

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

JANE GLEIDE ROSADO DE JESUS

**SELEÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE CEPAS
BACTERIANAS PRODUTORAS DE AMILASES
ISOLADAS DA MICROBIOTA ASSOCIADA A RESÍDUOS
AGRÍCOLAS DE CACAU E DENDÊ**

Salvador
2013

JANE GLEIDE ROSADO DE JESUS

**SELEÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE CEPAS
BACTERIANAS PRODUTORAS DE AMILASES
ISOLADAS DA MICROBIOTA ASSOCIADA A RESÍDUOS
AGRÍCOLAS DE CACAU E DENDÊ**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia como requisito para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Dr^a. Samira Abdallah Hanna
Co-orientadora: Dr^a Astria Dias Ferrão Gonzales

Salvador
2013

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Universitária de
Saúde, SIBI - UFBA.

J58 Jesus, Jane Gleide Rosado
Seleção e identificação de cepas bacterianas produtoras de
amilases isoladas da microbiota associada a resíduos de cacau e
dendê / Jane Gleide Rosado de Jesus. – Salvador, 2013.
77 f.

Orientador: Prof^ª. Dr^ª Samira Abdallah Hanna

Co-orientador: Prf^ª. Dr^ª Astria Dias Ferrão Gonzales

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia.
Instituto de Ciências da Saúde, 2013.

1. Enzimas 2. Micro-organismos 3. Biomassa. 4. Amilase.
I. Hanna, Samira Abdallah. II. Ferrão-Gonzales, Astria Dias.
III. Universidade Federal da Bahia. IV. Título.

CDU 577.15

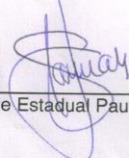
JANE GLEIDE ROSADO DE JESUS

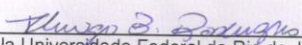
**SELEÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS
PRODUTORES DE AMILASES ISOLADOS DA
MICROBIOTA ASSOCIADOS A RESÍDUOS AGRÍCOLAS
DE CACAU E DENDÊ**

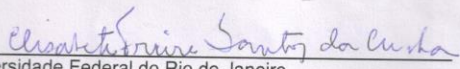
Dissertação apresentada como requisito para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia, Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia.

Aprovada em 31 de julho de 2013.

BANCA EXAMINADORA:

Samira Abdallah Hanna – Orientadora 
Doutora em Doenças Tropicais pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho,
UNESP, Brasil,
Universidade Federal da Bahia.

Thiago Bruce Rodrigues 
Doutor em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Rio de Janeiro,
UFRJ, Brasil
Faculdade de Tecnologia e Ciências de Salvador.

Elisabete Freire Santos da Cunha 
Doutora em Química Biológica pela Universidade Federal do Rio de Janeiro,
UFRJ, Brasil,
Universidade Federal do Rio de Janeiro.

A Deus, meu inspirador e protetor, pela força: ontem, hoje e sempre.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe Janete Caldeira, que sempre me apoiou e incentivou, especialmente nos momentos mais difíceis. Agradeço por ter sido a mãe dos meus filhos, nos momentos em que estive envolvida com o trabalho e com o estudo.

Ao meu esposo Adriano, pelo amor incondicional, por compreender a minha ausência e pelo apoio durante minhas lutas.

Aos meus filhos Samuel e Daniel, por toda demonstração de carinho e principalmente por preencherem a minha vida com momentos de alegria.

Aos meus pastores Ademir e Vânia, por compreenderem minhas faltas nos cultos e em outras atividades da Igreja. Agradeço pelas orações que fizeram por mim. Tenho certeza que muito contribuíram ao longo da minha jornada.

À minha orientadora Samira Abdallah Hanna, pelo voto de confiança e por ter aceitado o desafio dessa orientação tão peculiar. Agradeço sinceramente, pela paciência, pela dedicação e principalmente pelo bom humor nos momentos difíceis.

À professora Astria Dias Ferrão e ao professor Vitor Hugo Moreau por terem me envolvido na pesquisa e despertado em mim a paixão por esse projeto. Obrigada pela oportunidade de trabalhar na área de Biotecnologia.

Ao professor Thiago Bruce, pela ajuda na identificação taxinômica das cepas bacterianas, pelo apoio e paciência. Agradeço as discussões e contribuições científicas.

À professora Elisabete Freire pelo auxílio na construção do artigo e na correção deste manuscrito.

Ao professor Luiz Cesar Paulillo pela ajuda técnica relacionada aos experimentos de Biologia Molecular.

À professora Alessandra Argolo, minha professora e chefe, pela compreensão e incentivo. Obrigada por apoiar meu crescimento profissional e pessoal.

À Mônica Bonfim, por ter cedido os resíduos de cacau e dendê da Fazenda Juerana.

As minhas amigas Maria Aparecida Castro, Patricia Campos e Gladssinay Lessa, pela amizade, apoio e companheirismo durante esta trajetória. Cida, meu braço direito. Glads e Patty incansáveis na ajuda. Valeu por tudo meninas!

A toda a equipe do LBI (Laboratório de Biotecnologia Industrial). Agradeço especialmente aos colegas Bernado, Eduardo, Ismael, Pedro, Carolaine, Ana Camila, Camila, Fernanda, Ilvânia, Tamires e Iara pelo apoio e pelos momentos de alegria.

Aos meus colegas da FTC (Faculdade de Tecnologia e Ciências): Mônica Aragão, Josemar Freitas, Graciane Maria, Anaide Meneses, Leiliane Paixão, Robson Araújo, Neila da Hora, Genimar Gomes e Regina Maria. Todos vocês foram importantes para essa conquista.

À FAPESB, pelo suporte financeiro concedido para a realização deste trabalho.

Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o
melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas graças a Deus, não sou o
que era antes.
(Martin Luther King)

Rosado de Jesus, Jane Gleide. Seleção e identificação de cepas bacterianas produtoras de amilases isoladas da microbiota associada a resíduos agrícolas de cacau e dendê. 77 f. il. 2013. Dissertação (Mestrado). Instituto de Ciências da Saúde. Universidade Federal da Bahia, Salvador 2013.

RESUMO

As enzimas são ferramentas importantes no estabelecimento de processos tecnologicamente limpos. As hidrolases constituem um dos mais importantes grupos de enzimas com aplicações em diferentes setores industriais. Os micro-organismos, principal fonte de enzimas industriais, apresentam limitações quanto à produtividade. Dessa forma, a identificação de novas fontes para obtenção em larga escala de enzimas torna-se relevante. Objetivou-se, nesse trabalho, investigar a possibilidade de obtenção de enzimas amilolíticas a partir de resíduos agrícolas das lavouras cacauzeira e dendeneira. A restrição de substrato no meio de cultivo foi utilizada para a triagem inicial de microrganismos produtores de amilase, lipase e celulase. Entre as cepas isoladas, quatro delas apresentaram atividade amilolítica relevante com Índice Enzimático (IE) superior a 2.0. A extração, sequenciamento e análise filogenética do gene ribossomal bacteriano 16S permitiu a identificação das seguintes cepas com atividade amilolítica: *Paenibacillus tundrae*, *Xanthomonas cordiaei*, *Bacillus subtilis*, *Acinetobacter baumannii*. *P. tundrae* (cepa dende1c) e *X. cordiaei* (cepa cacau1a) foram as mais promissoras apresentando IE 9,0 e 14,0 respectivamente. Essas cepas foram cultivadas em meio líquido e tiveram a atividade amilolítica monitorada em solução. Esses dados demonstram que os micro-organismos selecionados são promissores para obtenção de enzimas com potencial para aplicação na indústria.

Palavras-chave: Enzimas, amilases, micro-organismos, agroresíduos

Rosado de Jesus, Jane Gleide. Selection and identification of bacterial strains producing amylase isolated from the microbiota associated with agricultural waste cocoa and palm oil. 77 pp. ill. 2013. Master Dissertation. Instituto de Ciências da Saúde. Universidade Federal da Bahia, Salvador 2013.

ABSTRACT

Enzymes are important tools in establishing clean industrial processes. Hydrolases are the main group of enzymes with applications in many industrial sectors. Most enzymes applied to industry are isolated from micro-organisms and identification and characterization of microbial systems that are able to produce enzymes in large scale are of pivotal importance. This work aimed to screen, characterize and produce hydrolytic enzymes from residual biomass from cocoa and palm cultures. Carbon source limitation was used in order to screen micro-organisms for the production of amylase. Four bacterial accesses showed relevant amylolytic activity with Enzymatic Index (SI) greater than 2.0. Sequency of the 16S rRNA gene allowed the identification of the following species with amylolytic activity: *Paenibacillus tundrae*, *Xanthomonas cordiaei*, *Bacillus subtilis* and *Acinetobacter baumannii*. *P. tundrae* (Strain Dende1c) and *X. cordiaei* (Strain Cacau1a) were the most promising strains with EI 9,0 and 14,0 respectively. These strains were grown in liquid medium and had the amylase activity monitored in solution. These data demonstrate that selected micro-organisms are promising for obtaining enzymes with the potential for industrial application.

