 010M, foi observado que a temperatura em que a enzima apresentou melhor atividade enzimática foi a de 100°C, com aproximadamente 1,4 U/mL (Figura 10) seguida das temperaturas de 20°C e 30°C, com aproximadamente 1,05 U/mL, podendo-se observar que a enzima apresenta atividade termofílica.

Sua atividade apresentou uma queda contínua de 30 a 60° C, elevando gradualmente de 70 até os 100° C. É possível que seus sítios de reação com o amido fiquem bloqueados a 60°C por alguma mudança estrutural espacial da molécula, o que explicaria esse comportamento específico. No entanto, seriam necessários testes para confirmar essa suposição.

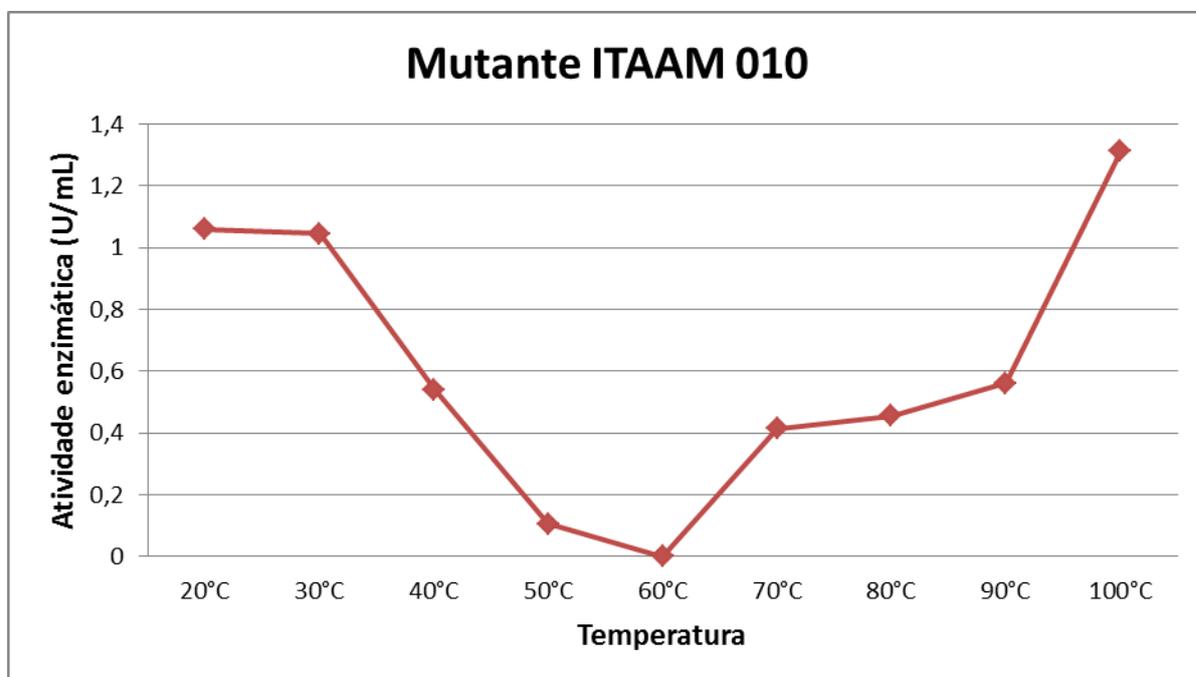


Figura 10. Atividade enzimática amilolítica do mutante de *Bacillus* sp. 010M sob diferentes temperaturas.

O mutante de *Bacillus* sp. 023M também apresentou melhor atividade na temperatura de 100°C (Figura 11), com aproximadamente 0,72 U/mL, seguida das temperaturas de 20°C, 30°C e 40°C com 0,43 U/mL. Sua atividade manteve-se constante de 20 até 40°C, declinando dos 50 até 60° C, mantendo atividade zero de 60 até 90° C, mostrando apresentar características diferentes da amilase do mutante anterior, o que faz supor uma estrutura espacial diferente.

Segundo Fujimoto *et al.* (1998), a estrutura da α -amilase de *Bacillus subtilis* (BsAMY) consiste em uma única cadeia polipeptídica com aproximadamente 26% de α -hélice, 22% de β -folha e dimensões de aproximadamente 35 Å x 40 Å x 70 Å, com três domínios, características observadas em outras α -amilases.

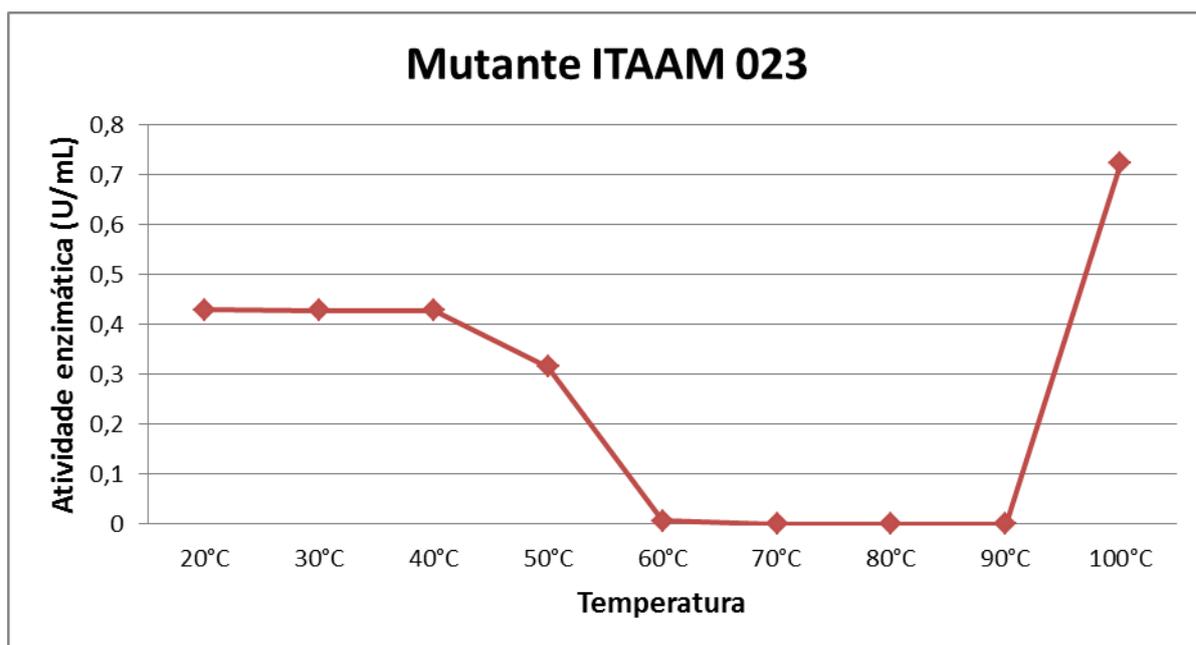


Figura 11. Atividade enzimática amilolítica do mutante de *Bacillus* sp. 023M sob diferentes temperaturas.

5.3.6.3. Determinação do pH ótimo

As enzimas sofrem os mesmos efeitos estruturais observados com as proteínas globulares pela variação de pH e de temperatura. Mudanças extremas de pH podem alterar a estrutura da enzima devido a uma repulsão de cargas (HOGGETT; KELLET, 1976).

Mudanças mais brandas de pH podem levar a uma dissociação de enzimas oligoméricas. Esse é o caso, por exemplo, das isoformas PI e PII hexocinase de levedura, que é dimérica em $\text{pH} < 7,5$ e monomérica em $\text{pH} > 8$ (HOGGETT; KELLET, 1976; WILLIAMS; JONES, 1976). Neste caso, a forma monomérica é mais ativa que a dimérica, mas há casos em que a dissociação de enzimas oligoméricas leva à sua completa inativação.

Por outro lado, as mudanças de pH que não afetam totalmente a estrutura de uma enzima podem diminuir sua atividade apenas por estar afetando resíduos do sítio catalítico (THURLKILL et al., 2006).

Após os testes com diferentes temperaturas, foram realizados testes em diferentes pH's e três temperaturas diferentes para se verificar qual o pH ideal de atividade de cada enzima.

O mutante de *Bacillus* sp. 010M apresentou melhor atividade no pH 4,5 e na temperatura de 100°C , com aproximadamente 1,53 U/mL (Figura 12), seguido do pH 3,5 e temperatura de 100°C , com aproximadamente 1,05 U/mL. Na temperatura de 80°C , a atividade enzimática amilolítica foi maior no pH 7,5 com, aproximadamente, 0,7 U/mL. Na temperatura de 90°C , a maior atividade foi, também, no pH 7,5, com 0,6 U/mL.

Ao se analisar o comportamento dessa enzima em cada temperatura, observou-se que ela pouco variou a 80°C , apresentando uma tendência de se elevar à medida que o pH aumentou, com pico no pH 7,5 e queda no pH 8,5. A 90°C houve um declínio acentuado quando o pH aumentou de 3,5 para 5,5/6,5 (quando sua atividade parou), elevando-se novamente quando os pHs aumentaram para 7,5/8,5. A 100°C , sua atividade elevou-se quando o pH aumentou de 3,5 para 4,5, apresentando em seguida, uma queda significativa da atividade entre os pHs 4,5 e 5,5; a partir daí, mostrou um declínio gradual à medida que o pH se elevou de 5,5 até 8,5.

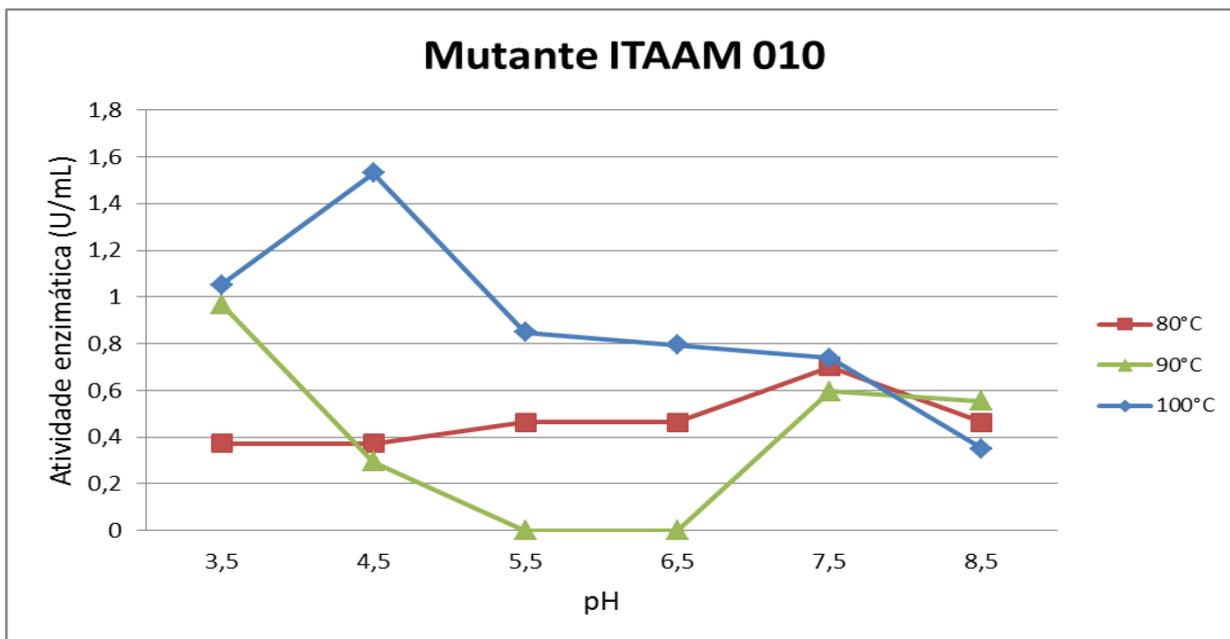


Figura 12. Atividade enzimática amilolítica do mutante de *Bacillus* sp. 010M sob diferentes pH's e temperaturas.

Na amilase do mutante de *Bacillus* sp. 023M, observou-se uma elevação contínua da atividade enzimática à medida que se elevou o pH de 3,5 até 7,5 e, uma pequena diminuição no pH 8,5 (Figura 13). Esse comportamento foi bem diferente do observado com a atividade enzimática observada no mutante anterior, indicando serem enzimas bem diferentes uma da outra.

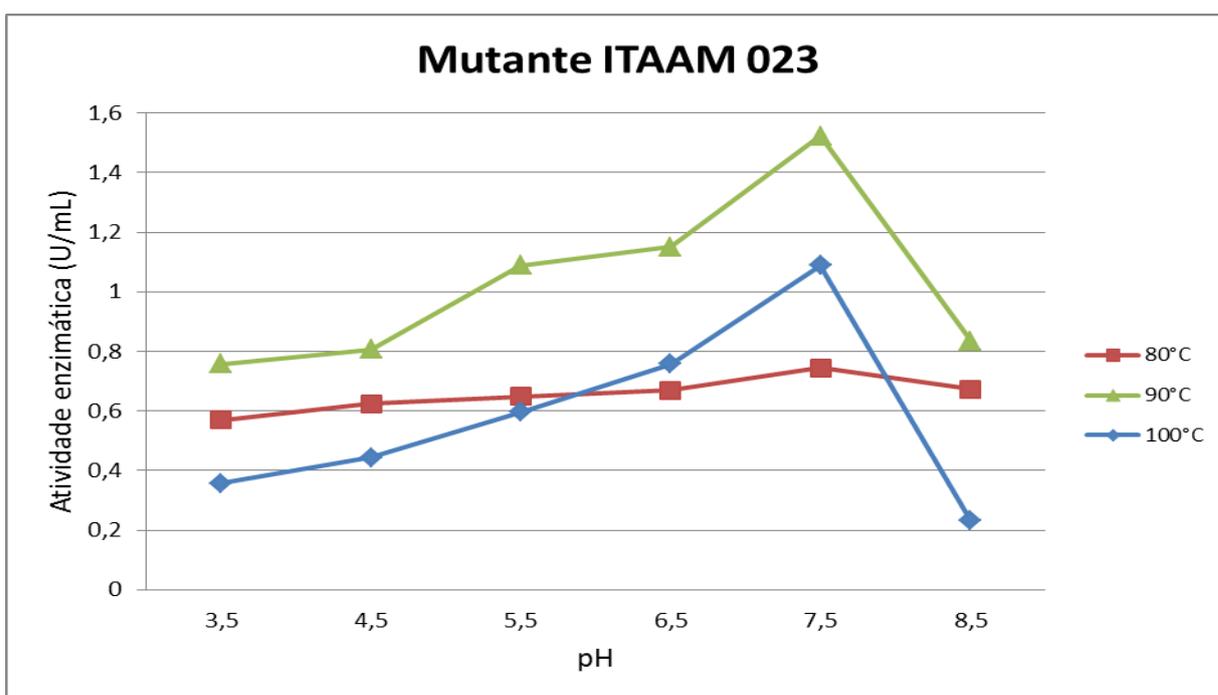


Figura 13. Atividade enzimática amilolítica do mutante de *Bacillus* sp. 023M sob diferentes pH's e temperaturas.

A enzima desse mutante apresentou melhor atividade no pH 7,5 e na temperatura de 90°C, com aproximadamente 1,52 U/mL, seguido do pH 6,5 também na temperatura de 90°C, com aproximadamente 1,15 U/mL.

Na temperatura de 80°C, a melhor atividade enzimática foi no pH 7,5 com atividade de 0,8 U/mL. Na temperatura de 100°C a melhor atividade também foi no pH 7,5 com 1,1 U/mL.

Pôde-se observar que em todas as temperaturas o pH em que a enzima apresentou melhor atividade amilolítica foi o de 7,5 (Figura 13).

5.3.6.4. Tempo ótimo de incubação das enzimas dos mutantes

As enzimas foram testadas quanto ao tempo ideal de incubação durante a reação enzimática nos tempos de 5, 10, 15, 20, 30 e 45 minutos em três temperaturas diferentes nos pH's considerados ideais obtidos nos testes anteriores.

A enzima produzida pelo mutante de *Bacillus* sp. 010M apresentou, de um modo geral, reduções significativas em suas atividades à medida que se aumentou os tempos de exposição às altas temperaturas. As maiores reduções ocorreram a 100°C (dos 10 aos 20 minutos) e 90°C (dos 20 aos 30 minutos), mas suas atividades nessas temperaturas foram bem superiores às observadas a 80°C até os 18 e 30 minutos respectivamente. A melhor atividade ocorreu aos 5 minutos de reação enzimática na temperatura de 90°C, com aproximadamente 1,28 U/mL (Figura 14), seguida do tempo de 10 minutos também na temperatura de 90°C, com aproximadamente 1,14 U/mL.

Na temperatura de 80°C, a melhor atividade enzimática amilolítica foi no tempo de 5 minutos com 0,6 U/mL, seguido do tempo de 10 minutos com cerca de 0,4 U/mL, observando-se queda contínua com o passar do tempo se estabilizando aos 45 minutos a 0,2 U/mL.