Keywords: enzymes, amylase, microorganisms, residual biomass

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Forma estrutural do amido.....	24
Figura 2:	Estrutura química da amilose e da amilopectina.....	24
Figura 3:	Classificação das enzimas amilolíticas.....	25
Figura 4:	Estrutura tridimensional da α -amilase organizada em 3 domínios A, B e C	27
Figura 5:	Estrutura tridimensional da α -amilase de <i>Bacillus subtilis</i> complexada com arcabose.....	29
Figura 6:	Mecanismo catalítico das α -amilases.....	30
Figura 7:	Cacau – (<i>Theobroma cacao</i>).....	39
Figura 8:	Dendzeiro (<i>Elaeis guineenses</i>).....	41
Figura 9:	Consumo Mundial dos principais óleos vegetais.....	42
Figura 10:	Resíduos de cacau e dendê.....	44
Figura 11:	Enriquecimento da amostra.....	45
Figura 12:	Isolamento de bactérias em placas contendo 1% de amido como substrato.....	45
Figura 13:	Pré-inóculo em meio contendo 1%amido.....	50
Figura 14:	Dosagem dos açúcares redutores pelo método DNS.....	52
Figura 15:	Atividade amilolítica de cepas isoladas de resíduos de cacau e dendê.....	55
Figura 16:	Eletroforese dos produtos de PCR purificados das cepas com atividade amilolítica.	57
Figura 17:	Identificação taxonômica das cepas isoladas dos resíduos de cacau e dendê.....	58
Figura 18:	Variação da concentração de amido nos meios em função do tempo.....	60
Figura 19:	Variação da concentração de açúcares redutores nos meios em função do tempo.....	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 01	Atividade amilolítica de cepas bacterianas isoladas da casca ou polpa de cacau e dendê	53
Tabela 02	Índice enzimático das cepas amilolítica dos resíduos do cacau e dendê medidos a cada 24 horas.....	55
Tabela 03	Identificação morfológica e coloração de Gram das cepas que apresentaram atividade amilolítica.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGROPALMA: Complexo Agroindustrial de Plantio de Palma

CaCl₂: Cloreto de Cálcio

CBM: Módulo de ligação com o Amido

CEPLAC: Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira

Co: Cobalto

DENPASA: Departamento Estadual de Pavimentação e Saneamento.

DGGE: Denaturing Gradient Gel Electrophoresis

DNA: Ácido Desoxirribonucléico

DNS: Ácido Dinitrosalissílico

EC: Enzyme Commission (Comissão de Enzimas)

EMBRAPA: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

FAO: Food and Agriculture Organization

FES: Fermentação em Estado Sólido

FS: Fermentação Submersa

FTC: Faculdade de Tecnologia e Ciência

g: grama

I₂: Iodo

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

ICS: Instituto de Ciência da Saúde

K₂HPO₄: Fosfato de Potássio

KDa: Kilodalton

KI: Iodeto de Potássio

L: litro

LBI: Laboratório de Biotecnologia Industrial

M: Molar

MDIC: Ministério de Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior

mL: Mililitro

mm Milímetro

N: Normal

Na₂HPO₄: Fosfato de sódio

NaOH: Hidróxido de Sódio

NH₄Cl: Cloreto de Amônio

PA: Pará

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

RDP: Ribosomal Database Project

RNA: Ácido Ribonucléico

RPM: Rotações por Minuto

SDD: Domínio de ligação com o amido

SUDAM: Superintendência de Desenvolvimento da Amazônia

t: Tonelada

TAE: Tris Acetato EDTA

UFBA: Universidade Federal da Bahia

A: Alfa

B: Beta

μL: Microlitro

SUMÁRIO

01. INTRODUÇÃO	16
02. OBJETIVOS	19
03. REVISÃO DE LITERATURA	20
3.1 ENZIMAS.....	20
3.2 ENZIMAS AMIOLÍTICAS.....	23
3.2.1 α -amilase.....	26
3.2.2 β -amilase.....	31
3.2.3. Amiloglucosidase.....	32
3.3. PRODUÇÃO DE ENZIMAS MICROBIANAS.....	33
3.4. TAXONOMIA APLICADA A IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS.....	35
3.5. APROVEITAMENTO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS	38
3.5.1. Cacau (<i>Theobroma cacao</i>).....	39
3.5.2. Dendê (<i>Elaeis Guineensis</i>).....	40
4. MATERIAL E MÉTODOS	43
4.1. COLETA E PREPARAÇÃO DOS RESÍDUOS DE CACAU E DENDÊ.....	44
4.2. ENRIQUECIMENTO DAS AMOSTRAS.....	44
4.3. PLAQUEAMENTO E ISOLAMENTO DAS CEPAS MICROBIANAS.....	45
4.4. CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE AMIOLÍTICA.....	46
4.5. IDENTIFICAÇÃO PELO MÉTODO DE GRAM.....	46
4.6. IDENTIFICAÇÃO DAS CEPAS BACTERIANAS POR TIPAGEM GENÉTICA	46
4.6.1 Extração de DNA.....	47
4.6.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	48

4.6.3 Sequenciamento.....	48
4.6.4 Reconstrução Filogenética.....	49
4.7. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE HIDROLÍTICA.....	50
4.7.1 Dosagem da concentração de amido.....	51
4.7.2 Dosagem da concentração de Açúcares Redutores.....	51
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
5.1. SELEÇÃO DAS CEPAS.....	53
5.2. IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA DAS CEPAS	56
5.3. IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA DAS CEPAS.....	56
5.4. CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE AMIOLÍTICA EM MEIO LÍQUIDO...	59
5.5. QUANTIFICAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES.....	61
6. CONCLUSÃO	63
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
8. ANEXO 01	78

1. INTRODUÇÃO

Desde o surgimento das primeiras civilizações as enzimas, proteínas que atuam como catalisadores biológicos em diversos processos metabólicos (LEHNINGER et al., 2007), vêm sendo utilizadas na produção de alimentos, como vinho, queijo e pães. Portanto, a utilização biotecnológica das enzimas foi estabelecida previamente à obtenção de conhecimentos a respeito da natureza e dos mecanismos moleculares nos quais se encontram envolvidas (SPIER, 2005).

Os conhecimentos sobre a constituição e função protéica permitiram a aplicação das enzimas em diversos processos biotecnológicos da atualidade (LEADLEY 1993). Elas são utilizadas nas indústrias têxteis, de papel e celulose, de couro, detergentes, cervejas, bebidas fermentadas, panificação, cereais para alimentação infantil, ração animal, indústria de fermentação (vitaminas, aminoácidos, antibióticos) (GUPTA et al., 2003; SURMELY et al., 2003; TUNGA & TUNGA, 2003; SZAKACS, 2004; PANDEY et al., 2005; SOCCOL et al., 2005; SPIER, 2005).

A crescente utilização das enzimas em processos industriais faz com que o mercado mundial de enzimas movimente anualmente uma quantia superior a US\$ 6 bilhões, com perspectiva de crescimento acelerado (MDIC, 2012). Entre as enzimas já produzidas e comercializadas, as amilases, que catalisam a hidrólise do amido, estão entre as classes que são de grande interesse biotecnológico, devido à sua ampla aplicação em vários campos, incluindo a química clínica, produção de medicamentos, indústria têxtil, produção de papel, indústria de alimentos, liquefação do amido e produção de açúcar (PANDEY, 2000; SPIER, 2008).

As amilases podem ser encontradas em animais, plantas e micro-organismos. No entanto, as produzidas por micro-organismos têm preferência no mercado de enzimas devido às vantagens que oferecem, como menor tempo de produção (REDDY, 2003), ampla diversidade bioquímica e susceptibilidade à manipulação genética (KIRK, 2002).

Uma variedade de micro-organismos é capaz de produzir enzimas, através da fermentação, em condições experimentais definidas. Entretanto, a quantidade de enzima produzida, na maioria dos casos investigados, inviabiliza

a transposição do processo para escala industrial (OLIVEIRA et al., 2007). Além disso, para a ocorrência do crescimento microbiano e conseqüentemente a produção de enzimas é preciso o enriquecimento do meio de cultivo com moléculas específicas como: dextrina, lactose, maltose, etc. que aumentam consideravelmente o custo do processo. Dessa forma, a identificação de micro-organismos que produzam quantidades apreciáveis de enzimas, bem como a busca por meios de cultivo de baixo custo, torna-se oportuna para aperfeiçoar a produção industrial de enzimas de interesse biotecnológico, gerando economia no processo produtivo (OLIVEIRA et al., 2007).

O Brasil ainda importa a maior parte das enzimas que utiliza em diferentes setores industriais, embora possua a agricultura como uma das principais bases da economia do país e apresente grande diversidade biológica que poderiam ser exploradas para a obtenção de organismos produtores de enzimas de interesse industrial (BON et al., 2008). Em geral, as culturas agrícolas produzem uma quantidade de sobras muito maior do que a parte utilizada para fins alimentícios ou industriais. Dessa forma, a geração de resíduos, neste setor produtivo, ainda tem proporcionado sérios problemas ambientais como poluição de solo, de águas superficiais e de águas subterrâneas (GASQUES e BASTOS, 2003; VARGAS, 2004). O crescimento do setor agrícola tem como conseqüência a intensificação do impacto ambiental e social decorrente da geração de resíduos (GRAMINHA et al., 2008).

A literatura aponta a utilização de resíduos agrícolas em diversos processos biotecnológicos (MONDAL, 2006). O bagaço da cana de açúcar, por exemplo, tem sido apontado como substrato sólido para a produção de enzimas amilolítica microbianas através da Fermentação em Estado Sólido (SPIER, 2005). A investigação do potencial dos resíduos agroindustriais para geração dos produtos biotecnológicos com alto valor agregado, além de tornar sustentável a produtividade agrícola ainda pode melhorar a qualidade de vida da população rural, gerando efeitos ambientais e sociais. Nesse trabalho, investigou-se a possibilidade de obtenção de enzimas hidrolíticas a partir de resíduos agrícolas das lavouras cacauzeira e dendazeira.

O dendê, (*Elaeis guineensis*) e o cacau, (*Theobroma cacao*), originários da África e da América Central, respectivamente, são produtos agrícolas

importantes da região sul da Bahia. O fruto do dendê produz o óleo de dendê ou de palma com ampla utilização na culinária, tendo inclusive reconhecimento internacional (EMBRAPA, 2007). O fruto do cacauero constitui-se em matéria prima básica no fabrico do chocolate (EMBRAPA, 2004). Dessa forma, quantidades significativas de resíduos das lavouras dendezeiras e cacaueras são abandonadas nas plantações sendo utilizados como fertilizantes. Essa prática possibilita propagação de pragas que, conseqüentemente, obriga o produtor rural a fazer o uso de defensivos agrícolas, geralmente altamente poluentes, afetando o solo e agredindo o meio ambiente (BETTIOL, 2009).