Na temperatura de 100°C, a melhor atividade foi aos 10 minutos com 1,1 U/mL, seguido do tempo de 15 minutos, com 0,9 U/mL.

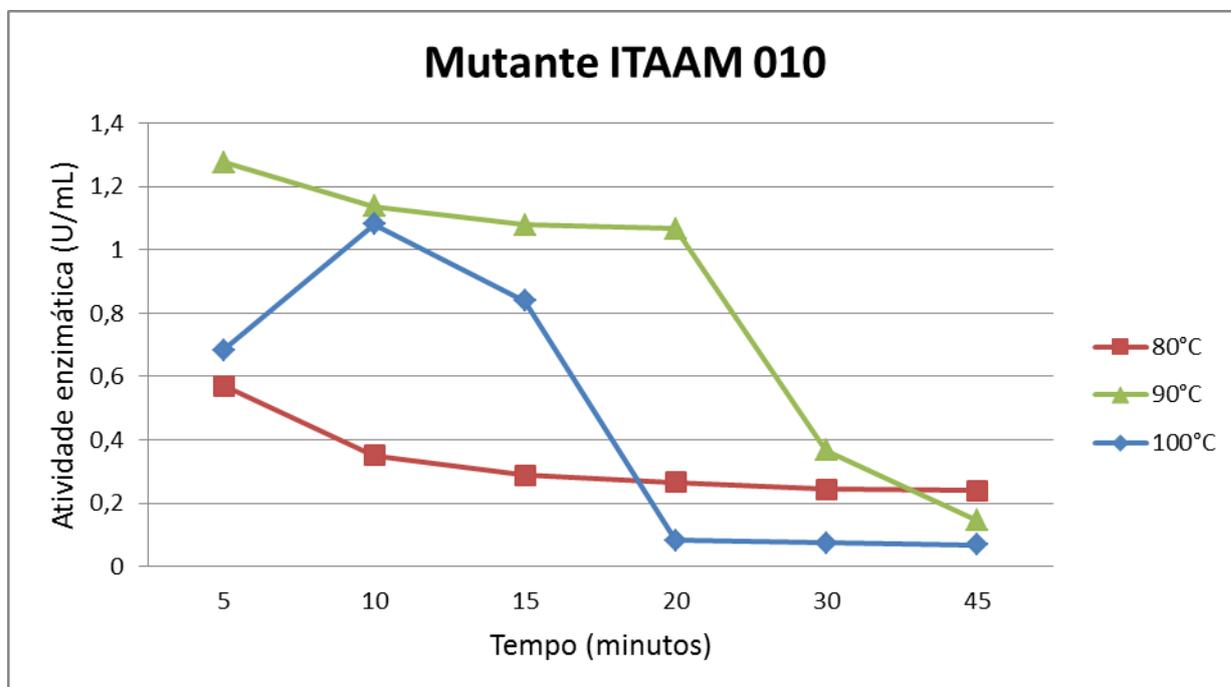


Figura 14. Atividade enzimática amilolítica do mutante de *Bacillus* sp. 010M em diferentes tempos de reação e temperaturas.

Ao se analisar o comportamento enzimático da amilase do mutante 023M (Figura 15), observou-se também, uma redução da atividade, mas essa redução foi gradual em relação ao tempo, não havendo diferenças entre as temperaturas de incubação de 90 e 100°C, com essa atividade sendo um pouco maior a 80°C até o tempo de 15 minutos.

A enzima do mutante de *Bacillus* sp. 023M apresentou melhor atividade no tempo de 5 minutos na temperatura de 80°C, com aproximadamente 1,48 U/mL (Figura 15), seguido do tempo de 10 minutos também na temperatura de 80°C, com aproximadamente 0,94 U/mL.

Na temperatura de 90°C, a melhor atividade enzimática amilolítica foi no tempo de 5 minutos com atividade de 0,8 U/mL, seguido do tempo de 10 minutos com 0,6 U/mL, diminuindo gradativamente até 0,3 U/mL nos 45 minutos finais de reação.

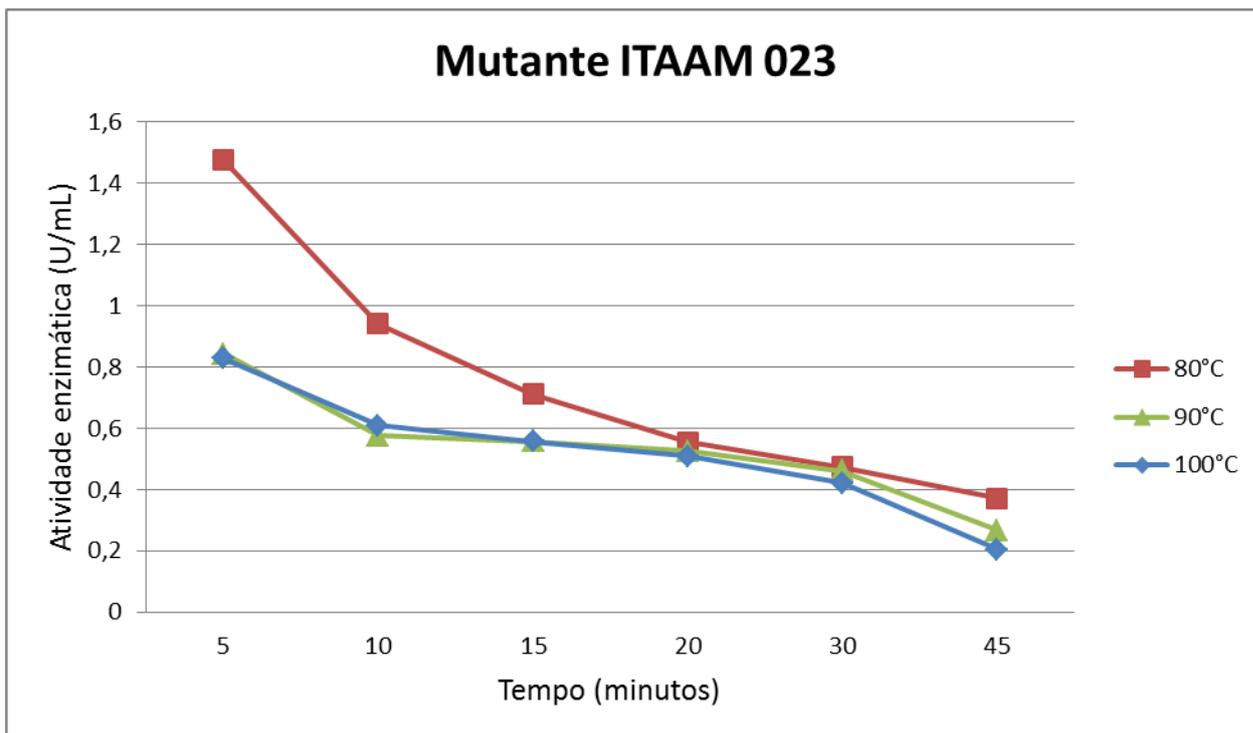


Figura 15. Atividade enzimática amilolítica do mutante de *Bacillus* sp. 023M em diferentes tempos de reação e temperaturas.

Na temperatura de 100°C foram observados resultados muito parecidos com os da temperatura de 90°C, sendo a melhor atividade no tempo de 5 minutos com 0,8 U/mL, seguido do tempo de 10 minutos com 0,6 U/mL, diminuindo até 0,2 U/mL nos últimos 45 minutos de reação.

5.3.6.5. Choque térmico

As enzimas dos microrganismos foram testadas quanto à atividade enzimática nas temperaturas de 70°C, 80°C e 90°C e nos tempos de 5, 10, 15, 20, 30 e 45 minutos (chamado de choque térmico) e colocadas no gelo para, posteriormente serem feitas as reações enzimáticas nas temperaturas e tempos considerados ideais nos testes anteriores.

A enzima amilolítica do mutante ITAAM 010M perdeu sua atividade 10 minutos depois de exposta às temperaturas de 70°C, 80°C e 90°C (Figura 16). Nessas temperaturas, observou-se atividade apenas com 5 minutos de exposição, sendo de 1,64 U/mL a 70°C, caindo para 0,35 U/mL a 80°C, mas sem atividade detectável nesse tempo a 90°C.

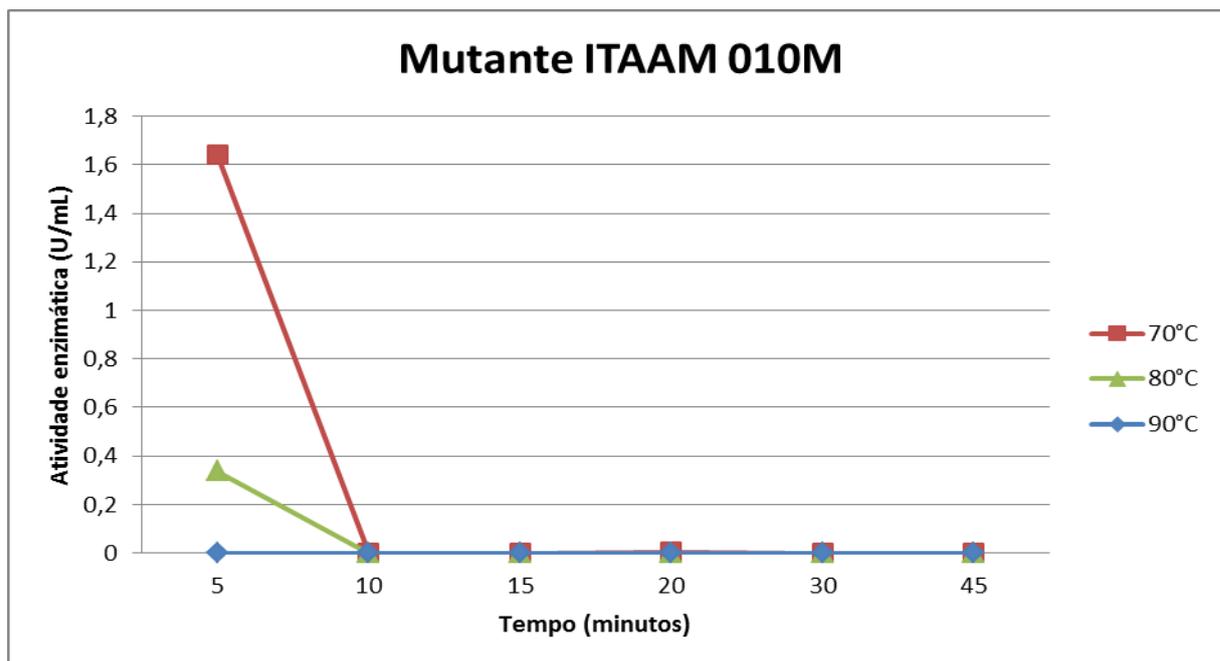


Figura 16. Atividade enzimática amilolítica do mutante de *Bacillus* sp. 010M após choque térmico.

A atividade amilolítica do mutante de *Bacillus* sp. ITAAM 023M (Figura 17) apresentou variação de comportamento em resposta às temperaturas de 70, 80 e 90°C, apenas até 15 minutos após o choque térmico. Após esse tempo, a atividade não se diferenciou mais entre as temperaturas, com sua atividade caindo drasticamente e se estabilizando em aproximadamente 0,2 U/mL aos 45 minutos após o choque térmico.

Na temperatura de 70°C, a atividade enzimática do mutante de *Bacillus* sp. ITAAM 023M (Figura 17) aumentou gradativamente de 5 até 15 minutos, mantendo-se estável até os 45 minutos com os valores se elevando de 0,15 U/mL até 0,2 U/mL aos 15 minutos.

Na temperatura de 80°C, a atividade enzimática do mutante ITAAM 023M aumentou consideravelmente dos 5 aos 10 minutos, passando de 0,40 U/mL para 1,10 U/mL. Após esse tempo, a atividade diminuiu drasticamente aos 15 minutos para 0,5 U/mL, até chegar a 0,2 U/mL aos 45 minutos.

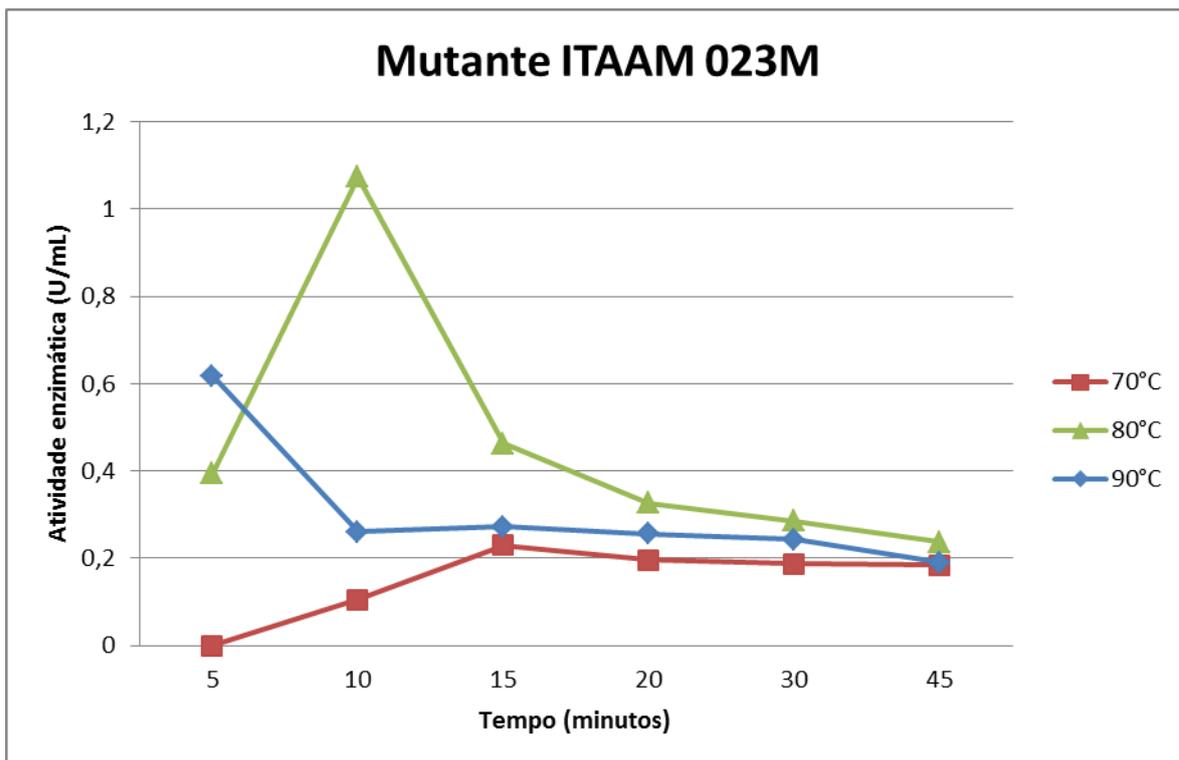


Figura 17. Atividade enzimática amilolítica do mutante de *Bacillus* sp. 023M após choque térmico.

Na temperatura de 90°C, a atividade desta enzima chegou a 0,7 U/mL nos primeiros 5 minutos, porém, ao chegar nos 10 minutos, a atividade enzimática diminuiu para 0,3 U/mL, mantendo-se estável até chegar aos 45 minutos.

5.3.6.6. Termoestabilidade

A enzima produzida pelo mutante de *Bacillus* sp. 010M apresentou mais termostabilidade na temperatura de 90°C em que durante os 90 minutos ela variou de 0,09 a 1,16 U/mL (figura 18). No entanto, a maior atividade foi apresentada no tempo de 80 minutos de reação.

Pôde-se observar, também, que na temperatura de 70°C o mutante de *Bacillus* sp. 010M apresentou a maior atividade (0,25 U/mL) nos primeiros 40 minutos (Figura 18), porém houve uma queda brusca de atividade com 50 minutos de reação para cerca de 0,15 U/mL, tornando-se nula com 80 minutos.

Na temperatura de 80°C, foi observado que no tempo de 50 minutos a enzima apresentou atividade de, aproximadamente, 0,24 U/mL, tendo queda significativa nos 70 minutos para 0,07 U/mL.

Na temperatura de 100°C a enzima apresentou maior atividade nos 50 minutos de reação, com cerca de 0,2 U/mL, caindo consideravelmente nos 60 minutos em diante até se aproximar de zero.

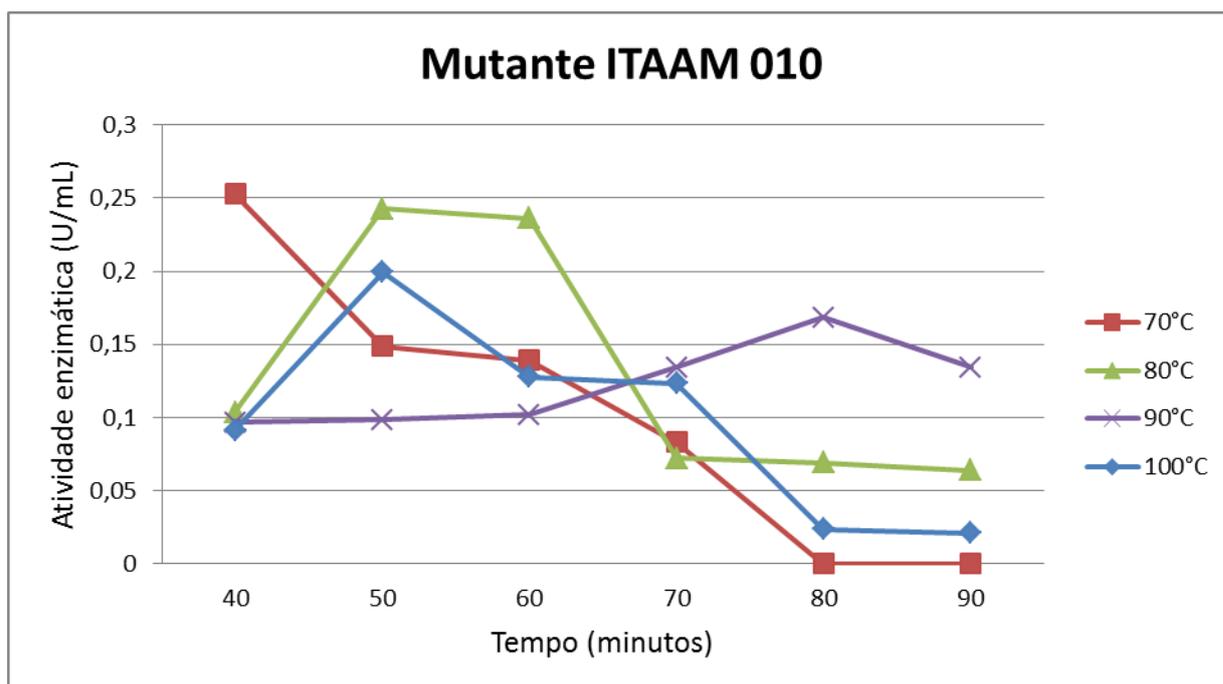


Figura 18. Termostabilidade da atividade enzimática amilolítica do mutante de *Bacillus* sp. 010M em tempos e temperaturas diferentes.

A enzima produzida pelo mutante de *Bacillus* sp. 023M apresentou atividade enzimática amilolítica semelhante nas temperaturas de 70°C, 80°C, 90°C e 100°C durante os tempos de 40 a 50 minutos (figura 19). A partir deste ponto, as atividades nas temperaturas de 70°C, 80°C e 90°C se mantêm parecidas até o tempo de 70 minutos, sendo que nas temperaturas de 70°C e 80°C elas se mantem semelhantes e na temperatura de 90°C a atividade diminui.

Na temperatura de 100°C, a partir de 50 minutos de reação, a atividade diminui até 70 minutos, onde se mantém até chegar aos 90 minutos.

A máxima atividade da enzima do mutante de *Bacillus* sp. 023M foi na temperatura de 90°C no tempo de 40 minutos, com quase 0,35 U/mL, e menor atividade na temperatura de 100°C com menos de 0,15 U/mL.

Pôde-se observar, neste teste, que a enzima do mutante de *Bacillus* sp. apresentou uma maior termoestabilidade na temperatura de 80°C no tempo de 50 a 80 minutos.

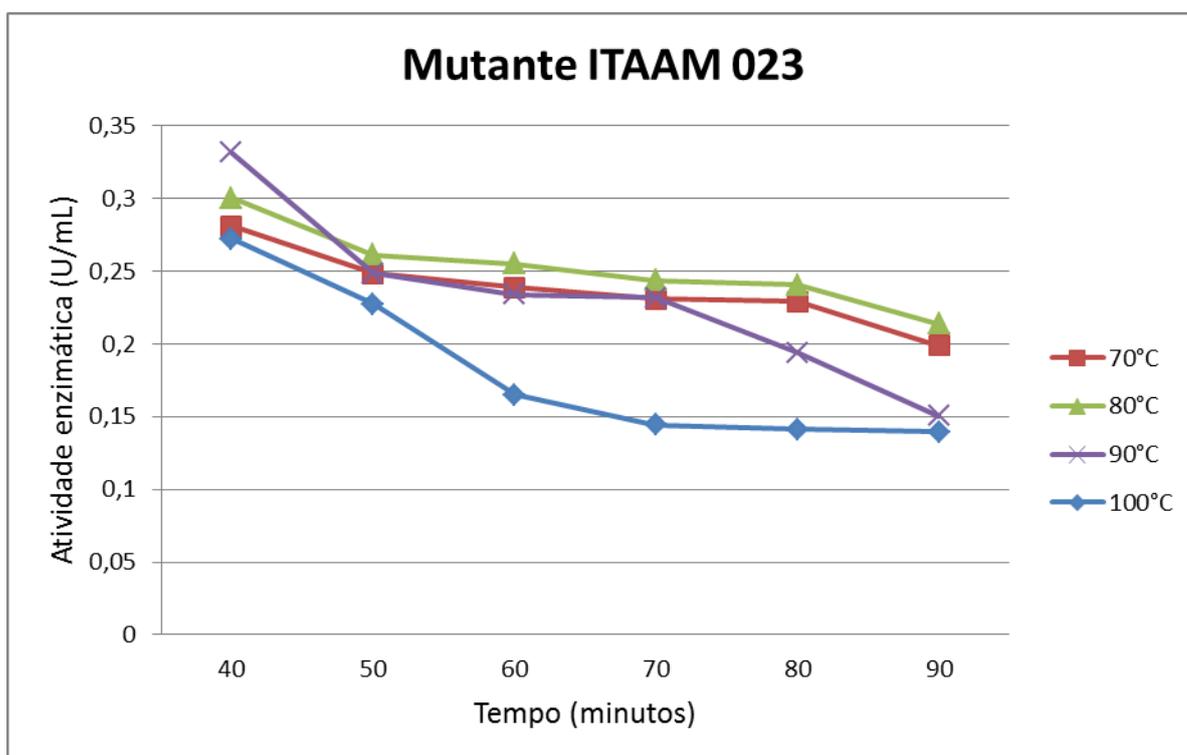


Figura 19. Termostabilidade da atividade enzimática amilolítica do mutante de *Bacillus* sp. 023M em tempos e temperaturas diferentes.

5.4. CONCLUSÕES

O tempo de exposição à luz ultravioleta em que se obteve sobrevivência de 5% dos mutantes de *Bacillus* sp. foi de 28 minutos em ambos os *Bacillus* sp. testados.

O mutante de *Bacillus* sp. ITAAM 023M mostrou maior índice de amilólise do que o ITAAM 010M.

As amilases dos dois mutantes de *Bacillus* sp mostraram-se bem diversificadas quanto às suas características, indicando serem diferentes umas das outras.

A temperatura com maior atividade das amilases dos mutantes de *Bacillus* sp. ITAAM 010M e ITAAM 023M foi 100°C.

A amilase do mutante de *Bacillus* sp. ITAAM 010M mostrou maior atividade em 4,5, enquanto que a do mutante de *Bacillus* sp. ITAAM 023M foi em pH 7,5.

As amilases testadas mostraram alta sensibilidade ao choque térmico, pois foram afetadas com tempos de 10 a 15 minutos.

A amilase do mutante de *Bacillus* sp. ITAAM 010M mostrou maior termoestabilidade na temperatura de 90°C.

A amilase do mutante de *Bacillus* sp. ITAAM 023M mostrou maior termoestabilidade na temperatura de 80°C.

A maior atividade amilolítica mostrada pelas amilases dos isolados foi de 1,6 U/mL, do mutante de *Bacillus* sp. ITAAM 010M e 1,5 U/mL do mutante de *Bacillus* sp. ITAAM 023M.

6. CAPÍTULO 2: Experimentos com Rizóbios

6.1. INTRODUÇÃO

As enzimas são proteínas vitais que catalisam reações químicas com grande especificidade e taxas de aumento. Além de formarem a base do sistema metabólico de todos os microrganismos vivos, essas proteínas proporcionam enormes oportunidades às indústrias por efetuarem conversões biocatalíticas finas, eficientes e mais econômicas (HANKIN; ANAGNOSTAKIS, 1975).

Programas para selecionar novas fontes microbianas para a produção de enzimas estão crescendo em todas as partes do planeta. As nitrogenase e hidrogenase presentes nas bactérias comumente referidas como rizobia, são enzimas chaves na fixação biológica do nitrogênio atmosférico pelas plantas leguminosas e, portanto, as de maior interesse biotecnológico na área agrônômica. Porém, não se pode negligenciar as potencialidades de uso dessas bactérias como fontes de outras enzimas de reconhecido valor industrial, caso das amilases, lipases, pectinases e proteases (VAN BEILEN, 2002).

A utilização de simbiose leguminosa-rizóbio é uma das alternativas mais promissoras para a agricultura de baixos insumos nas regiões tropicais e subtropicais. Além da capacidade de fixar nitrogênio, contribuindo para o balanço desse nutriente nos ecossistemas, alguns isolados de rizóbio são capazes de solubilizar fosfatos pouco solúveis, disponibilizando o fósforo para as plantas e para si mesmos (CHABOT et al, 1998; CHAGAS JR et al., 2010). Os rizóbios estão entre os microrganismos mais eficientes em solubilizar fosfatos inorgânicos pouco solúveis, presentes no solo (RODRIGUES; FRAGA, 1999). Além disso, eles podem produzir amilase (OLIVEIRA et tal., 2007) e, por não serem patogênicos às plantas e animais, são uma fonte segura dessa enzima para a bioindústria.

Em vista disso, foi realizado o presente estudo para avaliar a presença e caracterizar as amilases produzidas por isolados de rizóbia, principalmente quanto à sua estabilidade a altas temperaturas.

5.2. MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1. Seleção de Rizóbios produtores de amilase

Foram testados 40 isolados obtidos da Coleção de Rizóbios do Laboratório de Ecologia e Biotecnologia de Microrganismos do Solo do INPA, quanto ao crescimento em amido, conforme metodologia de Oliveira e Magalhães (1999), (Figura 20).

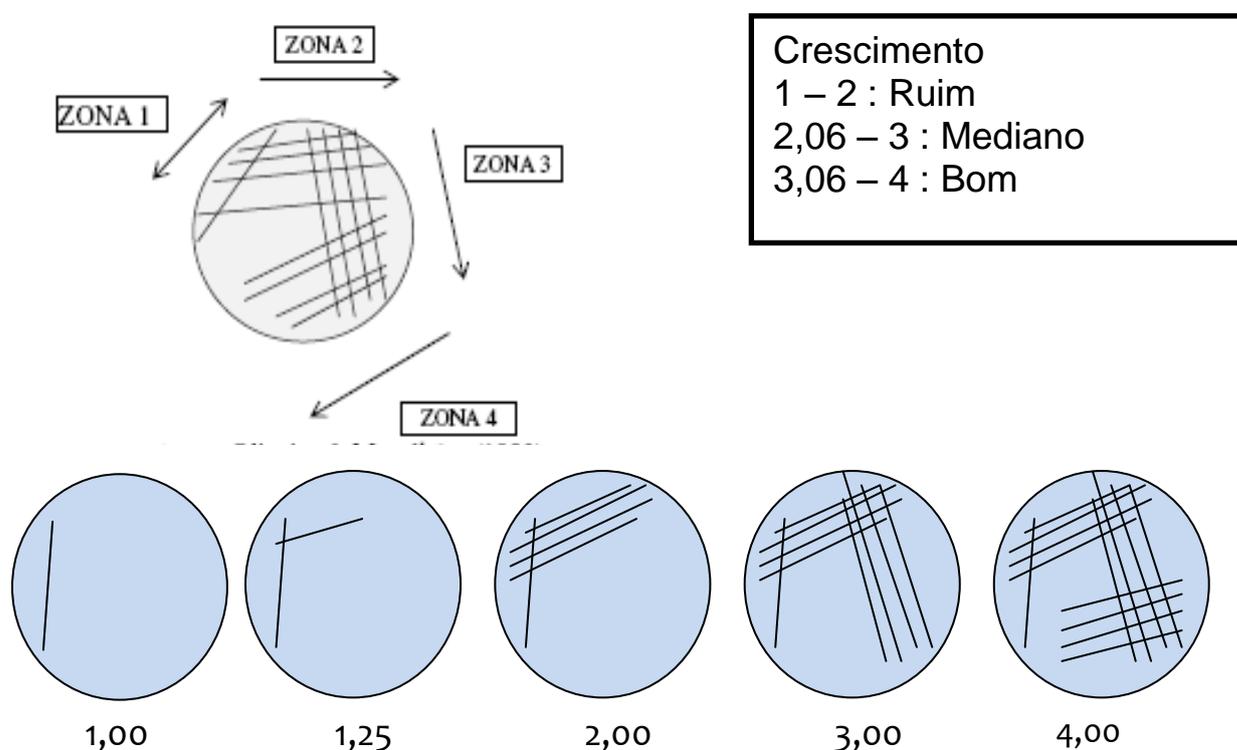


Figura 20. Ilustração do método de riscagem de Oliveira e Magalhães (1999).

Além disso, foi verificada a presença de amilase utilizando vapor de iodo como indicador da presença de amido (Figura 21). Uma zona amarela suave ao redor da colônia em contraste com o meio azul indicou resultado positivo para a atividade amilolítica (BUZZINI; MARTINI, 2002).

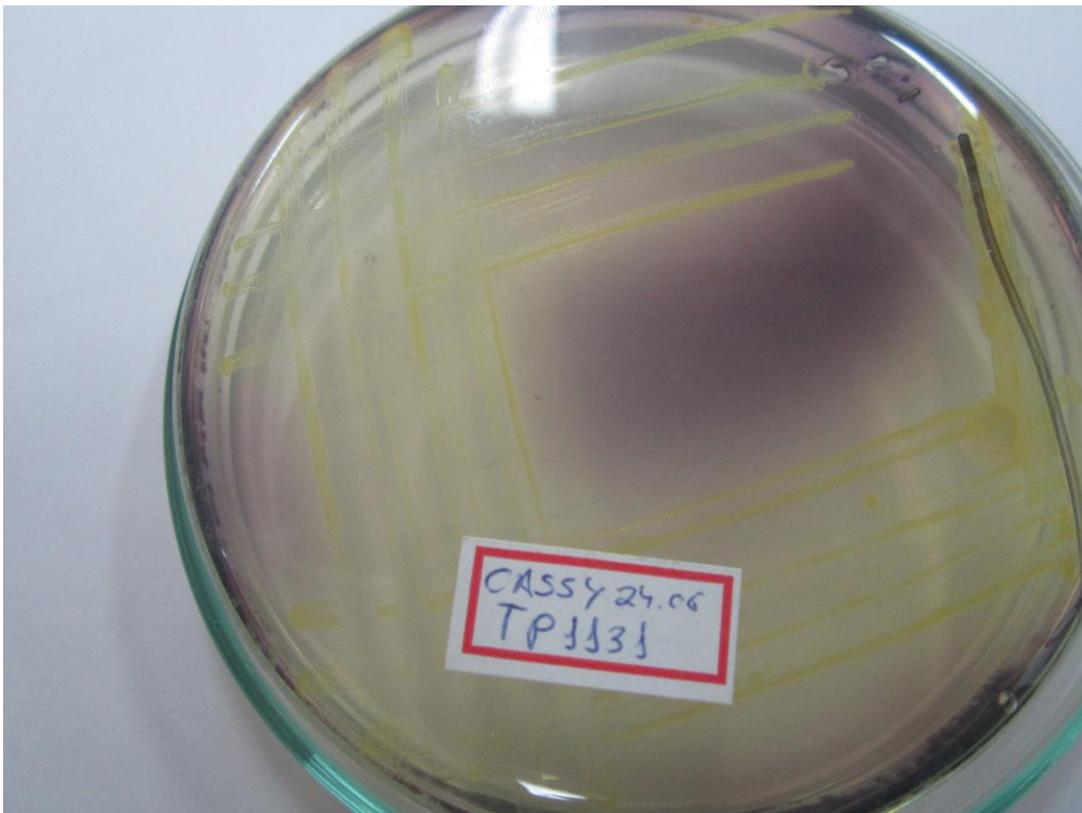


Figura 21. Atividade amilolítica positiva (cor amarela) usando vapor de iodo.

5.2.2. Teste termofílico dos Rizóbios

Os Rizóbios que cresceram em meio contendo amido e que apresentaram atividade amilolítica foram testados em temperatura de 55°C por 48 horas. Os que mostraram bom crescimento nesta temperatura foram selecionados para os testes posteriores.

5.2.3. Índice de Amilolise dos Rizóbios

As estirpes de rizóbios foram testadas quanto à formação de halo no meio de cultivo usando-se a coloração de vapor de iodo para determinação do índice de amilolise (IA), que foi definido como a razão entre o diâmetro da colônia e o diâmetro do halo. As colônias que apresentaram maiores índices foram selecionadas para os estudos subsequentes das enzimas secretadas pelos mutantes (HANKIN e ANAGNOSTAKIS, 1975).