Outra destinação possível, e talvez mais viável, para estes resíduos, seria a utilização dos mesmos como substratos para o cultivo de micro-organismos autóctones produtores de enzimas de interesse industrial. A identificação desses micro-organismos constitui-se em etapa inicial para o emprego alternativo dos resíduos. A seleção de cepas de micro-organismos que produzam enzimas amilolítica em quantidades elevadas pode consistir em opção para substituição às enzimas comerciais, convencionalmente utilizadas, gerando redução dos custos envolvidos na produção e aumentando a viabilidade econômica do processo.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

O objetivo deste trabalho foi selecionar bactérias produtoras de enzimas amilolíticas obtidas a partir do isolamento da microbiota presentes em resíduos das lavouras cacaueteira e dendezeira com finalidade de aplicação industrial.

2.2 Específicos

- Isolar cepas bacterianas a partir de resíduos das lavouras cacaueteira e dendezeira,
- Caracterizar a atividade amilolítica de cepas bacterianas isoladas,
- Quantificar a atividade amilolítica de cepas bacterianas isoladas,
- Identificar taxonomicamente os isolados potenciais produtores de amilases.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Enzimas

As enzimas são proteínas que atuam como biocatalisadores. Aceleram a velocidade de uma reação química termodinamicamente possível, reduzindo a barreira energética da reação (HARGER, 1982). São essenciais no metabolismo, ocorrendo em todos os organismos vivos, desde os mais simples aos mais desenvolvidos (LEADLAY, 1993).

Os mecanismos de ação dos catalisadores biológicos só recentemente foram elucidados, sendo precedido por uma série observações de diferentes pesquisadores que gradativamente permitiram a construção dos conhecimentos atualmente disponíveis.

Contribuições importantes foram fornecidas pelos estudos de Jean Batiste Van Helmont. No século XVII, Van Helmont ao analisar a transformação dos alimentos como um processo químico, identificou a necessidade de substância as quais designou de fermentos (KIELING, 2002). Em 1814, Kirchof, utilizando as enzimas presentes no extrato de trigo, demonstrou que a degradação do amido resultava em moléculas de glicose. Em 1833, Johan Kjeldahl, um químico dinamarquês, desenvolveu um método analítico para detectar nitrogênio no estado trinegativo em certos compostos orgânicos. Este método fundamentou a enzimologia quantitativa e é utilizado amplamente na quantificação de proteínas em alimentos (PARIZA, 2002).

Em 1836, investigando processos digestivos, o fisiologista alemão Theodor Schwann conseguiu isolar a Pepsina a partir de tecido animal, de estômago humano. Por volta de 1860 o cientista Von Liebig defendia a ideia de que a fermentação resultasse de um processo químico comum, no qual os “fermentos” fossem materiais não vivos. Louis Pasteur, um cientista francês, defendia a idéia contrária, de que a fermentação só ocorreria na presença de organismos viáveis (KIELING, 2002).

Em 1897, com o trabalho dos irmãos Buchner, químicos alemães, que demonstraram que o extrato de levedura livre de células podia converter glicose em etanol e dióxido de carbono, exatamente como células de levedura

vivas. Essa descoberta resolveu o impasse entre Liebig e Pasteur (ENZIMA, 2009).

O botânico, micologista e microbiólogo Emil Chr. Hansen, no decorrer do mesmo ano, 1987, descobriu e desenvolveu um método para propagar leveduras. Seu método tornou possível produzir culturas puras de leveduras e é utilizado na atualidade em processos industriais de fermentação (PARIZA, 2002).

Em 1926, foi observado pela primeira vez que as enzimas eram proteínas, depois de se isolar e caracterizar uréase de extratos de feijão. Posteriormente, também foram isoladas e caracterizadas a pepsina e a tripsina. A natureza protéica das enzimas foi aceita em 1930 na seqüência dos trabalhos de James Summer, de John Northrop e Moises Kunitz que demonstraram correlação direta entre a atividade catalítica de preparações purificadas de enzimas digestivas e o seu conteúdo protéico (LEHNINGER, 1976).

Grandes avanços na tecnologia das enzimas ocorreram em meados da década de 1950. O progresso no conhecimento da bioquímica deu origem a uma compreensão mais ampla da grande variedade de enzimas presentes nas células vivas e de seu modo de ação (ENZIMAS, 2005).

As enzimas são classificadas em grupos, em função do tipo de reação que catalisam, sendo: oxidorreduções (catalisam reações de óxido-reduções), transferases (catalisam reações de transferência de grupos de uma molécula a outra), hidrolases (catalisam reações de hidrólise), liases (catalisam reações de quebra de ligações), isomerases (catalisam reações de mudança intramolecular, onde um substrato transforma-se em um produto isômero) e ligases (catalisam a ligação covalente de moléculas, com simultânea quebra de uma ligação de alta energia) como determinado pela International Union of Biochemistry (SANT'ANNA et al., 2001). A nomenclatura é definida adicionando-se a terminação ase ao nome do substrato ao qual se ligam, como por exemplo: as uréases são enzimas que controlam a decomposição da uréia; as proteases são enzimas que controlam a hidrólise de proteínas, assim como as amilases, são as enzimas que hidrolisam o amido. Algumas enzimas como as proteases tripsina e pepsina, conservaram os nomes utilizados antes que se adotasse esta nomenclatura (PASTORE, 2010).

Por serem extremamente sensíveis, as enzimas necessitam de condições específicas para atuarem corretamente. Os fatores que podem influenciar na atividade enzimática são: a concentração de substrato, o pH e a temperatura. Devido a suas características químicas, as enzimas são ativas em uma faixa estreita de pH. Comparadas aos catalisadores químicos, as enzimas agem sob condições relativamente brandas em termos de temperatura e de acidez (VOET, 2006).

As enzimas podem ser obtidas de fontes animais (amilase pancreática, lipase pancreática, pancreatina, pepsina, quimosina), de fontes vegetais (α -amilase, β -amilase, bromelina, ficina e papaína) ou produzidas por microorganismos, sendo as produzidas por microorganismos, comumente empregadas para fins biotecnológicos (PANDEY, 2005; LEHNINGER, 2007).

A partir de 1980, as empresas produtoras de enzimas vêm empregando técnicas de modificação genética para aprimorar a eficiência e a qualidade da produção e para desenvolver novos produtos (WANDERLEY et al., 2011). A quimosina recombinante foi à primeira enzima derivada de fonte geneticamente modificada a receber aprovação para uso alimentar na Suíça em 1988 e nos Estados Unidos em 1990 (ENZIMAS, 2005).

A utilização de enzimas em processos industriais vem se expandindo consideravelmente, embora, este campo ainda possa crescer muito devido à implementação de novas enzimas em outros ramos das indústrias, o que permite a oportunidade de desenvolvimento de novas tecnologias (WANDERLEY et al., 2011).

O desenvolvimento do mercado de enzimas é um bom exemplo de aplicação da biotecnologia em nosso cotidiano. Os principais produtores são oriundos da Europa: a Novo Nordisk (Dinamarca), Gist-Brocades (Holanda) e Genecor International (Finlândia). Destas, a Novo Nordisk detém uma percentagem de aproximadamente 50% do mercado mundial de enzimas industriais (LEMOS, 2006).

As enzimas são aplicadas atualmente em diversos setores industriais, incluindo as indústrias de alimentos, papel, têxtil e farmacêutica (PANDEY, 2005). Entre as diversas vantagens da utilização das enzimas, destaca-se o fato de ser um produto natural, que apresenta um alto grau de especificidade nas reações, contribuindo para a eficiência do processo, e ainda, por

apresentar a atividade que pode ser regulada, atuando em baixas concentrações e sob condições brandas de pH e temperatura (BON et al., 2008).

Atualmente, cerca de 3.000 enzimas identificadas constam na lista da Enzyme Commission (EC). Entretanto, apenas 60 delas possuem aplicação industrial (WANDERLEY et al., 2011). Cerca de 80% das enzimas utilizadas na indústria correspondem a hidrolases (COELHO, 2008). As enzimas proteolíticas lideram a produção mundial em escala industrial, seguidas das enzimas amilolítica, entre as quais as amilases, que hoje atingem uma média de 29% dessa produção (NGUYEN et al., 2002).

3.2. Enzimas Amilolíticas

As enzimas amilolíticas são responsáveis pela degradação das moléculas de amido (Figura 1). O amido consiste na principal fonte de carboidratos na alimentação humana, representando cerca de 50-55% na dieta. Para os vegetais superiores funciona como substância de reserva. Os depósitos do amido nas plantas ocorrem em órgãos especializados em reserva energética como os grãos nos cereais e tubérculos em raízes (BEMILLER, 1997). O amido é um homopolissacarídeo de glicose formado por dois polissacarídeos muito semelhantes, a amilose e a amilopectina (Figura 2). A amilose é formada por cadeias lineares helicoidais de resíduos de glicose unidos por ligações glicosídicas α -1,4 enquanto a amilopectina apresenta estrutura altamente ramificada possuindo resíduos de glicose unidos por ligações glicosídicas α -1,4 das quais partem ramificações unidas por ligações α -1,6. As cadeias da amilopectina, normalmente apresentam uma distribuição bimodal, com longas e curtas cadeias tendo uma média de 40 a 60 e 11 a 25 resíduos de glicose, respectivamente (LEHNINGER et al., 2002). A amilose e a amilopectina ocorrem em proporções que variam entre as diferentes espécies de origem e de acordo com o grau de maturação da planta. O amido isolado dos vegetais é composto, essencialmente pelos polímeros de α -D-glicose, mas também pode apresentar componentes menores provenientes de diversas fontes, tais como, o material no interior dos amiloplastos (onde os grânulos são

formados) e de sua membrana limitante, e do material depositado sobre a superfície dos grânulos durante a desintegração do tecido ou pelos procedimentos de extração do amido (HORIMOTO e CABELLO, 2007).