5.2.4. Teste de iodo e turbidez em função do amido

Os rizóbios amilolíticos foram testados quanto à turbidez e iodo em meio líquido contendo amido, sendo avaliados no dia do inóculo, com 1, 2 e 3 dias de incubação.

5.2.5. Atividade de enzimas amilolíticas produzidas pelos rizóbios selecionados

Ensaio para alpha-amilase, Método Dextrinizante – FUWA (1954) citado no item 4.3.6.

5.2.5.1. Ensaio enzimático a 90°C

Foram feitos ensaios enzimáticos com as enzimas dos rizóbios selecionados anteriormente para testar quais possuem maior atividade enzimática a 90°C por 10 minutos.

5.2.5.2. Determinação da temperatura ótima

Foram testadas as temperaturas de 20°C, 30°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C, 80°C, 90°C e 100°C por um tempo de 5 minutos, para definir quais as temperaturas ótimas de atividade das enzimas dos rizóbios selecionados.

5.2.5.3. Determinação do pH ótimo

Foram realizados ensaios com os tampões Acetato de Sódio nos pH's 3,5, 4,5, 5,5, 6,5, 7,5 e 8,5 para testar quais os pH's ótimos de atividade enzimática das enzimas dos microrganismos nas temperaturas que mostraram melhores resultados no teste anterior.

5.2.5.4. Tempo ótimo de incubação das enzimas dos isolados.

A enzima do microrganismo INPA R001 foi testada a 80°C, 90°C e 100°C, enquanto que a enzima do microrganismo INPA R020 foi testada nas temperaturas de 50°C, 60°C e 70°C, que foram as temperaturas em que apresentou melhores atividades. Todos os testes foram realizados nos tempos de 5, 10, 15, 20, 30 e 45 minutos para verificar o tempo ideal de reação do ensaio enzimático.

5.2.5.5. Choque térmico

As enzimas dos microrganismos foram testadas a 70°C, 80°C e 90°C pelos tempos de 5, 10, 15, 20, 30 e 45 minutos E após esse tempo, foram colocadas em gelo para resfriamento e depois submetidas ao ensaio dextrinizante (FUWA, 1954) nos melhores tempos e temperaturas já estipulados nos testes anteriores.

5.2.5.6. Termoestabilidade

Os microrganismos selecionados foram testados quanto à termoestabilidade nas temperaturas 70°C, 80°C, 90°C e 100°C, nos tempos de 40, 50, 60, 70, 80 e 90 minutos.

5.2.6. Atividade de todos os rizóbios utilizados desde o início deste trabalho

Foram feitos ensaios enzimáticos a 90°C por 10 minutos das enzimas de todos os rizóbios testados no começo do experimento para confirmação de presença ou ausência de amilase.

A concentração de células de todos os microrganismos para a obtenção dos sobrenadantes enzimáticos foi padronizada para 10^6 UFC/mL.

5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1. Seleção de rizóbios que apresentaram bom crescimento em meio de cultura contendo amido

Dos 40 Rizóbios testados em meio LB contendo amido como fonte de carbono, 17 apresentaram valores de crescimento acima de 3,06. Um dos isolados apresentou valor entre 2,06 e 3,0, sendo considerado mediano e 22 isolados, valores abaixo de 2,0, representando, respectivamente, 42,50%, 2,50% e 55,00% (Tabela 6).

Tabela 6. Crescimento, produção de amilase e sensibilidade termofílica dos Rizóbios em meio com amido até 12 dias.

	Rizóbio	Dias*				Amilase	Termofílico
		3	6	9	12	**	***
1	INPA R156	3,13	3,38	3,56	3,69	2	1
2	INPA R028	3,19	3,25	3,25	3,25	2	2
3	INPA R012	2,63	2,88	2,88	2,88	2	2
4	INPA R034	3,56	3,56	3,56	3,56	2	2
5	INPA R007	3,44	3,44	3,75	3,75	2	2
6	INPA R020	3,69	3,75	3,75	3,75	2	2
7	INPA R054	4,00	4,00	4,00	4,00	2	1
8	INPA R015	3,50	3,75	3,75	3,75	2	2
9	INPA R001	2,67	3,50	3,58	3,92	2	2
10	INPA R026	4,00	4,00	4,00	4,00	2	2
11	INPA R046	4,00	4,00	4,00	4,00	2	2
12	INPA R152	4,00	4,00	4,00	4,00	2	1
13	INPA R572	1,43	1,50	1,56	1,56	2	1
14	INPA R214	4,00	4,00	4,00	4,00	2	1
15	INPA R017	4,00	4,00	4,00	4,00	2	1
16	INPA R554	1,00	1,00	1,00	1,00	1	1
17	INPA R159	1,00	1,19	1,31	1,31	1	1
18	INPA R552	1,00	1,00	1,00	1,00	1	1

19	INPA R582	1,25	1,38	1,38	1,38	1	1
20	INPA R584	1,00	1,25	1,25	1,25	1	1
21	INPA R579	1,25	1,38	1,38	1,38	1	1
22	INPA R600	4,00	4,00	4,00	4,00	2	2
23	INPA R014	4,00	4,00	4,00	4,00	2	2
24	INPA R603	1,13	1,25	1,25	1,25	1	1
25	INPA R606	1,00	1,00	1,00	1,00	1	1
26	INPA R583	1,13	1,25	1,25	1,25	1	1
27	INPA R580	1,13	1,44	1,44	1,44	1	1
28	INPA R602	1,00	1,13	1,13	1,13	1	1
29	INPA R560	1,13	1,31	1,31	1,31	1	1
30	INPA R172	4,00	4,00	4,00	4,00	2	1
31	INPA R569	1,00	1,13	1,13	1,13	1	1
32	INPA R595	1,00	1,25	1,25	1,25	1	1
33	INPA R553	1,00	1,00	1,00	1,00	1	1
34	INPA R584	1,13	1,31	1,31	1,31	1	1
35	INPA R549	1,00	1,31	1,31	1,31	1	1
36	INPA R598	1,00	1,13	1,13	1,13	1	1
37	INPA R562	1,25	1,50	1,50	1,50	1	1
38	INPA R583	1,06	1,38	1,38	1,38	1	1
39	INPA R589	1,00	1,00	1,00	1,00	1	1
40	INPA R035	4,00	4,00	4,00	4,00	2	1

*Notas segundo Oliveira e Magalhães (1999). ** 1- Sem produção de halo 2- com produção de halo. *** 1 – não cresceu; 2 – cresceu

Dentre os melhores estão: INPA R054, INPA R026, INPA R046, INPA R152, INPA R214, INPA R017, INPA R600, INPA R014, INPA R172 e INPA R035, que apresentaram valor 4,0 logo no terceiro dia de crescimento. Segundo Oliveira e Magalhães (1999), microrganismos que apresentam valores elevados já aos três dias de crescimento são os que estão mais bem adaptados às condições do meio, indicando, no presente caso, que esses isolados estão usando o amido com mais eficiência para os seus crescimentos.

Já os Rizóbios INPA R156, INPA R028, INPA R034, INPA R007, INPA R020, INPA R015 e INPA R001 mostraram valores entre 3,06 a 3,9, até 12 dias de observação, o que também os evidencia como de ótimo crescimento, usando o amido para seus desenvolvimentos.

O Rizóbio INPA R012 apresentou crescimento considerado mediano, com nota 2,88, adquirida no sexto dia de observação. O restante dos isolados apresentou valores abaixo de 2,0, o que os torna de crescimento ruim em meio contendo amido como fonte de carbono.

Oliveira et al. (2007) também encontraram atividade amilolítica em rizóbios isolados de solos da Amazônia, mostrando assim, o potencial que essas bactérias apresentam como supridores dessa enzima de interesse biotecnológico. Por não serem patogênicos a plantas e animais, podem ser uma fonte segura para a obtenção de amilases para o uso nas bioindústrias.

5.3.2. Produção de amilase aparente

Os rizóbios foram testados quanto à produção de amilase verificando-se formação de Halo no meio de cultura utilizando vapor de iodo. Dentre eles, 47,50% aproximadamente, apresentaram halo de degradação de amido (Tabela 6).

Observa-se pela tabela 3, que todos os rizóbios amilases negativos apresentaram pouco ou nenhum crescimento no meio, uma vez que os valores de crescimento atingiram valores no máximo de 1,44, confirmando que suas deficiências em usarem o amido como fonte de carbono dificultou seus crescimentos nesse meio de cultura.

5.3.3. Teste Termofílico dos rizóbios

Segundo Palma-Fernandez e Gomes (2002), as enzimas termoestáveis, de maneira geral, apresentam vantagens para a aplicação na indústria, visto que

processos biotecnológicos conduzidos em elevadas temperaturas têm o risco de contaminação por microrganismos mesófilos, que são a maioria em um ambiente industrial, significativamente reduzido. Por isso o interesse em testar o crescimento dos microrganismos em temperaturas elevadas.

Para interesse na produção de etanol, o ideal é que a bactéria cresça a altas temperaturas para produzir enzimas termofílicas e termoestáveis (ARIKAN, 2008). Por isso, os rizóbios foram colocados em placas de Petri para crescerem a uma temperatura de 55°C.

Os resultados mostram que, aproximadamente 27,50% das bactérias testadas cresceram em alta temperatura, sendo consideradas termofílicas (Tabela 8). Estes isolados considerados termofílicos foram utilizados para a realização de mais testes, enquanto que o restante ficou guardado na coleção para utilizações posteriores.

Considerando os valores de crescimento no meio e tolerância às altas temperaturas, pode-se inferir que os rizóbios mais promissores como supridores de amilase são: INPA R028, INPA R012, INPA R034, INPA R007, INPA R020, INPA R015, INPA R001, INPA R026, INPA R046, INPA R600 e INPA R014.

5.3.4. Índice de amilolise

A verificação da atividade enzimática visual dos rizóbios considerados termofílicos e dos mutantes selecionados foi determinada pelo índice de amilolise, determinado por meio da relação entre o diâmetro do halo e o diâmetro da colônia (HANKIN; ANAGNOSTAKIS, 1975).

Neste teste foi verificado que o rizóbio INPA R001 mostrou o maior valor, com índice de 2,8, seguido dos Rizóbios INPA R020 com 2,4, INPA R007 e INPA R026 ambos com 1,6 e INPA R015, INPA R600, ambos com 1,5 (Tabela 7).

Tabela 7. Índice de amilólise dos rizóbios estudados.

	Bactérias	Diâmetro		IA (dh/dc)
		Halo (dh)	Colônia (dc)	
		----- cm -----		
1	INPA R028	1,3	1,0	1,3
2	INPA R001	1,4	0,5	2,8
3	INPA R012	1,0	0,7	1,4
4	INPA R034	0,8	0,6	1,3
5	INPA R007	0,8	0,5	1,6
6	INPA R020	1,2	0,5	2,4
7	INPA R015	0,9	0,6	1,5
8	INPA R026	0,8	0,5	1,6
9	INPA R046	1,0	0,8	1,2
10	INPA R600	1,5	1,0	1,5
11	INPA R014	1,1	0,8	1,4

Comparando este experimento com o realizado por Oliveira et al. (2007), que utilizaram como base experimental, LEALEM e GASHE (1994), onde a razão entre o diâmetro do halo de hidrólise e o diâmetro da colônia (expresso como índice enzimático – IE) $\geq 2,0$ indica boa produção de enzimas extracelulares, pôde-se verificar que os rizóbios testados apresentaram resultados parecidos e que os isolados INPA R001 e INPA R020 apresentaram valores maiores que 2,0, evidenciando atividades enzimáticas elevadas. A habilidade de rizóbios em degradar amido tem sido discutida em alguns trabalhos. Estudos como os de BERTHELOT e DELMOTTE (1999), SINGH e SINGH (1985) e VAN SPRONSEN et al. (1994) sugerem uma possível participação de algumas glicosidases, como as amilases, no estabelecimento intracelular da simbiose leguminosa versus rizóbia.

5.3.5. Teste do iodo na presença do amido dos rizóbios

Verificou-se que nenhum microrganismo teve atividade amilolítica que resultou no aparecimento da cor amarela durante o experimento. Porém, com três dias de

observação, cinco isolados apresentaram coloração cinza e seis a coloração roxo claro, o que sinaliza uma elevada atividade das enzimas destes (Tabela 8).

Pela sequência de cores e números (1-5) dados, azul (1) representa ausência de amilólise e amarelo (5), alta atividade enzimática.

Tabela 8. Teste do iodo na presença do amido.

	Bactérias	Dias após o inóculo			
		0	1	2	3
	Rizóbio				
1	INPA R028	1	1	1	4
2	INPA R001	1	1	3	4
3	INPA R012	1	1	2	3
4	INPA R034	1	1	3	3
5	INPA R007	1	1	2	3
6	INPA R020	1	1	2	4
7	INPA R015	1	1	3	4
8	INPA R026	1	1	2	3
9	INPA R046	1	1	3	3
10	INPA R600	1	1	3	4
11	INPA R014	1	1	3	3

2- azul escuro; 2 - roxo azulado; 3 - roxo claro; 4 – cinza; 5 – amarelo.

5.3.6. Teste da turbidez na presença do amido dos rizóbios

Quanto à turbidez, visualmente, obteve-se valor máximo de atividade com três dias de observação com três isolados (INPA R028, INPA R001, INPA R020), sendo os outros oito, nota de valor 3 (Tabela 9).

Por essa metodologia e sequência numérica observada (1-4), turvo (1) representa ausência de amilólise e não turvo (4), alta atividade enzimática.

Tabela 9. Teste da turbidez na presença do amido.

Rizóbios		Dias após o inóculo			
		0	1	2	3
1	INPA R028	1	1	2	4
2	INPA R001	1	1	3	4
3	INPA R012	1	1	3	3
4	INPA R034	1	1	2	3
5	INPA R007	1	2	3	3
6	INPA R020	1	1	3	4
7	INPA R015	1	1	2	3
8	INPA R026	1	1	2	3
9	INPA R046	1	1	2	3
10	INPA R600	1	2	3	3
11	INPA R014	1	1	3	3

1- turvo; 2 - menos turvo; 3 - pouco turvo; 4 - não turvo

5.3.7. Atividade de enzimas amilolíticas produzidas pelos rizóbios selecionados

5.3.7.1. Ensaio enzimático a 90°C

Foram testadas pelo método de FUWA (1954) a 90°C por 10 minutos, as enzimas dos 12 rizóbios que foram considerados amilolíticos termofílicos nos testes anteriores (Figura 22). Foi observado que as enzimas de dois rizóbios (INPA R007 e INPA R012) não apresentaram atividade enzimática, totalizando 18,18% de isolados sem atividade enzimática e os demais isolados com atividade enzimática (81,82%).

Os dois rizóbios que apresentaram melhores resultados (INPA R020 e o INPA R001) foram utilizados para a realização de mais testes.

Estes resultados confirmaram os mostrados nos testes de índice de amilolise (Tabela 7), iodo na presença do amido (Tabela 8) e turbidez na presença do

amido (Tabela 9), que as amilases dos rizóbios INPA R020 e INPA R001 estão entre as que mostraram melhores características desejáveis que as demais.

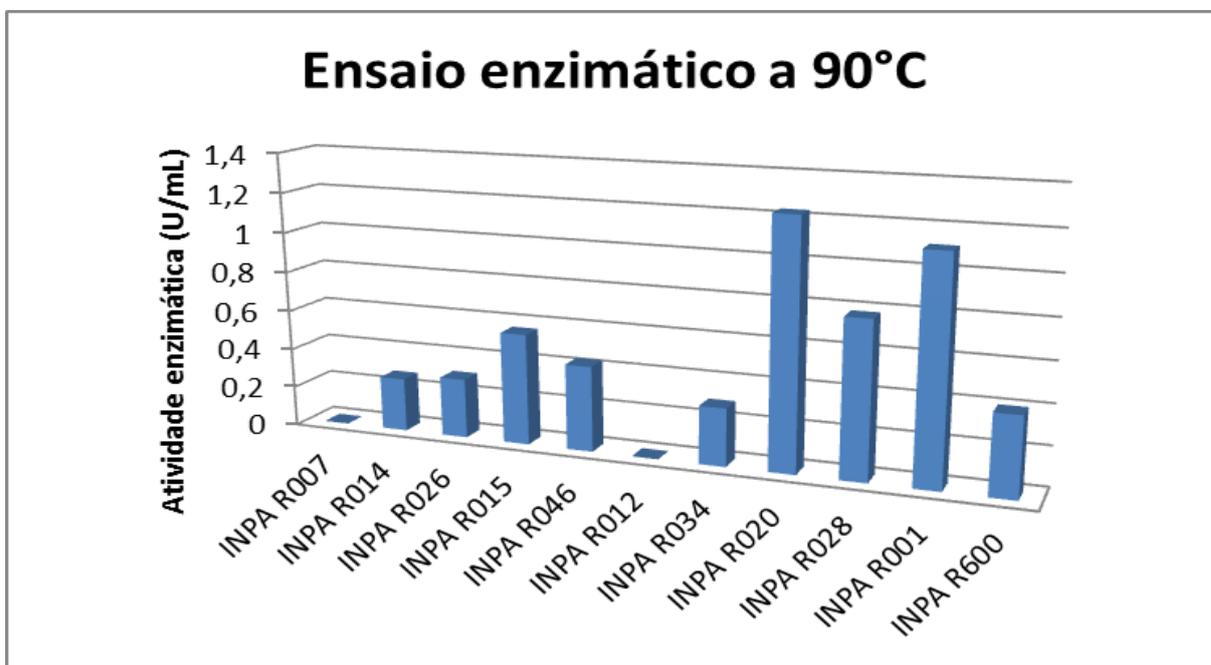


Figura 22. Atividade enzimática dos rizóbios na temperatura de 90°C por 10 minutos.

5.3.7.2. Determinação da temperatura ótima

As enzimas dos microrganismos selecionados foram testadas nas temperaturas de 20°C, 30°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C, 80°C, 90°C e 100°C e tampão acetato de sódio com pH 6,5, para se verificar qual sua temperatura ideal de reação.

A amilase produzida pelo rizóbio INPA R020 mostrou-se totalmente diferente das produzidas pelos mutantes anteriores. Ela apresentou melhor atividade na temperatura de 30°C, com aproximadamente 2,39 U/mL (Figura 23), seguida da temperatura de 40°C, com 2,24 U/mL, mas mostrando-se altamente termosensível, uma vez que sua atividade declinou de forma contínua de 40 até 100° C, quando apresentou atividade quase zero.

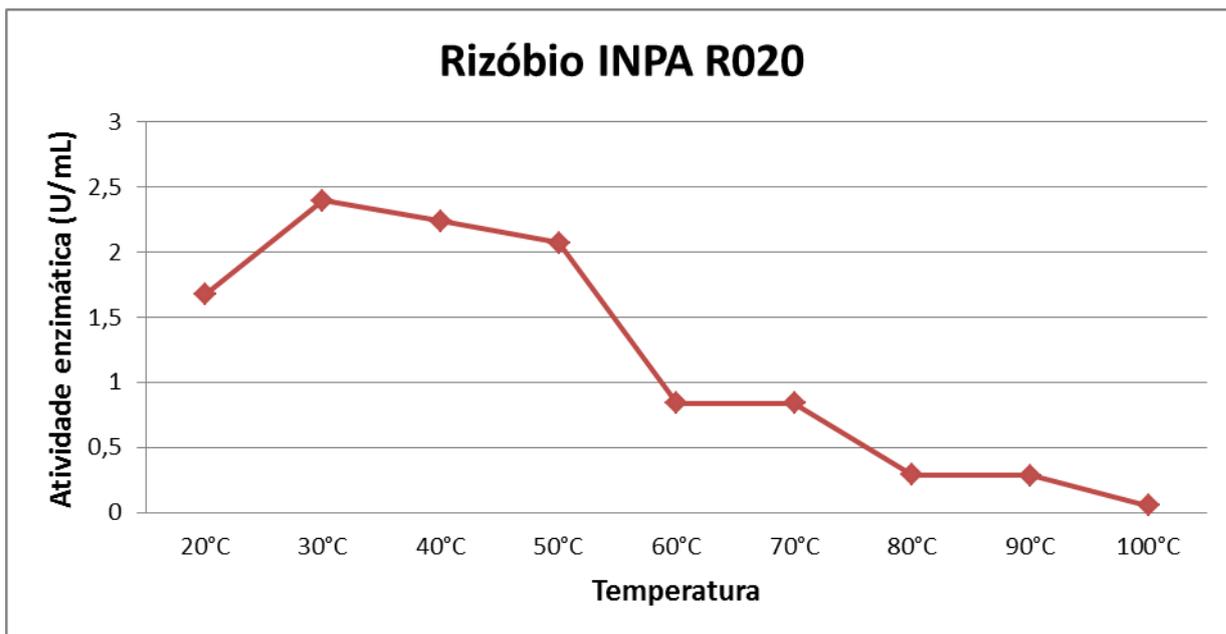


Figura 23. Atividade enzimática amilolítica do rizóbio INPA R020 sob diferentes temperaturas.

A enzima produzida pelo rizóbio INPA R001 apresentou melhor atividade na temperatura de 100°C, com aproximadamente 1,54 U/mL (Figura 24), seguida da temperatura de 20°C, com aproximadamente 0,84 U/mL.

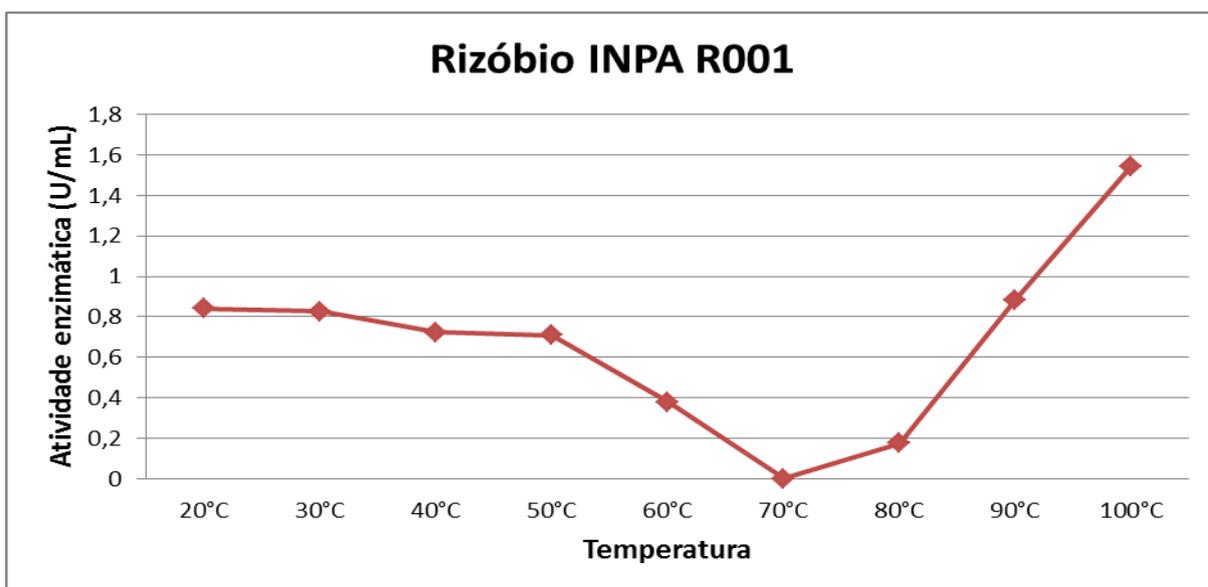


Figura 24. Atividade enzimática amilolítica do rizóbio INPA R001 sob diferentes temperaturas.

5.3.7.3. Determinação do pH ótimo

Após os testes com diferentes temperaturas, foram realizados testes em diferentes pH's e três temperaturas diferentes para se verificar qual o pH ideal de atividade de cada enzima.

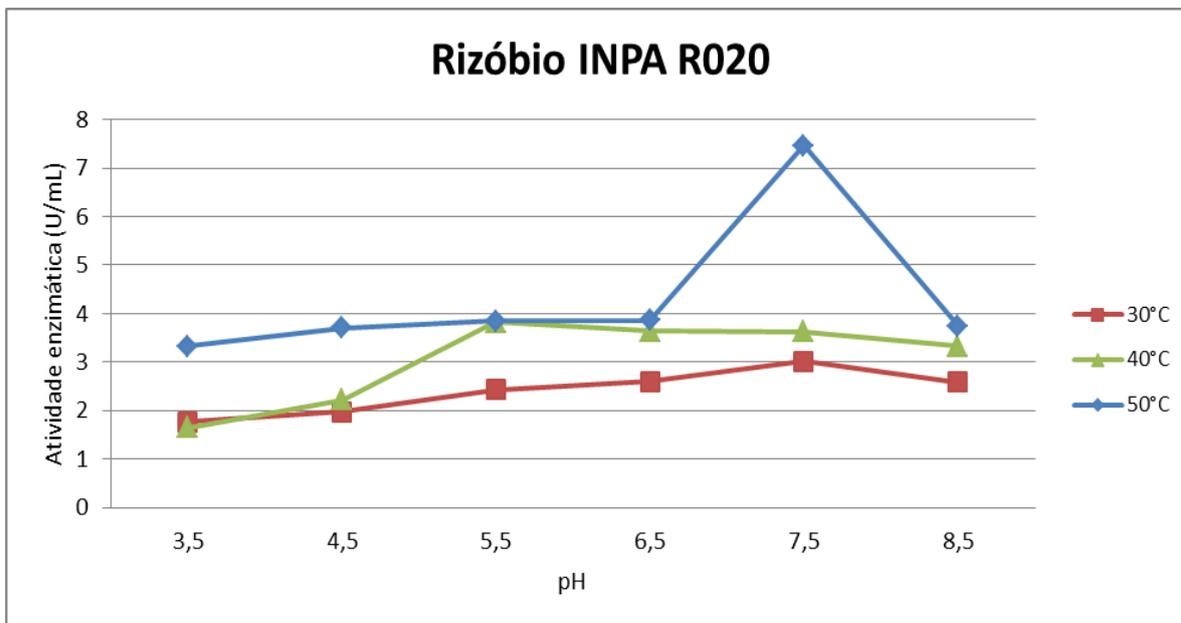


Figura 25. Atividade enzimática amilítica do rizóbio INPA R020 sob diferentes pH's e temperaturas.

A amilase produzida pelo rizóbio INPA R020, exceto pelo pico de atividade enzimática observado no pH 7,5 e temperatura de 50°C, não se observou variações significativas à medida que se elevou o pH do meio (Figura 25).

Essa enzima apresentou melhor atividade no pH 7,5 e na temperatura de 50°C, com aproximadamente 7,46 U/mL (Figura 25), seguido do pH 6,5 também na temperatura de 50°C, com aproximadamente 3,87 U/mL.

Na temperatura de 30°C a melhor atividade da enzima foi no pH 7,5 com 3,0 U/mL, seguido do pH 8,5 com 2,5 U/mL. Na temperatura de 40°C a melhor atividade foi no pH 5,5 com 4,0 U/mL, seguido do pH 6,5 com 3,7 U/mL (Figura 25).

A enzima produzida pelo rizóbio INPA R001 apresentou melhor atividade no pH 4,5 e na temperatura de 100°C, com aproximadamente 1,36 U/mL (Figura 26), seguido do pH 6,5 na temperatura de 90°C, com aproximadamente 1,22 U/mL.

Na temperatura de 80°C, a melhor atividade enzimática amilolítica no pH 6,5, com 1,1 U/mL, seguido do pH 5,5 com 1,0 U/mL.

Na temperatura de 90°C, a melhor atividade foi no pH 6,5, com atividade de 1,2 U/mL, seguido do pH 7,5 com atividade de 1,0 U/mL.

Os valores de atividade enzimática desse rizóbio foram semelhantes aos observados nos dois mutantes e bem inferiores ao do rizóbio anterior, mas o comportamento em resposta às mudanças de pHs e temperaturas foi diferente. A 80°C, não se observou variação significativa entre os pHs 3,5 até 6,5, declinando de forma acentuada nos pHs 7,5 e 8,5. Na temperatura de 90°C, observou-se uma elevação acentuada da atividade à medida que o pH foi aumentando de 3,5 até 6,5, declinando levemente nos pHs 7,5 e 8,5.

Na temperatura de 100°C, observou-se uma elevação acentuada quando se aumentou o pH de 3,5 para 4,5, quando então se observou um declínio gradual até o pH 8,5, chegando a 0,5 U/mL.

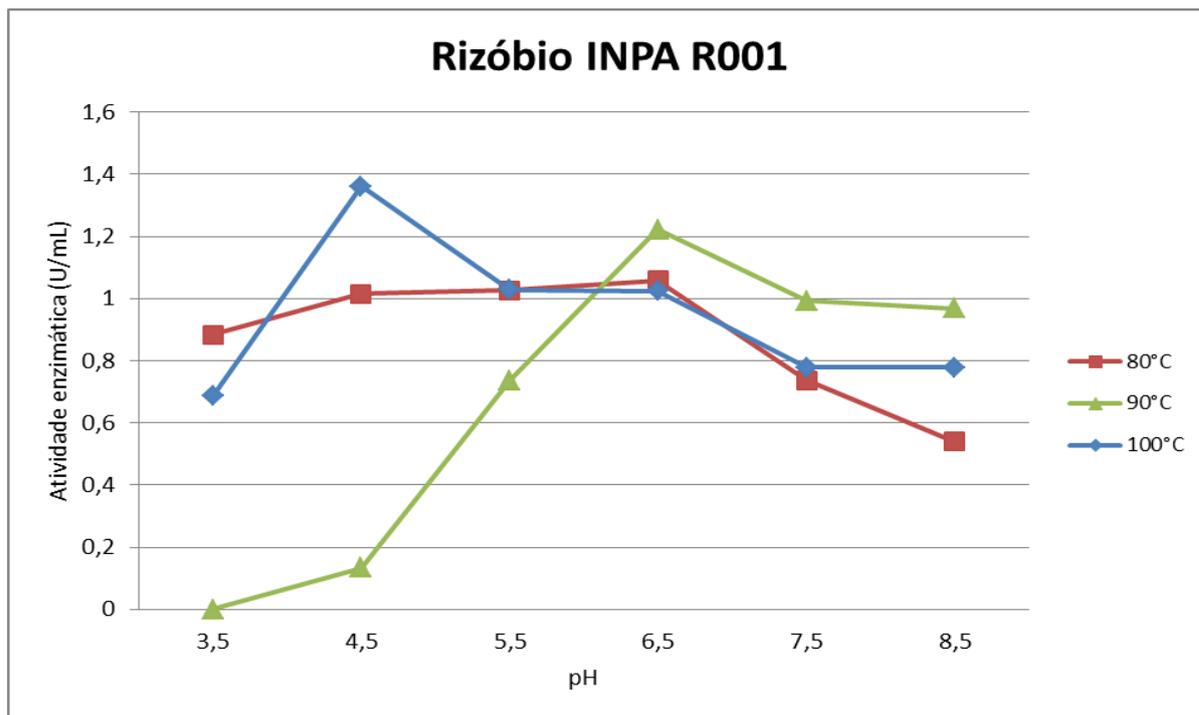


Figura 26. Atividade enzimática amilítica do rizóbio INPA R001 sob diferentes pH's e temperaturas.

5.3.7.4. Tempo ótimo de incubação das enzimas dos isolados

As enzimas foram testadas quanto ao tempo ideal de incubação durante a reação enzimática nos tempos de 5, 10, 15, 20, 30 e 45 minutos em três temperaturas diferentes nos pH's considerados ideais obtidos nos testes anteriores.

A enzima do rizóbio INPA R020 também mostrou um comportamento semelhante ao do mutante 023M anterior, com um declínio gradual à medida que se aumentou o tempo de exposição às temperaturas de 50, 60 e 70°C (Figura 27). Só que nesse caso, não houve diferença de comportamento entre as temperaturas de 50 e 60°C. A enzima desse rizóbio apresentou uma redução significativa quando se elevou a temperatura para 70°C.

A enzima do rizóbio INPA R020 apresentou melhor atividade no tempo de 5 minutos e na temperatura de 60°C, com aproximadamente 6,25 U/mL (Figura 27).

Foi observado que nas temperaturas de 50°C e 60°C, não houve diferença nas atividades, ficando o tempo de 5 minutos na temperatura de 50°C a segunda melhor atividade, com aproximadamente 6,12 U/mL, diminuindo até 1,0 U/mL nos últimos 45 minutos de reação enzimática.

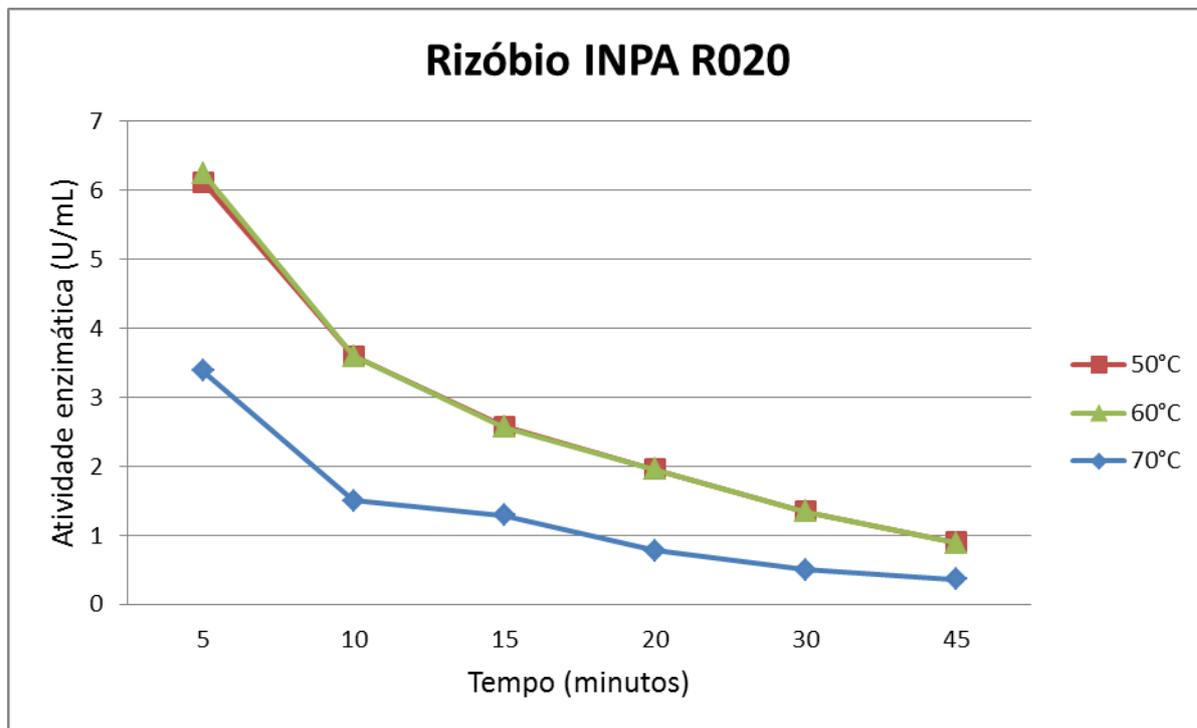


Figura 27. Atividade enzimática amilolítica do rizóbio INPA R020 em diferentes tempos e de reação e temperaturas.