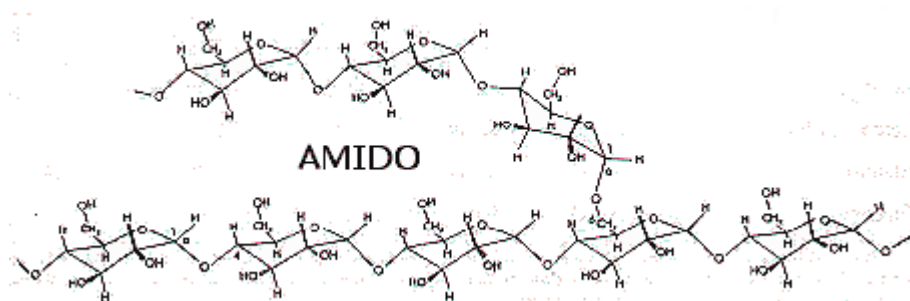


Figura 1: Forma estrutural do amido. (Retirado de NUNES et al., 2006)

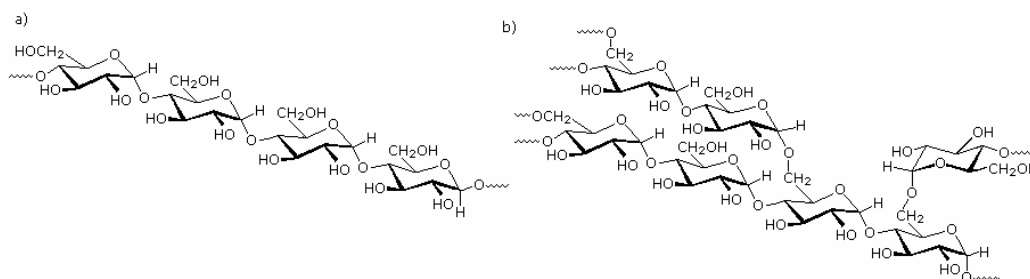


Figura 2: a) Estrutura química da amilose. b) Estrutura química da amilopectina. (Retirado de NUNES et al., 2006)

Por suas propriedades químicas, o amido é amplamente utilizado nas indústrias do setor alimentício, podendo servir, entre outras funções, como espessante, facilitador do processamento, texturizante, fornecedor de sólidos em suspensão e protetor dos alimentos durante o processamento (CEREDA, 2001). Além disso, aproximadamente, um terço da produção de amido é usado em indústrias de papel, embalagens e tecidos, que o utilizam como adesivos ou como aglutinante de fibras. Entretanto, é na produção de glicose que o amido processado é mais utilizado (BIGELIS, 1993).

Desde o início do século passado o mercado industrial começou a demonstrar interesse na produção de glicose a partir de materiais amiláceos,

impulsionando assim, as pesquisas para produção de amilases. Atualmente, a maioria das amilases utilizadas nas indústrias de alimentos, bebidas, químicas, farmacêuticas, papel e celulose, têxtil, entre outras, são de origem microbiana.

Sendo disponíveis comercialmente, as amilases microbianas têm aplicação quase completa na hidrólise do amido em indústrias que processam este polímero (PANDEY et al., 2005). São divididas em dois grupos: as endoamilases e as exoamilases. As endoamilases catalisam hidrólises de forma aleatória no interior da molécula do amido. Essa ação causa a formação de ramos lineares de oligossacarídeos com cadeias de vários comprimentos. Dessa forma quebram as ligações glicosídicas α -1,4 presentes na parte interna das cadeias de amilose ou amilopectina. As exoamilases hidrolisam exclusivamente ligações glicosídicas α -1, 4, como a β -amilase ou as ligações α -1,4 e α -1, 6, como amiloglicosidase e glicosidase. Outros exemplos de exoamilases são a ciclodextrina glicosiltransferase e a α -amilase maltogênica (MAURER, 2003).

Para a conversão eficiente do amido em compostos de baixa massa molecular, é necessária uma ação coordenada das enzimas citadas anteriormente. Costa (1996) apresenta um esquema (Figura 3) para identificar e classificar as enzimas amilolíticas.

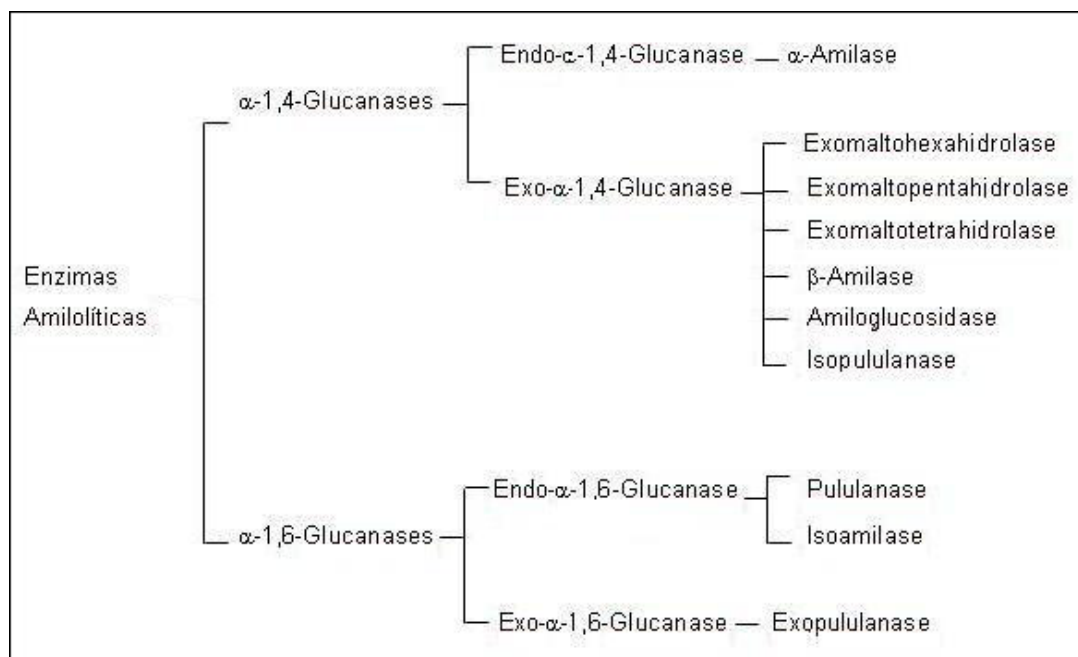


Figura 3: Classificação das enzimas amilolítica. Fonte: Costa, 1996 (Retirado de SPIER, 2005).

3.2.1. α -amilase

As α -amilases são enzimas que quebram as ligações α (1,4) dos polissacarídeos. Essa hidrólise ocorre de forma não seletiva sobre vários pontos da cadeia simultaneamente, sendo que os primeiros produtos da hidrólise são sempre oligossacarídeos de 5 a 7 unidades de glicose. Ocorre quebra preferencial em pontos da hélice, da cadeia espiral da amilose ou da α (1,4) da amilopectina (JUGE et al., 2006). Portanto, a alfa-amilase é uma endoenzima que hidrolisa ligações O-glicosídicas α (1-4), produzindo oligossacarídeos que contêm ligações α (1-6), além de glicose e maltose. As ligações α (1-6) não são quebradas pela alfa-amilase (GEORG-KRAEMER et al., 2000; MACGREGOR et al., 2001; XIAO et al., 2006; ENEJE et al., 2004; ADEWALE et al., 2006).

As amilases são essenciais na digestão dos alimentos, como as amilases salivar e pancreática, na germinação de grãos e no crescimento microbiano (HIZUKURI, 1996). Agem, isoladamente ou simultaneamente, com outras enzimas amilolítica, apresentando importantes aplicações na indústria de alimentos, bebidas e na obtenção de produtos têxteis e farmacêuticos (MOREIRA et al., 1999).

Apesar de nos últimos anos as α -amilases bacterianas terem recebido mais atenção dos pesquisadores devido à sua maior termoestabilidade, a liquefação do amido catalisada por estas enzimas tem se constituído na unidade operacional mais cara do processo de sacarificação, principalmente por serem produzidas por fermentação submersa (SOUZA et al., 1996). Assim, no campo da biotecnologia pesquisas sobre a produção de α -amilases termoestáveis de menor custo, são recomendadas (SOUZA et al., 1996).

As α -amilases podem ser encontradas nos mamíferos, vegetais superiores, fungos, bactérias e crustáceos. A α -amilase cristalina pode ser preparada a partir do sangue e pâncreas humanos, pâncreas do rato, cevada malteada, algumas espécies do gênero *Aspergillus*, *Pseudomonas saccharophila*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus stearothermophilus*, enquanto as enzimas purificadas são obtidas de sorgo malteado, soja, trigo maltado, pâncreas de alguns pássaros como o pombo

além de crustáceos como o caranguejo. Alguns insetos também produzem isoformas de α -amilase (BRENA et al., 1996). Segundo Prakash e Jaiswal (2010), essas enzimas possuem a estrutura tridimensional altamente conservada.

A estrutura básica das α -amilase consiste em uma cadeia polipeptídica única dobrada em três domínios A, B e C (Figura 4). O domínio catalítico A é o mais conservado em todas as famílias de α -amilases. Ele consiste em um barril $(\alpha/\beta)_8$ N-terminal apresentando dobramento altamente simétrico de oito fitas- β paralelas e arranjadas em um barril circulado por oito α -hélices. Este barril é conhecido como barril TIM, pois foi observado pela primeira vez na triose fosfato isomerase (TIM) de músculo de galinha que está presente em várias outras proteínas (BANNER et al., 1975).