Já na temperatura de 70°C, pôde-se observar uma queda sinificativa de atividade da enzima, que variou de 3,5 U/mL nos primeiros 5 minutos de reação até 0,5 U/mL nos últimos 45 minutos de reação.

A enzima produzida pelo rizóbio INPA R001 apresentou um comportamento bem diferente do observado com as outras bactérias. A 100C sua atividade foi bem superior nos 10 minutos iniciais do que as observadas a 80 e 90°C, mas houve um declínio significativo sob essa temperatura, bem maior do que o observado nas outras duas temperaturas. Nas temperaturas de 80 e 90°C observou um salto de atividade aos 15 e 20 minutos respectivamente, mas pouca variação da atividade com o tempo. A melhor atividade ocorreu no tempo de 5 minutos e na temperatura de 100°C, com aproximadamente 1,19 U/mL (Figura

28), seguido do tempo de 10 minutos também na temperatura de 100°C, com aproximadamente 0,97 U/mL.

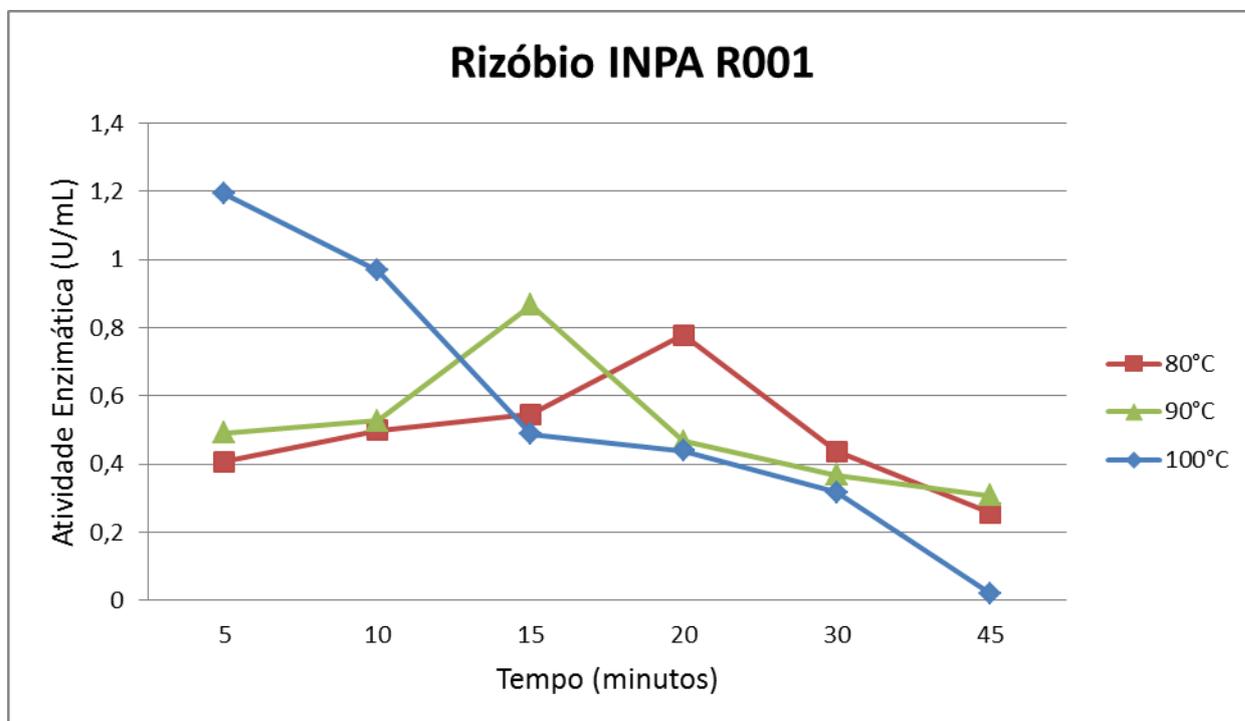


Figura 28. Atividade enzimática amilolítica do rizóbio INPA R001 em diferentes tempos de reação e temperaturas.

Na temperatura de 80°C, a melhor atividade foi no tempo de 20 minutos com 0,8 U/mL, seguida do tempo de 15 minutos com 0,6 U/mL. Já na temperatura de 90°C, a melhor atividade foi no tempo de 15 minutos, com atividade de cerca de 0,9 U/mL, seguido do tempo de 10 minutos, com atividade de cerca de 0,5 U/mL.

5.3.7.5. Determinação do choque térmico das enzimas dos microrganismos

As enzimas dos microrganismos foram testadas quanto à atividade enzimática nas temperaturas de 70°C, 80°C e 90°C e nos tempos de 5, 10, 15, 20, 30 e 45 minutos (chamado de choque térmico) e colocadas no gelo para, posteriormente serem feitas as reações enzimáticas nas temperaturas e tempos considerados ideais nos testes anteriores.

A enzima produzida pelo rizóbio INPA R020 apresentou queda brusca de atividade já com 10 minutos de choque térmico (Figura 29), mostrando a melhor atividade com 5 minutos e temperatura de 80°C, com aproximadamente 3,50 U/mL, seguido do choque térmico de 5 minutos na temperatura de 70°C, com aproximadamente 1,42 U/mL.

Na temperatura de 70°C, a enzima apresentou atividade de 1,5 U/mL nos primeiros 5 minutos, diminuindo gradativamente, chegando a 1,25 U/mL nos 10 minutos, 0,5 U/mL dos 15 aos 20 minutos, decaindo até 0,25 U/mL nos 45 minutos.

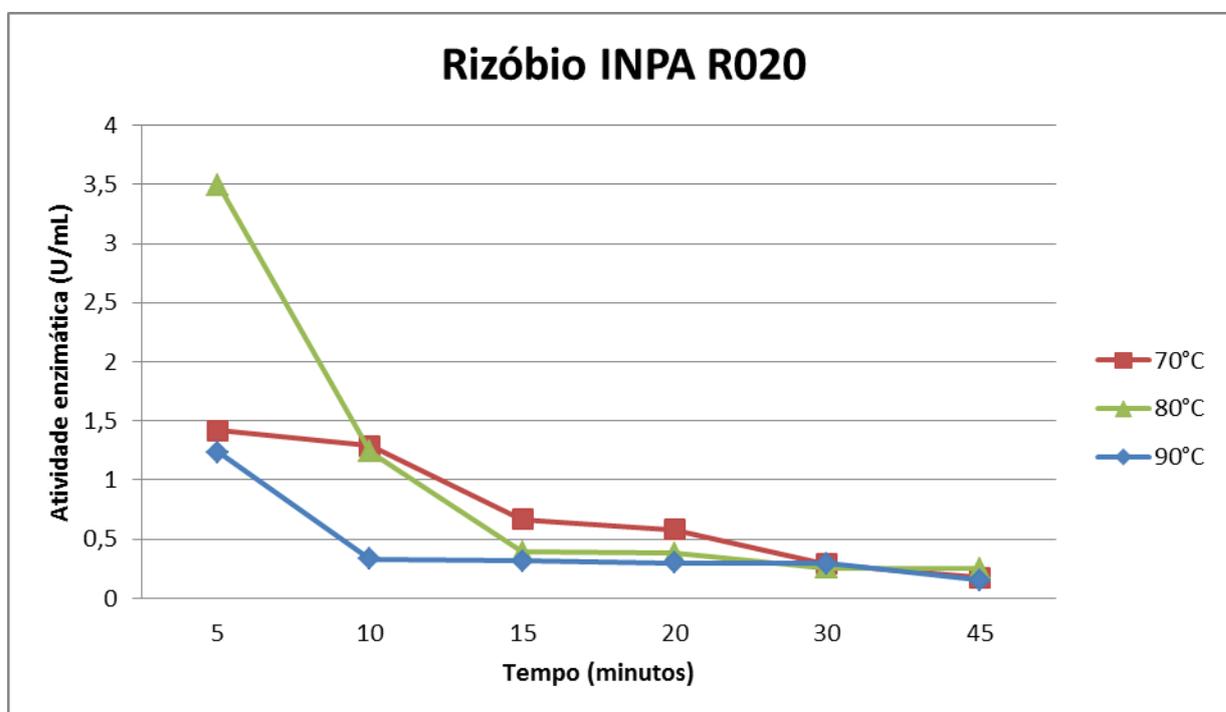


Figura 29. Atividade enzimática amilolítica do Rizóbio INPA R020 após choques térmicos.

Na temperatura de 80°C, a atividade enzimática chegou a 3,5 U/mL nos 5 minutos, diminuindo gradativamente nos 10 minutos para 1,25 U/mL, diminuindo para 0,25 U/mL nos 15 minutos e mantendo estável até os 45 minutos.

Na temperatura de 90°C, a atividade começou com 1,25 U/mL nos 5 minutos, diminuindo para 0,25 U/mL nos 10 minutos e se mantendo estável até os 45 minutos finais. A amilase produzida por esse rizóbio mostrou a melhor atividade quando exposta a 80°C por 5 minutos.

A amilase da estirpe de rizóbio INPA R001 também mostrou diminuição de sua atividade quando exposta a choques térmicos por tempos diferentes a temperaturas elevadas (Figura 30). A melhor atividade foi observada com um choque térmico de 5 minutos na temperatura de 70°C, com aproximadamente 1,21 U/mL (Figura 30), seguido do choque térmico no tempo de 10 minutos na temperatura de 80°C, com aproximadamente 1,00 U/mL.

Na temperatura de 70°C, a atividade enzimática chegou a 1,2 U/mL nos 5 minutos, diminuindo drasticamente a 0,5 U/mL nos 10 minutos, chegando a 0,2 U/mL nos 20 minutos e a zero de atividade nos 45 minutos.

Na temperatura de 80°C, a atividade se manteve estável com 1,00 U/mL dos 5 aos 10 minutos, diminuindo para 0,7 U/mL dos 15 aos 20 minutos, chegando a 0,4 U/mL nos 45 minutos.

Na temperatura de 90°C, a atividade se manteve 0,6 U/mL dos 5 aos 10 minutos, diminuindo para 0,4 U/mL nos 15 minutos, se mantendo estável até os 30 minutos e chegando a zero nos 45 minutos.

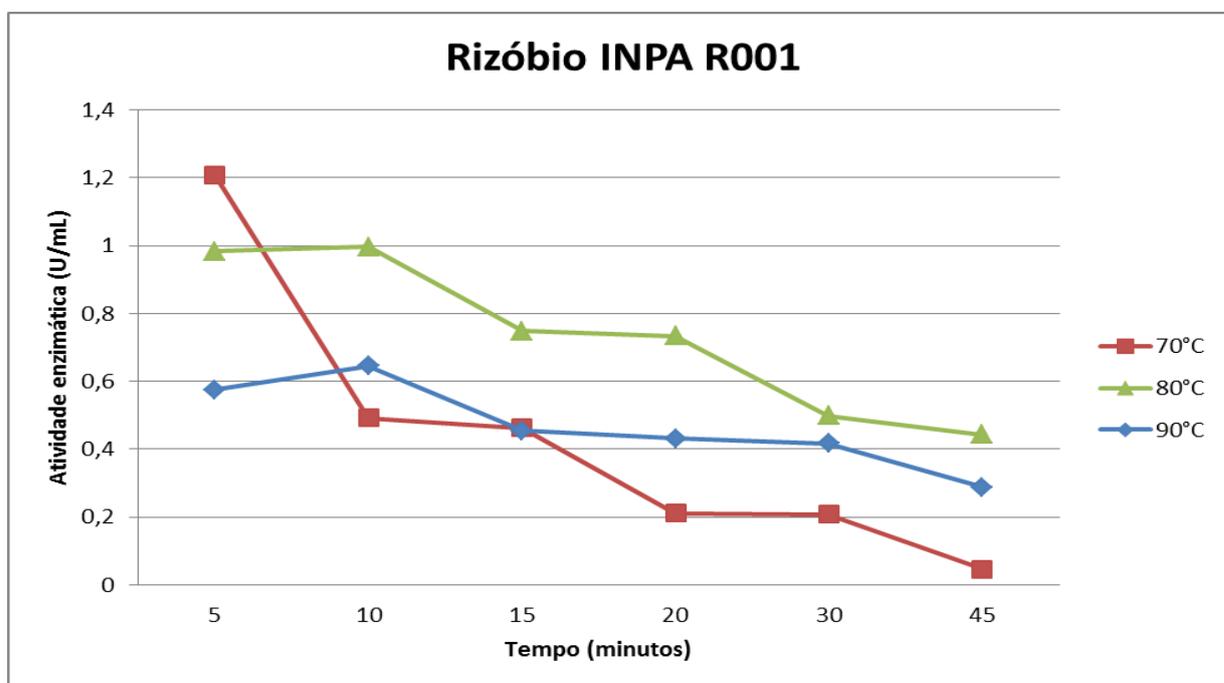


Figura 30. Atividade enzimática amilolítica do Rizóbio INPA R001 após choque térmico.

5.3.7.6. Termoestabilidade

A enzima do Rizóbio INPA R020 apresentou uma maior termoestabilidade na temperatura de 90°C, se mantendo uma atividade estável nos tempos de 50 a 80 minutos (figura 31).

A enzima apresentou maior atividade na temperatura de 70°C em 40 minutos (cerca de 0,41 U/mL), porém, essa atividade diminuiu bastante nos 50 minutos em diante (0,31 U/mL), não mantendo estabilidade em nenhum tempo, chegando a 0,18 U/mL nos 90 minutos.

A 80°C, a enzima apresentou atividade de 0,4 U/mL, aproximadamente, aos 40 minutos de reação. Porém, ao se passarem 50 minutos, a atividade amilolítica abaixou consideravelmente para 0,25 U/mL, diminuindo mais ao passar do tempo.

A 100°C, a enzima obteve atividade amilolítica de cerca de 0,35 U/mL nos primeiros 40 minutos de reação, chegando a 0,25 U/mL nos 50 minutos e diminuindo no restante do tempo.

O ideal seria utilizar a enzima a 70°C se for trabalhar até 40 minutos, mudando para 90°C se quiser trabalhar numa maior estabilidade até 90 minutos.

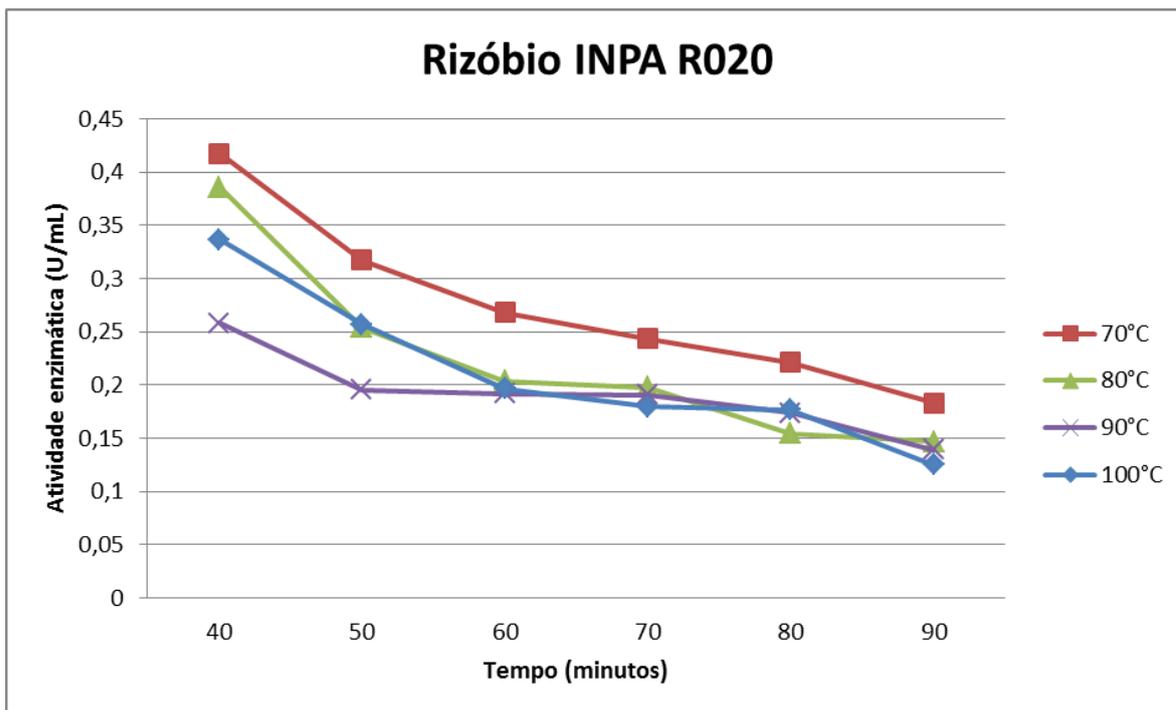


Figura 31. Termostabilidade da atividade amilolítica do Rizóbio INPA R020 em tempos e temperaturas diferentes.

A enzima do Rizóbio INPA R001 apresentou maior estabilidade na temperatura de 100°C, mantendo aproximadamente de 0,15 U/mL a 0,20 U/mL pelos 90 minutos de reação (figura 32).

Na temperatura de 70°C, a enzima não apresentou atividade nos primeiros 40 minutos de reação, aumentando a atividade para 0,25 U/mL nos 50 minutos e diminuindo novamente no tempo restante.

Na temperatura de 80°C, a enzima atingiu maior atividade nos 50 minutos de reação com 0,27 U/mL, sendo a maior atividade que a enzima apresentou neste teste. Após este tempo, a atividade diminuiu até 0,05 U/mL, aproximadamente, nos 90 minutos de reação.

Na temperatura de 90°C, a enzima apresentou atividade amilolítica alta nos 50 minutos de reação (0,26 U/mL), diminuindo ao passar do tempo, chegando a 0,1 U/mL nos 90 minutos.

Se for trabalhar com a maior atividade, o ideal seria utilizar a temperatura de 80°C. Porém, se for trabalhar com estabilidade, o ideal seria trabalhar a 100°C.

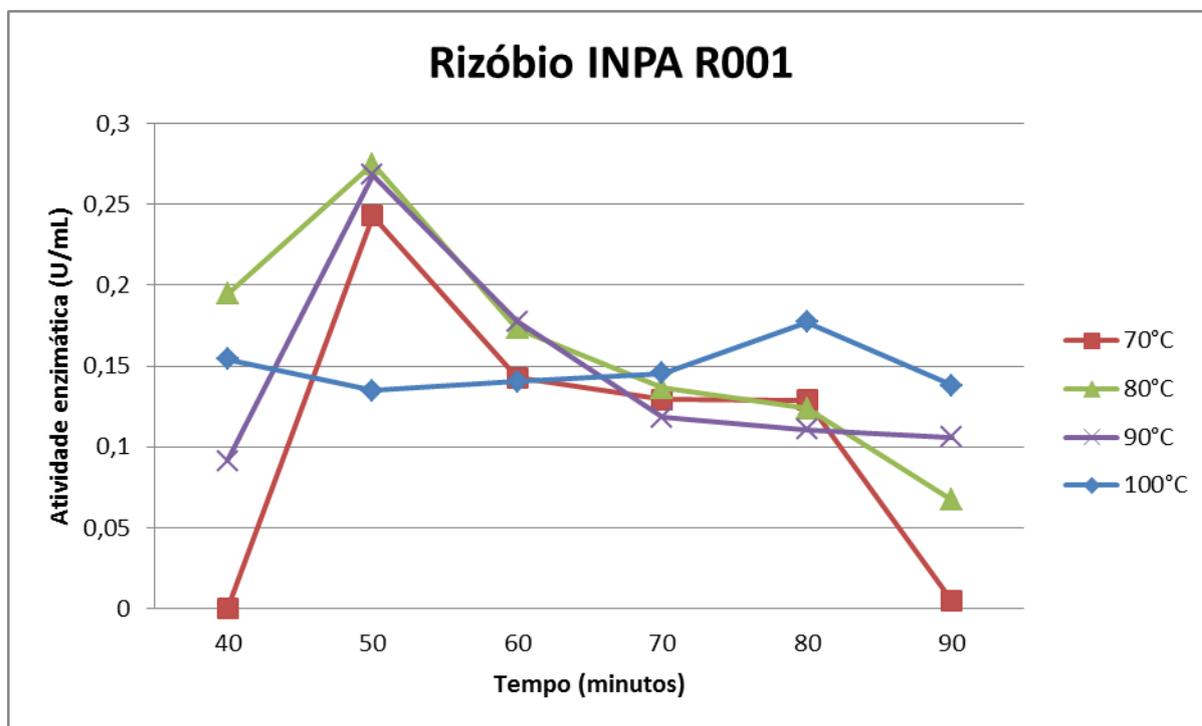


Figura 32. Termoestabílicas da atividade amilolítica do Rizóbio INPA R001 em tempos e temperaturas diferentes.

5.3.8. Teste para avaliar a atividade de todos os Rizóbios utilizados desde o início deste trabalho.

Foi realizado ensaio enzimático amilolítico de todos os Rizóbios testados durante este trabalho para confirmação de que possuem atividade amilolítica inferior ou nula aos escolhidos para os testes anteriores (figura 33).

Foi observado que 10 dos Rizóbios obtiveram atividade amilolítica nula (34,48%), 10 com atividade abaixo de 0,1 U/mL (34,48%) e 9 com atividade ente 0,1 e 0,7 U/mL (31,04%).

Porém, pôde-se confirmar, pela atividade amilolítica enzimática que os rmicrorganismos apresentaram, que os dois rizóbios escolhidos anteriormente (figura 22) apresentaram resultados superiores aos encontrados neste teste, consolidando a escolha destes para a realização dos testes anteriores.

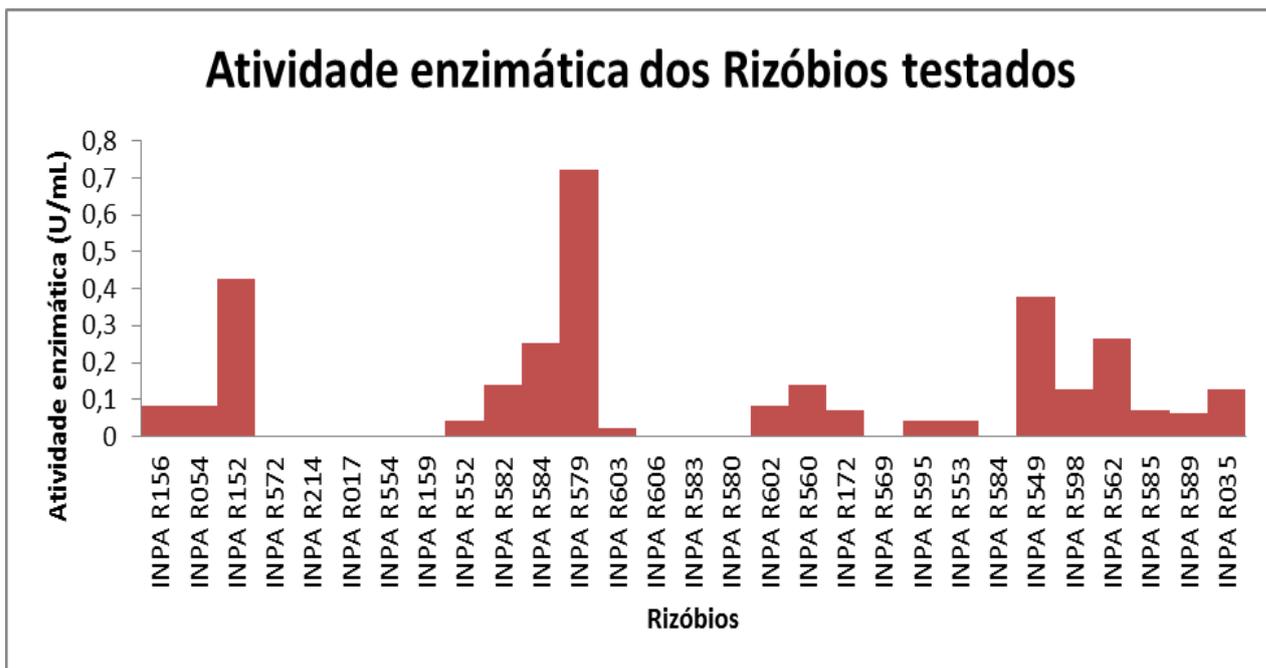


Figura 33. Atividade enzimática amilolítica de todos os rizóbios que foram avaliados no trabalho na temperatura de 90°C pelo tempo de 10 minutos.

5.4. CONCLUSÕES

Dos 40 isolados de rizóbios, 17 cresceram bem em meio de cultura contendo amido, 19 produziram halo amilolítico e 11 se mostraram termofílicos.

Os rizóbios INPA R001 e INPA R020 mostraram os maiores índices de amilólise.

As amilases dos rizóbios mostraram-se bem diversificadas quanto às suas características, indicando serem diferentes umas das outras.

As amilases dos rizóbios INPA R001 e INPA R020 apresentaram maior atividade a 90°C.

A amilase do rizóbio INPA R001 mostrou maior atividade a 100°C, e a do rizóbio INPA R020 a 30°C.

O pH ótimo A amilase do rizóbio INPA R001 mostrou maior atividade no pH 4,5 e a do rizóbio INPA R020 no pH 7,5.

As amilases testadas mostraram alta sensibilidade ao choque térmico, pois foram afetadas com tempos de 10 a 15 minutos.

A amilase do rizóbio INPA R020 mostrou maior termoestabilidade a 90°C e a do INPA R001 a 100°C.

A maior atividade amilolítica mostrada pelas amilases dos isolados foi de 1,6 U/mL, do rizóbio INPA R001 e 7,5 U/mL no rizóbio INPA R020.

6. Comparações entre os resultados

A Tabela 10 mostra um resumo das melhores situações encontradas com as amilases testadas no presente estudo, devendo-se levar em consideração quanto aos valores da atividade amilolítica (U/mL), que as concentrações de células dos microrganismos foram padronizadas em 10^6 UFC/mL. Em condições ideais, essa concentração pode ser aumentada para 10^9 ou até 10^{10} UFC/mL, o que, proporcionalmente poderia elevar os valores para 1500-7500 U/mL ou 15000-75000 U/mL.

Tabela 10. Comparação entre os testes realizados com os mutantes de *Bacillus* sp. e os rizóbios.

Testes/Bactérias	ITAAM 010M	ITAAM 023M	INPA R020	INPA R001
Temperatura ótima (°C)	100	100	30	100
pH ótimo e temperatura (°C)	4,5 100	7,5 90	7,5 50	4,5 100
Tempo ótimo (minutos) e temperatura (°C)	5 90	5 80	5 50/60	5 100
Choque térmico (minutos e °C)	5/70	10/80	5/80	5/70
Termoestabilidade (°C)	90	80	90	100
Concentração de células (UFC/mL)	10^6	10^6	10^6	10^6
Atividade amilolítica (U/mL)	1,6	1,5	7,5	1,6

As temperaturas em que as enzimas dos isolados apresentaram maiores atividades foram de 30°C para o rizóbio INPA R020 e 100°C para os mutantes ITAAM 010M e 023M e o rizóbio INPA R001.

Os pH's em conjunto com a temperatura em que as enzimas apresentaram maiores atividades foram 4,5 e 100°C para o mutante ITAAM 010M e o rizóbio INPA R001, 7,5 e 50°C para o rizóbio INPA R020 e 7,5 e 90°C para o mutante ITAAM 023.

O tempo em conjunto com a temperatura em que foram apresentadas as melhores atividades amilolíticas foi 5 minutos para todos os isolados, porém nas temperaturas de 50°C e 60°C para a amilase do rizóbio INPA R020, 80°C na do mutante ITAAM 023M, 90°C na do mutante 010M e 100°C na do rizóbio INPA R001.

As combinações de tempos e temperaturas em que as enzimas apresentaram maiores atividades amilolíticas após o choque térmico foram 5 minutos e 70°C para a amilase do mutante ITAAM 010M e rizóbio INPA R001 e 5 minutos e 80°C para a do rizóbio INPA R020 e, 10 minutos e 80°C para a do mutante 023M.

O mutante 023M foi mais termoestável na temperatura de 80°C, o mutante 010M e o rizóbio INPA R020 foram mais termoestáveis na temperatura de 90°C e o rizóbio INPA R001 na temperatura de 100°C

As maiores atividades apresentadas em todos os testes realizados foram de 1,5 U/mL do mutante 023M, 1,6 U/mL do mutante 010M e do rizóbio INPA R001 e 7,5 U/mL do rizóbio INPA R020.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAM, Álcool de mandioca atrai investimentos. Associação Brasileira dos Produtores de Amido de Mandioca, 13p. (www.abam.com.br). 2006.

ADAMS, P. R.; DEPLOYED, J. J.; **Mycologia**, 70, 906, 1978.

AGUERO, J.M.Z. **Estudo da Inativação da Glicoamilase e da Influência de Fosfatos na Produção da Enzima em Cultivos de *Aspergillus awamori***. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP. 123pp. 1998.

ALKORTA, I.; GARBISU, C.; LLAMA, M.J.; SERRA, J. L. Industrial applications of pectic enzymes: a review. **Process Biochemistry**, v.33, no 1, p.21-28, 1998.

ALTAMINARO, M.M.; BLACKBURN, J.M.; AGUAYO, C.; FERSHT, A.R. Directed evolution of new catalytic using the alpha/beta-barrel scaffold. **Nature**, v. 403, n. 6770, p. 617-622, 2000.

ARIKAN, B. Highly thermostable, thermophilic, alkaline, SDS and chelator resistant amylase from a thermophilic *Bacillus* sp. Isolate A3-15. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 3071 – 3076, 2008.

ARNOLD, F.H.; WINTRODE, P.L.; MIYAZAKI, K.; GERSHENSON, A.; Trends Biochem. **Science**., 26, 100, 2001.

ASGHARI, S.M.; KHAJCH, K.; RANJBAR, B.; SAEDI, R.J.J.; NADERKLI-MANESH, H.; **Int. J. Biol. Macromol.**, 34, 173, 2004.

AUTERINEN, A. **White Biotechnology and Modern Textile Processing Textile World**, p. 40-44, May/Jun, 2006.

AZEVEDO, J.L. **Genética de Microrganismos**. Editora UFG, 535p, 2008.

BERG J.; TYMOCZKO J.; STRYER L. 2002. **Biochemistry**. W. H. Freeman and Company ISBN 0-7167-4955-6, 2002.

BERTHELOT, K.; DELMOTTE, F.M. Purification and Characterization of an α - Glucosidase from *Rhizobium* sp. (*Robinia pseudoacacia* L.) Strain USDA 4280. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 65, n. 7, p. 2907-2911, 1999.

BERTOLDO, C.; ANTRANIKIAN, G. Starch-hydrolyzing enzymes from thermophilic archaea and bacteria. **Current Opinion in Chemical Biology**, 6:151 – 160. 2002.

BRINGHENTI, L. **Qualidades do álcool produzido a partir de resíduos amiláceos da agroindustrialização da mandioca**. Botucatu. 72 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, 2004.

BULÉON, A.; COLONNA, P.; PLANCHOT, V.; BALL, S. Starch granules: structure and biosynthesis. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 23, p. 85-112, 1998.

BUZZINI, P.; MARTINI, A. Extracellular enzymatic activity profiles in yeast and yeast-like strains isolated from tropical environments. **Journal of Applied Microbiology**, v. 93, n. 6, p. 1020-1025, 2002.

CANNAVAN, F.S. **Diversidade das comunidades bacterianas em solos de terra preta antropogênica da Amazônia Central e Oriental**. Dissertação (Dissertação de Mestrado) — Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2007.

CARIOCA, J.O.B.; ARORA,H.L. **Biomassa: fundamentos e aplicações tecnológicas**. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. 331p. 1984.

CEREDA, M.P.; VILPOUX, O.F.; DEMIATE, I.M. Amidos modificados. *In: Cereda, M. P. Vilpoux, O. (Eds). Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas.* Vol. 3. Fundação Cargill, São Paulo, SP. p. 246-333. 2003.

CHABOT, R.; BEAUCHAMP, C.J.; KLOEPPER, J.W.; AUTON, H. Effect of phosphorus on root colonization and growth promotion of maize by bioluminescent mutants of phosphate-solubilizing *Rhizobium leguminosarum* bv *phaseoli*. *Soil Biol. Biochem.*, 30: 1615-1618, 1998.

CHAGAS JR; OLIVEIRA LA; OLIVEIRA AN; WILLERDING AL. Capacidade de solubilização de fosfatos e eficiência simbiótica de rizóbios isolados de solos da Amazônia. *Acta Scientiarum. Agronomy.* Maringá, v. 32, n. 2, p. 359-366, 2010.