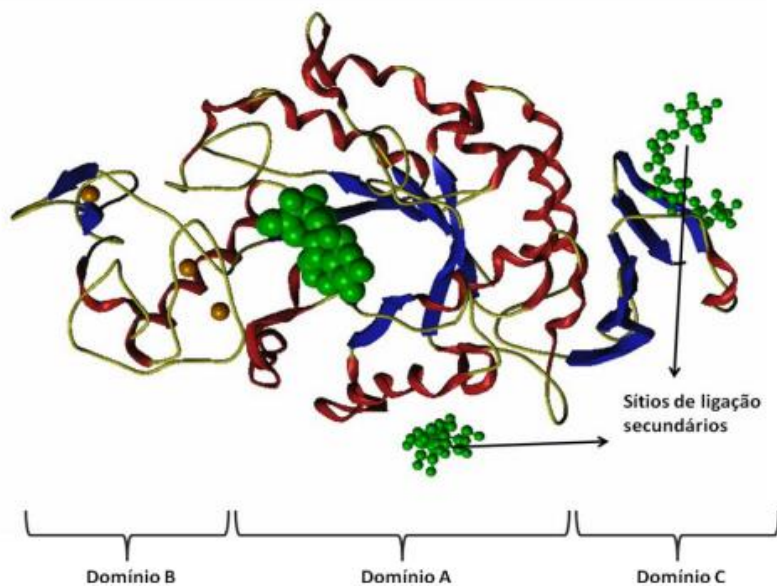


Figura 4: Estrutura tridimensional da α -amilase organizada em 3 domínios A, B e C (Fonte: MÓTYANA et al., 2011).

O barril Tim é um motivo estrutural de proteínas e este possui quatro regiões altamente conservadas, relacionadas ao sítio ativo presente nas α -amilases. A primeira região é um resíduo de histidina na porção C-terminal da terceira fita- β que interage com resíduos de glicose do substrato. A segunda

região é um resíduo de ácido aspártico na fita- β que age como um nucleófilo durante a catálise. A terceira região é um resíduo de ácido glutâmico na quinta fita- β que age como doador/acceptor de prótons. E a quarta região, é um resíduo de histidina e de ácido aspártico na sétima fita- β que podem formar ligações de Hidrogênio com resíduos de glicose do substrato (VAN DER MAAREL et al., 2002).

Além dos domínios A, B e C, o tipo e o número de domínios extras, como os domínios D e/ou E localizados na porção C-terminal, são muito variáveis na família das α -amilases (JANECEC et al., 1997). A função do domínio D é desconhecida. O domínio E está relacionado ao módulo de ligação com o carboidrato (CBM) ou domínio de ligação ao amido (SBD), as diferentes seqüências/estruturas dos módulos melhoram a eficiência de uma enzima amilolítica no amido cru (MÓTYANA et al., 2011).

O sítio ativo está localizado entre o domínio A e o domínio B na região C-terminal das fitas- β do barril TIM. Por meio de estruturas determinadas por difração de raios-X de α -amilases bacterianas complexadas com acarbose (Figura 5), um pseudotetrassacarídeo inibitório, foi possível observar que a fenda de ligação ao substrato, pode acomodar de quatro a dez unidades de glicose que variam de acordo com a origem da α -amilase (NIELSEN e BORCHERT, 2000).

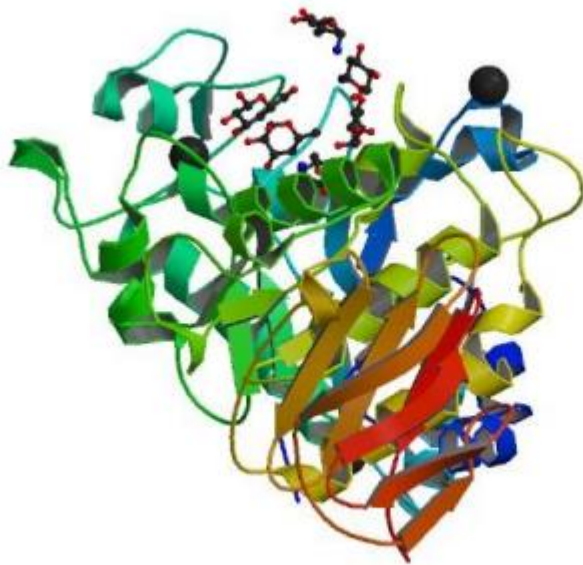


Figura 5: Estrutura tridimensional da α -amilase de *Bacillus subtilis* complexada com arabinose (fonte: KAGAWA et al., 2003).

Em 1953, Konshland propõe o mecanismo catalítico mais aceito até os dias atuais. Este mecanismo é denominado de mecanismo de dupla substituição. O processo envolve dois resíduos catalíticos no sítio ativo, um resíduo de ácido glutâmico e um resíduo de aspartato (VAN DER MAAREL et al., 2002). Consiste em três passos (Figura 6). O primeiro passo é a protonação do Oxigênio do resíduo de glicose pelo doador de prótons, geralmente um resíduo de glutamato da α -amilase (NIELSEN e BORCHERT, 2000). Em seguida, há um ataque nucleofílico pelo nucleófilo catalítico, geralmente um resíduo de aspartato no carbono C1 da glicose (UITDEHAAG et al., 1999). No terceiro passo, há uma ativação de uma molécula de água pelo doador de prótons, o resíduo de glutamato, que está desprotonado (NIELSEN e BORCHERT, 2000). A molécula de água ativada hidrolisa então a ligação covalente entre o oxigênio do nucleófilo e o carbono C1 da glicose completando assim o ciclo catalítico (NIELSEN e BURCHERT, 2000).

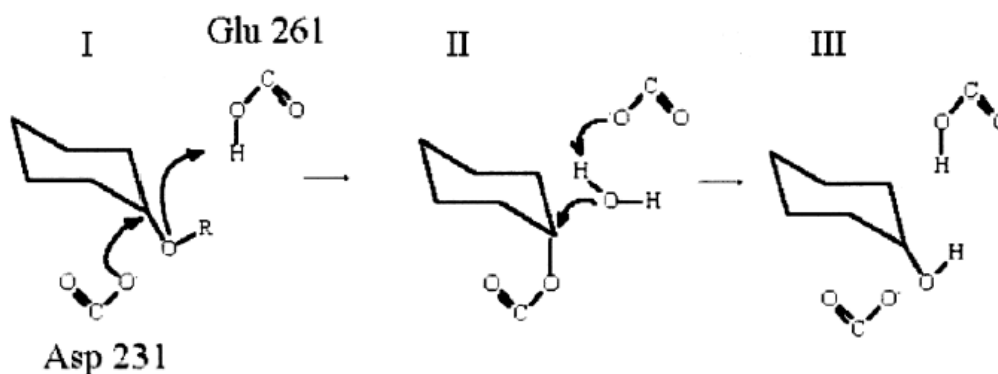


Figura 6: Mecanismo catalítico das α -amilases. I-protonação do Oxigênio glicosídico e ataque no Carbono C1 da glicose pelo Aspartato. II-Ativação da molécula de água, clivagem da ligação covalente entre o carbono C1 da glicose e o Aspartato. III- Regeneração do estágio inicial de protonação (figura Retirada de NIELSEN e BORCHERT, 2000)

Grande parte das α -amilases possui um ou mais íons de Cálcio (Ca^{+2}) por molécula que são essenciais para a atividade e estabilidade da enzima (JANECEK, 1997). Gupta (2003), afirma que o número de sítios de ligação varia de um a dez, sendo a afinidade das α -amilases ao Ca^{+2} muito maiores que a outros íons. Então, o Cálcio, liga o barril $(\alpha/\beta)_8$ ao domínio B, estabilizando dessa forma a estrutura do sitio ativo (BUISSON et al., 1987).

As enzimas mais utilizadas pela indústria são as α -amilases. Na maioria das vezes, as condições industriais para utilização dessas enzimas são adversas, apresentando pH ácido, temperaturas elevadas, alta viscosidade, entre outros (GUPTA, 2003). Algumas enzimas perdem a sua função em algumas faixas de pHs e em temperaturas elevadas devido principalmente a desestabilização da sua estrutura. A conformação estrutural e a atividade amilolítica são extremamente relacionadas. Há, portanto um grande interesse biotecnológico em α -amilases mais eficientes que sejam ativas nessas condições (MAC GREGOR et al., 2001).

A faixa ótima de temperatura para sua atividade é de 55 a 70°C, que varia dependendo da fonte. A atividade aumenta consideravelmente de 0° a 40°C, entretanto, as amilases bacterianas apresentam maior estabilidade frente às temperaturas superiores a 40°C, com atividade ótima ao redor de 70°C (REED, 1975). Miller et al., (1957) citado por Reed (1975), estudou a

estabilidade da enzima com o aumento da temperatura até 80°C e observou que as amilases fúngicas perderam quase que completamente sua atividade inicial, enquanto que nessa mesma temperatura, as amilases bacterianas preservaram 92% de sua atividade.

Prakash e Jaiswal (2009), afirmaram que o mercado anual de enzimas termoestáveis representa aproximadamente U\$ 250 milhões, tendo as α -amilases posição de destaque (BURHAN et al., 2003). De acordo com Prakash e Jaiswal (2009), entre as principais fontes de α -amilases termoestáveis destacam-se as bactérias *Bacillus subtilis*, *Bacillus estearothermophilus*, *Bacillus licheniformis* e *Bacillus amiloliqueefaciens*.

3.2.2. β -amilase

A β -amilase é uma enzima que hidrolisa terminais não reduzidos de amido e maltooligosacarídeos produzindo unidades de maltose. É uma exo-amilase, denominada α -1,4-glucan maltohidrolase, encontrada, sobretudo nos vegetais superiores. A β -amilase hidrolisa as ligações glicosídicas α -1,4 de polissacarídeos, separando duas unidades de glicose na forma de β -maltose, por uma inversão (CLARK et al., 2003; MOHAN et al., 2005; BRIEN e FOWKES, 2005; SAHLSTRÖM et al., 2003).