CHANG, J.J., TSAI, J.J., WU, K.H.; *Bioresour. Technol.*, 97, 116, 2006.

CHEN, W.X.; WANG, E.T.; KUYKENDALL, L.D. Genus *Mezorhizobium*, Family Photobacteriaceae. *In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, George Garrity (Ed.), Springer-Verlag, 2 ed., v. 2, p. 403-408. 2005.

CORNELIS, P. Microbial amylases. *Microbiological Sciences*, v.4, n.11, p.342-343, 1987.

COSTA NETO, P.R.; ROSSI, L.F.S.; ZAGONEL, G.F.; RAMOS, L.P. Produção de biocombustível alternativo ao óleo diesel através da transesterificação de óleo de soja usado em frituras. *Química Nova*, 23: 531-537. 2000.

COWAN, D.A.; *Comp. Biochem. Physiol., Part B: Biochem. Mol. Biol.*, 118A, 429, 1997.

CRABB, W.D.; MITCHINSON, C. Enzymes involved in the processing of starch to sugar. *TIBTECH*, v. 15, p. 349–352, 1997.

CUNHA, S.P. e SEVERO FILHO, W.A. **Avanços Tecnológicos na obtenção de etanol a partir de sorgo sacarino (*Sorghum bicolor* (L.) Moench)**, 2010.

DE VOS, P.; TRUPER, H.G.; TINDAL, B.J. Judicial Commission of the International Committee on Systematics of Prokaryotes Xth International (IUMS) Congress of Bacteriology and Applied Microbiology. Minutes of the meetings, 28, 29 and 31 July and 1 August 2002, Paris, France. **International Journal Systematics Evol. Microbiology**, v. 55, p. 525-532, 2005.

EUZÉBY, J.P.; KURO, T. Corrigenda to the Validation Lists. **International Journal Systematics Evol. Microbiology**, v. 51, p. 1933-1938, 2001.

FRAZIER, W.C.; WESTHOFF, D.C. 1988. **Food Microbiology**. 4.ed. McGraw-Hill International Edition. p.390-397. 1988.

FUJIMOTO, Z.; TAKASE, K.; DOUI, N.; MOMMA, M.; MATSUMOTO, T.; MIZUNO, H. Crystal structure of a catalytic-site mutant α -amylase from *Bacillus subtilis* complexed with maltopentaose. **Journal of Molecular Biology**. 277: 393-407, 1998.

FUWA, H. A new method for microdetermination of amylase activity by the use of amylose as the substrate. **Journal of Microbiology**, v. 41, p. 583-603, 1954.

GARNERO, M. **Energia: o futuro é hoje**, São Paulo, ANFAVEA. 1980.

GIORDANO, R.L.C.: **Estudo da Coimobilização de Glicoamilase e Levedura para Fermentação Alcoólica Contínua de Matéria-Prima Amilácea**. Tese Doutorado. USP, S. Paulo-SP, 238p, 1992.

GIULIO, D.M. The universal ancestor lived in a thermophilic or hyperthermophilic environment. **J. Theor. Biol.** 203-213. 2000.

GOMES, E.; GUEZ, M. A. U.; MARTIN, N.; SILVA, R. **Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial**. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, 2006.

GOMES, M.J.P. **Tópicos em Bacteriologia Veterinária**. FAVET-UFRGS. 48p. 2013.

GONÇALVES, M.F.V. **Tratamento térmico dos amidos de batata-doce (*Ipomoea batata* L.) e de mandioca-salsa (*Arracacia xanthorrhiza*) sob baixa umidade em microondas**. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, Piracicaba, São Paulo. 91 p. 2007.

HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S.L. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. **Mycologia** 67:597-607. 1975.

HOGGETT, J.G.; KELLET, G.L. Yeast hexokinase: substrate-induced association-dissociation reactions in the binding of glucose to hexokinase P-II, Eur. **J. Biochem.**, Vol 66, 65-77, 1976.

HOWARD H. **The Structural Biology Program, "RNA, The Enzyme"**. Media Institute. (<http://www.hhmi.org/annual99/a255.html>).

HUBER, H., STETTER, K. Hyperthermophiles and their possible potential in biotechnology. **J. Biotechnol.** 64:39-52, 1998.

HUBER, R.; LANGWORTHY, T.A.; KÖNIG, H.; THOMM, M.; WOESE, C.R.; SLEYTR, U.B.; STETTER, K.O.; **Arch. Microbiol.** 144, 324, 1986.

HUSER, B.S.; PATEL, B.K.; DANIEL, R.M.; MORGAN, H.W.; **FEMS Microbiol. Lett.** 37, 121, 1986.

JAYANI, R.S., SAXENA, S., GUPTA, R. Microbial pectinolytical enzymes: a review. **Process Biochem.**, v.40, p.2931– 2944, 2005.

KAMPFEER, P.; NEEF, A.; SALKINOJA-SALONEN, M. S.; BUSSE, H. J.; *Chelatobacter heintzii* (Auling et al. 1993) is a later subjective synonym of

Aminobacter aminovorans (Urakami et al. 1992). **International Journal Systematics Evol. Microbiology**, v. 52, p. 835-839, 2002.

KASHYAP, D. R.; VOHRA, P. K.; CHOPRA, S. e TEWARI, R. Applications of pectinases in the commercial setor: a review. **Bioresource Technology**, v. 77, p. 215-227, 2001.

KIRK, O.; BORCHERT, T.V.; FUGLSANG, C.C. Industrial enzyme applications. **Currente Opinion in Biotechnology**, v.13, n. 4, p. 345-351, 2002.

KUNS, A.; DURÁN, S. Novas tendências no tratamento de efluentes têxteis. *Química Nova*, v. 25, n. 1 São Paulo, Jan./Fev, 2002.

LAOPAIBOON, P.; LAOPAIBOON, L.; KHONGSAY, N. **Biotechnology.**, vol. 9 (1), p. 9-16, 2010.

LASA, I.; BERENGER, J. Thermophilic enzymes and their biotechnological potential. **Microbiologia**, 9:77-89, 1993.

LEALEM, F.; GASHE, B.A. Amylase production by a gram-positive bacterium isolated from fermenting tef (*Eraglostis tef*). **J. Appl. Bacteriol.**, v. 77, n. 1, p. 348-352, 1994.

LEHNINGER, Albert L.; **Princípios de bioquímica**. 4 ed: São Paulo. Sarvier, 2006.

LEONEL, M.; CEREDA, M.P. Caracterização físico-química de algumas tuberosas amiláceas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 22(1): 65-69. 2002.

MACCHERONI JR., W.; ARAÚJO, W.L. Ambient pH-regulated enzyme secretion in endophytic and pathogenic isolates of the fungal genus *Colletotrichum*. **Sci. agric.**, 61:298-302, 2004.

MADIGAN, M.T.; OREN, A.; Thermophilic and halophilic extremophiles. **Curr. Opin. Microbiol.**, 2, 265-269, 1999.

MAHESHWARI, R.; BHARADWAJ, G.; BATH, M.K.; Thermophilic fungi: their physiology and enzymes. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** 64:461–488. doi:1092-2172/00/\$04.0010.

MALDONADO, H.G.; LÓPEZ, O.P. Amylolytic enzymes and products derived from starch: a review. **Critical Reviews in Food Science and nutrition**. v. 35, n.5, p. 373-403, 1995.

MARCOCCIA, R. **A participação do etanol brasileiro em uma nova perspectiva na matriz energética mundial**. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP. 95p. 2007.

McCARTHY, T.; HANNIFFY, O.; LALOR, E.; SAVAGE, A.V.; YUOHY, H.G.; **Process Biochem.** 40, 1742, 2005.

MORAES, L.M.P. Amilases. In: SAID, S.; PIETRO, R.C.L.R. (eds.) **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Editora Legis Summa, Ribeirão Preto, SP. p.223-242. 2004.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: Editora UFLA, 262 p, 2002.

MOUCHACCA, J.; **Crypogram. Mycol.** 18, 19, 1997.

NIEHAUS, F., BERTODO, M., KÄHLER, M., ANTRANIKIAN, G. Extremophiles as source of novel enzyme for industrial application. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 51:711-729, 1999.

NIGAM, P.; SINGH, D. Enzyme and microbial systems involved in starch processing. **Enzyme and Microbial Technology**, 17 (9):770-778. 1995.

OLIVEIRA, L.A.; MAGALHÃES, H.P. de. Quantitative evaluation of acidity tolerance of root nodule bacteria. **Revista de Microbiologia**, v.30, p.203-208, 1999.

OLIVEIRA, A.N. **Characterization of amylase and protease produced by indigenous central Amazonian rhizobia strains**. Tese de doutorado, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas. 150pp, 2006.

OLIVEIRA, A.N.; OLIVEIRA, L.A.; ANDRADE, J.S.; CHAGAS JÚNIOR, A.F. Enzimas hidrolíticas extracelulares de isolados de rizóbia nativos da Amazônia Central, Amazonas, Brasil. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, 26:853-860, 2006a.

OLIVEIRA, A. N; OLIVEIRA, L. A.; ANDRADE, J. S; CHAGAS JÚNIOR, A. F. Atividade enzimática de isolados de rizóbia nativos da Amazônia Central crescendo em diferentes níveis de acidez. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.26, n.1, p. 204-210, 2006b.

OLIVEIRA, A.N.; OLIVEIRA, L.A.; ANDRADE, J.S. e CHAGAS-JÚNIOR, A.F. Produção de amilase por rizóbios, usando farinha de pupunha como substrato. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, 27(1): 61-66, jan.-mar. 2007.

OLIVEIRA, C.M. **Bacillus de solos do estado do Amazonas produtores de alfa-amilase. Monografia**. Faculdade de Ciências Agrárias. Universidade Federal do Amazonas. 2010.

PALMA-FERNANDEZ, E.R.; GOMES, E.; Da Silva, R.; Purification and characterization of two beta-glucosidases from **Folia Microbiol.** 47(6), 685-90, 2002.

PANDEY, A.; NIGAM, P.; SOCCOL, C.R.; SOCCOL, V.T.; SINGH, D.; MOHAN, R. Advances in microbial amylases. **Biotechnol. Appl. Biochem.**, v. 31, n. 2, p. 135-152, 2000.

PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; PEREIRA, J.O.; AZEVEDO, J.L. **Genética de Fungos no Laboratório**. Série Fundamentos de Biotecnologia. Editora da Universidade de Manaus. 138p. 1998.

RADZICKA, A.; WOLFENDEN, R., "A proficient enzyme.", **Science**, 6(267), p. 90-93, 1995.

RAHMAN, R.N.Z.A.; GEOK, L.P.; BASRI, M.; SALLEH, A.B. Physical factors affecting the production of organic solvent-tolerant protease by *Pseudomonas aeruginosa* strain K, **Bioresour Technol.**, 96:429-436, 2005.

RAID, D.E. **Evolução dirigida da alfa-amilase de *Bacillus subtilis***. Dissertação de Mestrado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazonas. 71p. 2007.

REIS, J.P.Z. **Dosagem de etanol utilizando álcool desidrogenase de levedura de panificação**. Araraquara, 77 f. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos) Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita Filho, 2006.

RODRIGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology Advances**, 17: 319-339, 1999.

SACHS, I. Os biocombustíveis estão chegando à maturidade. **Democracia viva**, 29: 26-31. 2005.

SAID, S.; PIETRO, R. Generalidades sobre aplicação industrial de enzimas. In: Enzimas como agentes biotecnológicos. Ribeirão Preto: **Legis Summa**, 2004, p. 1-7.

SANCHEZ, P.A.; BANDY, D.E.; VILLACHICA, J.H.; NICHOLAIDES, J.J. Amazon basin soils: management for continuous crop production. **Science**, 216:821-827, 1982.

SANOMIYA, L.T.; MAHAS, E. Hydrolases producers microorganisms involved in the soil carbon and nitrogen cycling. **Ci. Rural**, 33:835-842. 2003.

SANTOS, M.A. **Inserção do biodiesel na matriz energética brasileira: Aspectos técnicos e ambientais relacionados ao seu uso em motores combustíveis**. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP. 118p. 2007.

SAWADA, H.; KUYKENDALL, L. D.; YOUNG, J. M. Changing concepts in the systematic of bacterial nitrogen-fixing legume symbionts. **Journal Genetic Applied Microbiology**, v. 49, n. 3, p. 79-155, 2003.

SERNA-SALDIVAR, S.O.; PEREZ-CARRILLO, E.; CHUCK-HERNANDEZ, C. Elsevier. **Journal of Cereal Science.**, vol.50, p. 131-137, 2009.

SESSITSCH, A.; HOWIESON, J. G.; PERRET, X.; ANTOUN, H.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Advances in Rhizobium Research. **Crit Rev Plant Sci**, v. 21, p. 323-378, 2002.

SETUBAL, J. C. The Genomics of Agrobacterium: Insights into its Pathogenicity, Biocontrol and Evolution. Plant Pathogenic Bacteria: Genomics and Molecular Biology. **Caister Academic Press**, 2009.

SILVA, G. **Aproveitamento biotecnológico de resíduos agroindustriais na produção de glicoamilase**. Dissertação de Mestrado, Universidade Regional de Blumenau, Blumenau, Santa Catarina, 95p. 2006.

SINGH, A.P.; SINGH, J.B. Differences in α and β -glucosidase and β -galactosidase activity among fast and slow-growing species of *Rhizobium* and *Agrobacterium tumefaciens*. **Microbios**, v. 43, n. 2, p. 169-176, 1985.

SPIER, M.R. **Produção de enzimas amilolíticas fúngicas α -amilase e amiloglicosidase por fermentação no estado sólido**. Dissertação de Mestrado em Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal do Paraná. Curitiba. 178 p. 2005.

SUDHARHSAN, S.; SENTHILKUMAR, S.; RANJITH, K. Physical and nutritional factors affecting the production of amylase from species of *Bacillus* isolated from spoiled food waste. **Afr. J. Biotechnol.**, 6:430-435, 2007.

SUMERLY, R.; ALVAREZ, H.; CEREDA, M.P.; VILPOUX, O.F. Hidrólise do amido
In: CEREDA, M. P. VILPOUX, O. (Eds). Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas. Vol. 3. Fundação Cargill, São Paulo, SP. p. 377-448. 2003.

TEAGUE, W.M.; BRUMM, P.J. **Starch Hydrolyzed Products**; Schenk, F. W.; Hebeda, R. E, eds.; VCH Publishers: New York, 1992.

TEODORO, C.E.S.; MARTINS, M.L.L. Condições de cultura para produção de amilase termoestável por *Bacillus* sp. **Braz. J. Microbiol.**, 31(4):298-302. 2000.

The Catalytic Site Atlas at The European Bioinformatics Institute (<http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/CSA/>) (Acesso em 04 Abril 2007).

THOMAS, D.J.; ATWELL, W.A. Starch Structure. *In: Starch: practical guides for the food industry*. St. Paul, Minnesota, Eagan Press. Cap. 1, p. 1-11, 1999.

THURLKILL, R.L.; GRIMSLEY, G.R.; SCHOLTZ, J.M., PACE, C.N. Hydrogen bonding markedly reduces the pK of buried carboxyl groups in proteins, **J Mol Biol.** 362, 594-604, 2006.

UEDA, K.; SEKI, T.; KUDO, T.; YOSHIDA, T.; KATAOKA, M. Two distinct mechanisms cause heterogeneity of 16S rRNA. **J. Bacteriol.**, 181, 78-82, 1999.

VAN BEILEN, J.B. Enzyme technology: an overview. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 14, n. 4, p. 338-344, 2002.

VAN SPRONSEN, P.C.; BAKHUISEN, R.; VAN BRUSSEL, A.A.N.; KIJNE, J.W. Cell wall degradation during infection thread formation by the root nodule bacterium *Rhizobium leguminosarum* is a two-step process. **Eur. J. Cell Biol.**, v. 64, n. 1, p. 88-94, 1994.

VIEILLE, C.; ZEIKUS, G. J.; Hyperthermophilic Enzymes: Sources, Uses, and Molecular Mechanisms for Thermostability. **Microb. Mol. Biol. Rev.** 65, 1, 2001.

WEON, H. Y.; LEE, C. M.; HONG, S. B.; KIM, B. Y.; YOO, S. H.; KWON, S. W.; GO, S. J. *Kaistia soli* sp. Nov., isolated from a wetland in Korea. **International Journal Systematics Evol. Microbiology**, vol. 58, p. 1522-1524, 2008.

WILLIAMS, D.C.; JONES, J.G. Dissociation and catalysis in yeast hexokinase A, **Biochem J.** 155, 661-667, 1976.

ZANIN, G.M. **Sacarificação de Amido em Reator de Leito Fluidizado com Enzima Amiloglucosidase Imobilizada.** Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo. 187p. 1989.

8. ANEXO

Meio de cultura Luria-Bertani (LB) contendo amido a 1%

-Peptona 1%

-Extrato de levedura 0,5%

-NaCl 1%

-Agar 1,5%

-Amido solúvel 1%