Segundo Kunze (1996), essas enzimas são obtidas a partir de grãos de gramíneas não germinadas, pois com a germinação surge a α -amilase, que é produzida no segundo e quarto dia de germinação e a quantidade dessa enzima pode ser aumentada durante o prolongamento da germinação. Já Molina-Cano e colaboradores (2000, 2002), afirmam que antes da germinação, a β -amilase já está presente em quantidades maiores na cevada, quando comparada à α -amilase. Depois de uma diminuição inicial, a quantidade de β -amilase tem aumentos consideráveis no segundo e terceiro dias de germinação. A β -amilase tem pH ótimo entre 4,0 e 6,0 e temperatura ótima de 30 a 50°C (SANTANA, 2012).

3.2.3. Amiloglucosidade (Glucoamilase)

A amiloglucosidase, ou glucoamilase, ou glicoamilase, (1,4) (1,6)- α -D-glucan glucanohidrolase, EC 3.2.1.3, conforme a “*Enzyme Commission of the International Union of Biochemistry*”) é uma enzima extracelular que rompe as ligações α -1,4 e α -1,6 do amido a partir da extremidade não redutora até glicose (LIN et al, 1993; PANDEY et al., 2005).

Além das frações amilose e amilopectina do amido, outras moléculas como maltose, dextrinas e glicogênio são hidrolisadas pela enzima, que atua também sobre as ligações α -1,3. A amiloglucosidase é uma enzima de indução, sendo importante a presença de maltose ou amido no meio para sua alta produção. Entretanto, como a enzima é chamada de indução não típica, o micro-organismo a sintetiza, mesmo se crescer em glicose como fonte de carbono (REGULY, 1991) citado por COSTA (1996). É, na sua maior parte, produzida por linhagem dos fungos *Aspergillus* e *Rhizopus* sp sendo que, dentre essas, a amiloglucosidase de *Aspergillus* é a mais termoestável. Essa enzima catalisa eficientemente a reação de sacarificação do amido dentro de uma faixa estreita de temperatura (LEMOS et al., 2006).

Assume importância industrial devido à habilidade de formar menos produtos de reversão que a hidrólise ácida (PARK e SANTI, 1977), bem como à sua alta taxa de conversão do polissacarídeo em glicose. Assim, a amiloglucosidase é usada em amidos liquefeitos com α -amilase para chegar a produtos que serão usados como substratos para fermentações, ou para a obtenção biotecnológica de glicose e dextrinas (MACKENZIE et al., 2000).

As amiloglucosidases provenientes de diferentes fontes apresentam pH ótimo entre 3,0 e 5,0 (COSTA, 1996) e entre 4,5-5,0 (SOCCOL et al., 2005) estando o pH de maior estabilidade da enzima no intervalo de 4,0 a 5,0 (REED, 1975). Essas amiloglucosidases incluem as produzidas por *Aspergillus niger* (SOCCOL et al., 2005). Zanin (1989) também ressalta que o pH em que a enzima amiloglucosidase de *A. niger* apresenta máxima atividade está entre 3,5 e 5,0.

A temperatura ótima da enzima se encontra, na maioria das vezes, entre 50 e 60°C (REED, 1975; COSTA, 1996), que incluem a amiloglucosidase de *A. niger*, *A. oryzae*, *Monascus kaoliang*, *Mucor rouxinol*, *Penicillium oxalicum*

(SOCCOL et al., 2005). Mackenzie et al., (2000), Cepeda et al., (2001) e Lemos et al., (2003), complementam que vários micro-organismos e plantas produzem amiloglicosidase, das quais a maior parte disponibilizada comercialmente é produzida por linhagens dos fungos *Aspergillus* e *Rhizopus* sp. sendo a enzima produzida por *Aspergillus* é mais termoestável, apresentando a máxima atividade em torno do pH 4,5, em temperaturas de 50-55°C sendo, entretanto, rapidamente inativada em temperaturas próximas a 60°C. Esta termoestabilidade limitada afeta seu uso no processo industrial, onde a atuação prolongada em altas temperaturas é necessária.

3.3. Produção de Enzimas Microbianas

Os micro-organismos exercem funções importantes considerando aspectos ecológicos e econômicos. Segundo Paul e Clark, (1996), participam de importantes ciclos biogeoquímicos, na transformação de metais como ferro e mercúrio (HANDELSMAN, 2004), e atuam aumentando a produtividade de plantas (HEIJDEN, BARDGETT e STRAALLEN, 2008). Com o avanço no conhecimento da biodiversidade microbiana houve um grande interesse econômico, principalmente por parte das indústrias, possibilitando avanços biotecnológicos principalmente nas áreas de biorremediação, conversão energética, biocatálise e síntese de produtos naturais (KIM et al., 2008; WULFF; CARRER e PASCHOLATI, 2006).

Segundo Fellows (1994), para que a produção de enzimas hidrolíticas microbianas seja viável, devem ser observados os seguintes requisitos: os micro-organismos devem ser capazes de crescer em substratos de baixo custo; a produção de enzima deve ocorrer em um ritmo elevado, constante e em curto espaço de tempo; os métodos para a recuperação das enzimas devem ser simples e de baixo custo; a preparação enzimática obtida deve apresentar significativa atividade e estabilidade.

As enzimas microbianas podem ser obtidas tanto por cultivo superficial em substratos sólidos, como por exemplo: farelo de trigo, milho, cascas de algumas frutas, preparados à base de soja, farinha de trigo, cacau em pó, grãos de cereais, legumes, madeira e palha (FELLOWS, 1994; WARD, 1989)

como também podem ser obtidas por cultivos submersos com o emprego de substratos líquidos. O substrato deve conter uma fonte de carbono (fonte energética) e uma fonte de nitrogênio que permitam a proliferação celular. Além disso, podem requerer também nutrientes específicos para o crescimento além de determinados minerais para a produção enzimática. A produção de enzimas pelo cultivo submerso exige a preparação prévia de um inóculo que é preparado nas mesmas condições de incubação que o cultivo final para a produção da enzima. Alguns exemplos de substratos de baixo custo e disponíveis em abundância são os melaços hidrolisados de amido e água de maceração de milho (FELLOWS, 1994).

Logo após a fermentação, as enzimas são recuperadas através da centrifugação, filtração, precipitação fracionada, separação cromatográfica, separação por membrana, liofilização ou pela combinação de outros métodos. As enzimas intracelulares são extraídas mediante rompimento celular, sendo que neste caso a recuperação da enzima é mais difícil e seu rendimento é inferior, porque parte da enzima pode permanecer retida na massa celular. Quando é necessária a extração do restante da enzima intracelular, pode-se proceder à precipitação com acetona, álcoois, sulfato de amônio ou por ultrafiltração. O êxito da fabricação industrial de enzimas depende do grau em que a atividade dos micro-organismos é alcançada e quando se reduzem custos do substrato empregado, da incubação e da recuperação da enzima (FELLOWS, 1994).

Diversos são os micro-organismos produtores de α -amilase e amiloglicosidase, destacando-se as espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Bacillus* que têm sido empregadas em processos industriais (COSTA, 1996; PANDEY et al, 2005). Ward (1989) afirma que, enquanto a maltose parece ser o melhor indutor para a α -amilase de *Aspergillus oryzae*; o amido, a maltose e a glucose estimulam a produção de amiloglicosidase por *Aspergillus niger*.

Fellows (1994) relata que as preparações comerciais de amilases fúngicas que contêm pequenas proporções de fosfatase, glucoamilase e protease, sacarificam mais profundamente o amido, que a amilase e dão lugar a quantidades substanciais de maltose que contém apenas glucose. São utilizadas para os seguintes processos: eliminam a turbidez produzida pelos

amidos e reduzem a viscosidade dos sucos de frutas; transformam o amido de cacau em dextrinas reduzindo assim sua viscosidade e melhorando os xaropes de chocolate; reduzem a viscosidade da massa de panificação e aceleram a fermentação dessas massas pelas leveduras. Dentre as amilases fúngicas as que apresentam maior interesse industrial são: α -amilase, β -amilase; amiloglucosidase e dextrinase limite (HARGER, 1982).

3.4. Taxonomia aplicada à identificação de bactérias

Taxonomia é a ciência que lida com a classificação: criação de novos taxa; identificação: alocação de linhagens dentro de espécies conhecidas e nomenclatura (VANDAMME et al., 1996). A identificação consiste no uso de metodologia discriminatória, necessária para a classificação ou alocação dos organismos em grupos afins, de acordo com características bioquímicas, fisiológicas, genéticas e morfológicas. Esta ciência produziu um sistema estável, predizível e altamente informativo que tem colaborado para o avanço de vários ramos da ciência, incluindo não somente a microbiologia, mas também a genômica, ciências médicas, ecologia de micro-organismos, biotecnologia, evolução e epidemiologia (NATURE GENOMICS AND TAXONOMY, 2002).

A necessidade de classificar organismos vivos para sistematizar os conhecimentos acerca das diferentes espécies foi demonstrada no século 16. Nesta época, Lineu propôs um sistema binomial de classificação que é uma das bases da classificação atual dos organismos. Em 1758, a décima edição do *Systema Naturae* de Lineu incluía 5.897 espécies de plantas e animais, os dois reinos nos quais ele dividia os organismos vivos. A *Taxonomia* se tornou uma profissão durante o século XIX, resultando em um rápido aumento no número de animais e plantas terrestres conhecidos (CURTIS et al., 2002).

O propósito primário de um sistema taxonômico utilitário é fornecer classificações que sejam úteis para finalidades científicas ou práticas diversas, especialmente a identificação, e também gerar bases de dados contendo informação relevante sobre organismos. Os primeiros sistemas de classificação de procariotos eram baseados apenas em algumas propriedades fenotípicas, como propriedades morfológicas, fisiológicas e bioquímicas, que eram usadas

para agrupar linhagens (BERGEY'S, 1934). Embora tais métodos tradicionais refletissem as limitações tecnológicas daquele período, governaram por décadas a taxonomia microbiana e forneceram informação descritiva para a estruturação de diversos taxa bacterianos. Na prática, por se basear exclusivamente em algumas propriedades morfológicas e comportamentais e por não considerar qualquer afinidade evolutiva verdadeira, levaram a sérios erros de classificação microbiana, nos mais variados grupos de bactérias e por isso foram tidos como artificiais (BOONE e CASTENHOLZ, 2001).

Com o advento da taxonomia numérica (SNEATH e SOKAL, 1962) e o surgimento da computação, dados fenotípicos começaram a ser analisados por coeficientes numéricos que expressam similaridade entre linhagens com o auxílio da computação. Sem dúvidas, a taxonomia numérica veio proporcionar maior objetividade aos esquemas de classificação microbiana e a abordagem pressupunha a utilização de um grande número de testes bioquímicos (100 a 200) e uma amostragem grande e diversificada de linhagens, sendo os resultados expressos em porcentagens (VANDAMME et al., 1996). Embora a aplicação de taxonomia numérica tenha proporcionado avanços significativos na classificação dos micro-organismos, em especial das bactérias, desconsiderava os aspectos evolutivos (GOODFELLOW, 2000).

Nos últimos 40 anos, com o desenvolvimento nas áreas de química, biologia molecular, estatística e informática, a taxonomia de procariotos sofreu profundas alterações na direção de um sistema que refletisse as relações evolutivas entre os organismos aproximando a classificação microbiana o melhor possível da realidade biológica. Na década de 70 foi estabelecida a taxonomia polifásica, que propunha o emprego da análise de homologia de DNA-DNA associada a uma variedade de características ecológicas e fenotípicas na classificação de micro-organismos (COLWELL, 1970). Colwell propôs a integração da informação do nível molecular ao ecológico para obter identificações e classificações mais precisas e confiáveis.

WOESE e FOX (1977) publicaram o trabalho seminal sobre o uso de seqüências do cronômetro RNAr 16S para a reconstrução da Árvore da Vida. Em procariotos são encontradas três unidades ribossomais: 5S, 23S e 16S (constitui a subunidade pequena) (SERVIOR et al., 1999). Devido à importância da síntese de ribossomas para o funcionamento celular, é provável

que o sistema de tradução tenha surgido uma única vez na evolução e não tenha sido alterado subsequentemente. Desta forma, as seqüências das subunidades 5S, 16S e 23S podem ser consideradas conservadas, assim como os genes que as codificam (ABREU, 2004). De fato, se demonstrou que o RNAr 16S seria extremamente útil na afiliação filogenética de bactérias em espécies, gêneros e famílias (WOESE, 1987). O uso do RNAr 16S foi prontamente incorporado à taxonomia polifásica (STACKEBRANDT e GOEBEL, 1987).

A substituição aos ensaios de hibridização DNA-DNA pelos protocolos extremamente rápidos de sequenciamento de rRNA 16S foi fortalecido pelo trabalho de Stackebrandt e Goebel (1994), cujo resultado mostrou a existência de correlação entre as duas metodologias. Entretanto, demonstrou-se que a resolução filogenética associada à metodologia de rRNA 16S muitas das vezes é baixa, gerando sub-estimativas para espécies muito relacionadas (PAYNE et al., 2005). Aliado a baixa resolução do rRNA 16S existem outras desvantagens considerando o emprego desta ferramenta: (i) o número de cópias dos genes pode variar de uma espécie para outra, levando ao processo de conversão gênica (FROSTEGARD et al., 1999) e (ii) dúvidas a respeito do grau de resistência que estes genes apresentariam a transferência lateral (YAP, ZHANG e WANG, 1999).

Apesar das críticas o emprego do rRNA 16S revolucionou a taxonomia de procariontes nos últimos 30 anos e atualmente representa a metodologia mais utilizada para a identificação microbiana (BRENNER, STALEY e KRIEG, 2005). O rRNA 16S é considerado o marcador filogenético universal por várias razões, entre elas: i) distribuição universal entre os procariotos, ii) apresenta baixa taxa de mutação durante a evolução, iii) papel fundamental de síntese protéica, iv) não ocorrência de transferências horizontais, v) tamanho ideal (aproximadamente 1500 pares de bases) para a utilização através de técnicas de PCR e sequenciamento, vi) um único par de iniciadores capazes de amplificar o rRNA 16S de praticamente todas as bactérias (FOX, PECHMAN e WOESE, 1977; LANE et al., 1985).

O desenvolvimento rápido dos métodos de sequenciamento de DNA e o acúmulo da informação de seqüências em bases de dados públicas de livre acesso (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) têm permitido o sequenciamento

comparativo de genes homólogos entre linhagens microbianas e é agora procedimento padrão em sistemática microbiana.

3.5. Aproveitamento de resíduos industriais

Segundo estimativas, a produção anual de resíduos agroindustriais alcança cerca de bilhões de toneladas. A América Latina contribui com mais de 500 milhões de toneladas de subprodutos e resíduos agroindustriais, sendo o Brasil responsável por mais da metade desta quantia (SANTOS et al., 2005).

A utilização de resíduos como fertilizantes apresenta limitações por promover o recrutamento de pragas para a lavoura, além de, a depender do resíduo, promover poluição de águas e de solo. Quanto à utilização como ração animal, apresenta limitações devido à presença de compostos tóxicos, alergênicos ou antinutricionais. Portanto a disposição dos resíduos no ambiente encontra-se associada a questões relevantes questões ambientais. Neste contexto, o reaproveitamento dos resíduos agroindustriais emerge como uma alternativa socioambiental importante (GODOY, 2009).

A utilização de resíduos gerados pelas agroindústrias para diversas finalidades tem sido investigada em diferentes estudos com abordagens variadas, sendo a utilização como substrato para o crescimento celular uma das propostas (PANDEY, 1999). De fato, a matéria orgânica presente nos resíduos apresenta propriedades que conferem potencialidades para o uso como combustível metabólico para o crescimento celular e conseqüentemente produção de biomoléculas. O reaproveitamento desses resíduos agroindustriais, além de fornecer diferentes alternativas de substratos para fermentação, também ajuda na diminuição dos problemas de poluição (PANDEY et al., 1999a ;SILVA et al., 2005a).

Pandey *et al* (2000), afirmam que nos últimos anos, houve um crescente interesse na biotransformação desses resíduos, por ser um material de baixo custo e altamente renovável. Deste modo, a utilização desses resíduos, além de diminuir o impacto sobre o meio ambiente, devido à disposição inadequada, pode ser um fator importante para a produção de subprodutos de alto valor agregado com diminuição dos custos de produção e promoção da sustentabilidade da cadeia produtiva.

3.5.1. Cacau (*Theobroma cacao*)

Tem sua origem nas regiões de florestas pluviais da América Tropical. O cacauzeiro é encontrado em estado selvagem, desde o Peru até o México. Foi nomeado cientificamente como *Theobroma cacao* (Figura 7), e faz parte da família das Esterculiáceas. Na literatura botânica, foi citado pela primeira vez por Charles de l' Ecluse, que o descreveu sob o nome de *Cacao fructus*. Linneu, em 1753, o descreveu como *Theobroma fructus* que, em 1953, propôs o nome *Theobroma Cacao*, que permanece até hoje (SANTANA, 2012).



Figura 7: Cacau – *Theobroma cacao*. Fonte: Indeca, 2011

A produção cacauzeira constitui uma importante atividade agrícola no estado da Bahia, e são produzidos aproximadamente 175 mil toneladas, e isto representa aproximadamente 83% do cacau produzido em todo o país. O Pará e Rondônia são o segundo e o terceiro produtores, colaborando com 10% e 5% da produção nacional (CEPLAC, 1999; PERES, 1998). Em 2009, o Brasil produziu 218,48 mil toneladas de amêndoa de cacau, sendo as Regiões Norte/Nordeste, responsáveis por mais de 96% dessa produção, segundo dado do IBGE. O Nordeste produziu 137,92 mil toneladas da amêndoa do fruto, sendo a Bahia responsável por 100% da produção regional e cerca de 64% da nacional (SENA, 2011).

O fruto do cacau é utilizado na fabricação do chocolate, e durante o processamento de seu grão, é gerada uma grande quantidade de resíduos que são chamados de farelos de cacau. Este farelo de cacau representa 10% da produção das amêndoas secas (NETO et al., 2008), o que correspondeu a 21.800 t no ano de 2009, uma vez que a produção foi estimada em 218.000 t no ano de 2009 (SENA, 2011).

A proporção aproveitável de subprodutos e resíduos do cacau é bastante expressiva, pois menos de 8% do peso do fruto do cacau, em estado normal de maturação, é usado pela indústria beneficiadora. Em geral, um fruto com peso médio de 500g é constituído de 80% de casca, e 20% de semente, na qual estão presentes o grão seco, a amêndoa, a testa e outros constituintes do total do fruto (FREIRE et al., 1990).

3.5.2. Dendê (*Elaeis guineensis* Jacq).

A palma é uma palmeira nativa da costa ocidental da África, mais precisamente do Golfo da Guiné, pertence à ordem Palmales e família Arecaceae (Figura 8) (GOMES, 2009). É cultivada principalmente na Ásia, na África e nas Américas Central e do Sul. Foi trazida ao Brasil no século XVI pelos negros africanos, por ocasião do tráfico de escravos para apoiar a lavoura canavieira. Adaptou-se e floresceu espontaneamente no litoral da Bahia e Rio de Janeiro, tornando-se conhecida no Brasil como dendezeiro. Sua importância deve-se ao óleo extraído de seus frutos, conhecido como azeite de dendê, o qual passou a ocupar um lugar de destaque na popular culinária brasileira, especificamente a baiana (MÜLLER et al., 2010).

No Brasil, os plantios comerciais estão principalmente nas regiões Norte e em menor quantidade no Nordeste, com destaque o estado do Pará (GOMES et al., 2009). É um gênero de apenas duas espécies, sendo uma mais freqüente nas Américas e a outra no continente africano. A espécie americana é o caiaué (*Elaeis oleifera* H. B. K. Cortês) e, a africana é a palma ou dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq) (SANTOS, 2010).



Figura 8: Dendezeiro (*Elaeis guineenses*). Fonte: Embrapa Solos, 2013.

De acordo com Andrade (2010), essa palmeira produz dois tipos de óleo: o óleo de polpa e o óleo de palmiste. O primeiro é produzido em maior quantidade e é extraído do mesocarpo do fruto, em uma base de 4,5/6 toneladas por hectare. O óleo de palmiste é extraído do endosperma da semente, sendo sua produtividade dez vezes mais baixa, 450 quilos por hectare. A extração dos dois tipos de óleo ocorre por meio de processo físico de prensagem.

O cultivo dessa oleaginosa, como planta industrial, ocorreu sob o domínio da colonização britânica, no século XIX. Os ingleses trouxeram sementes da África e as plantaram em suas colônias do Sri-Lanka, Sumatra, Borneo e Malásia ainda sob os domínios da Companhia das Índias Orientais, tendo florescido com sucesso. Após a independência da Malásia, a partir da década de sessenta, um agressivo programa de incentivo a essa cultura, foi responsável por transformar esse país no maior produtor de óleo de palma do mundo. A Malásia e Indonésia são, hoje, os responsáveis por 87% do óleo de palma produzido no mundo (45,1 milhões de toneladas) (ANDRADE, 2010).

Os óleos de palma e palmiste participam com a oferta de 31% do óleo vegetal consumido no mundo, desbancando seu maior concorrente, o óleo de soja (oferta de 28%), (figura 9) em 2011 (FAO, 2010). O cultivo do óleo de palma é um dos mais promissores investimentos dentro do agronegócio de plantas perenes. É encontrado em mais de 50% dos produtos comercializados nos supermercados de todo o mundo. Seu cultivo continua em franca expansão e nas últimas quatro décadas aumentou em oito vezes sua área plantada,

tendo atingido 16 milhões de hectares. As dez maiores empresas do setor concentram 22% da produção mundial, juntas produzem 9,7 milhões de toneladas/ano a partir de 2,3 milhões de hectares de plantações. Envolvem em todo o mundo três milhões de agricultores familiares.

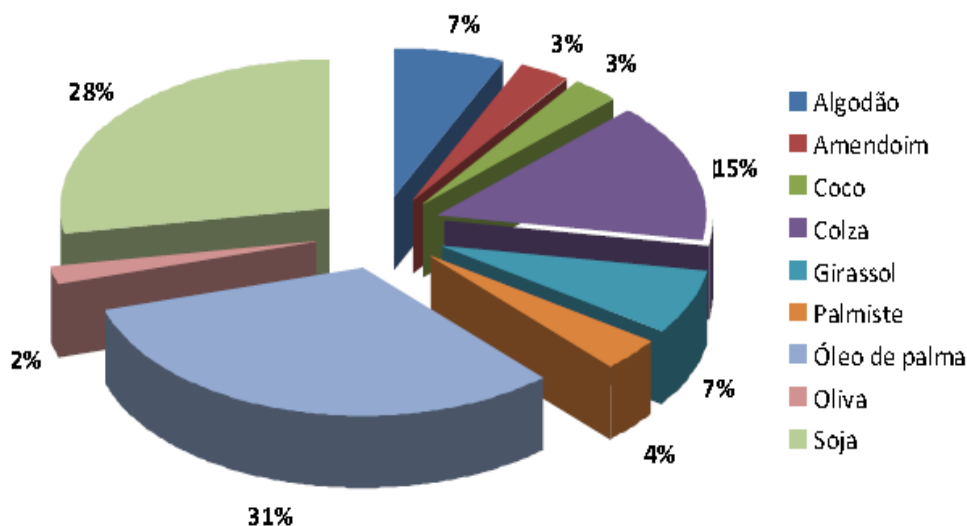


Figura 9: Consumo mundial dos principais óleos vegetais. Fonte: Food and Agriculture Organization – FAO (2010).

No Brasil, o uso doméstico do óleo, na culinária ou na indústria incipiente dos meados do século passado, era garantido pelos dendezeiros que vicejavam subespontaneamente ou em pequenos plantios do sul da Bahia. O cultivo industrial da palma de óleo, com ampla área e técnicas modernas, teve início, no Pará, hoje, o maior produtor nacional. A partir de 1968, através do apoio do governo federal dentro do Programa de Integração Nacional, com os incentivos fiscais da SUDAM, a Denpasa foi à empresa pioneira e grande beneficiária, com um plantio inicial de seis mil hectares localizados na Rodovia PA 391 (ANDRADE 2010). A partir da década de 80 outras empresas entraram nesse agronegócio e permanecem com sucesso. Hoje, a Agropalma é a empresa com a maior área plantada, seguida por um pequeno grupo de empresas menores. Mais recentemente, grandes empresas se instalaram na região e detêm, em sua totalidade, cerca de 110 mil hectares plantados (ANDRADE, 2010).

Segundo Silva et al., (2011) nos últimos 30 anos, o consumo do óleo do dendê tem crescido muito. O Brasil consome cerca de 280 mil toneladas, mas tem mercado interno potencial de 400 mil toneladas/ano. Este cultivo acelerado traz consigo resíduos como folhas e o engaço. Componentes que demoram, entre um a dois anos para se decompor no meio ambiente, necessitando de gestão apropriada. Para cada 100 toneladas de cachos de frutos processados são obtidas 3 toneladas de torta de dendê (FURLAN JÚNIOR et al., 2006).

O resíduo gerado pós-prensagem para obtenção do azeite de dendê (torta) não é um subproduto padronizado, pois a depender do local de cultivo, da safra e da técnica de prensagem os valores de composição centesimal podem variar muito (RODRIGUES FILHOS et al., 2001). Quanto à composição centesimal dos resíduos de dendê, Rodrigues (1993), Carvalho (2004) e Iluyemi (2006) mostraram valores de cerca de 7 a 18 % de proteína total, 21 a 50% de fibras, 6 a 20% de lipídios, umidade de 6 a 10%, e teor de cinzas de 1,63%. Silva-Rodrigues et al., (2012) encontraram cerca de 36,15% de carboidratos não fibrosos, e 12,67% de carboidratos fibrosos.

Ainda segundo Rodrigues et al., (1994) esse teor de proteína bruta pode ser amplamente utilizada na alimentação de animais domésticos (bovinos, aves, equinos e suínos), participando da composição de rações e ou como fertilizante orgânico. Segundo Kiamura (1990), esses resíduos possuem alta qualidade devido à constituição do óleo de palmiste que tem elevados teores de ácidos láuricos e mirístico. Fator que evidencia que a cultura do dendê pode ter um reaproveitamento total de todos os resíduos sólidos da palma e do palmiste.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos deste trabalho foram realizados no Laboratório de Biotecnologia Industrial (LBI) da Faculdade de Tecnologia e Ciência (FTC) de Salvador e no Laboratório de Microbiologia Aplicada - LAMAP do Departamento de Biointeração do Instituto de Ciências da Saúde (ICS) da Universidade Federal da Bahia (UFBA).

4.1. Coleta e preparação dos resíduos cacau e dendê

Os resíduos do dendê e do cacau foram coletados na fazenda Juerana localizada no km 12, Rodovia Ilhéus-Itacaré (Ba). Os agro-resíduos de dendê e cacau foram coletados, lavados com água corrente e armazenados em sacos plásticos limpos, sendo trazidos para processamento com intervalo de no máximo 8h. Antes do processamento, foram separados e identificados de acordo com a parte da planta coletada (cascas, folhas, galhos, etc.). Em seguida, os agro-resíduos foram triturados separadamente e armazenados em frascos de vidro estéreis (Figura 10).



Figura 10: Resíduos de cacau e dendê. Fonte: A autora

4.2. Enriquecimento da amostra

Para isolamento dos micro-organismos, 1g da amostra de cacau ou dendê foi incubada a 37⁰C, sob agitação, por 48 horas em solução estéril contendo: 0,01% de CaCl₂, 0,02% de NH₄Cl, 0,01% de MgSO₄ e 0,01% de K₂HPO₄. Esse procedimento permite o enriquecimento da amostra (Figura 11).



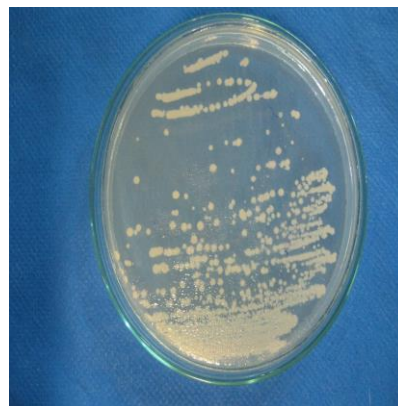
Figura 11: Enriquecimento da amostra em meio líquido com sais. Fonte: A autora

4.3. Plaqueamento e Isolamento das cepas microbianas

Após esse período, 100 μ L da amostra enriquecida, foram colocadas em meio mínimo contendo: CaCl_2 0,05g/L, NH_4Cl 0,10g/L, MgSO_4 0,05g/L, K_2PO_4 0,40g/L, Agar bacteriológico 15 g/L e amido a 1% como fonte de carbono. O inóculo foi feito com o auxílio da alça de drigalsky. As placas foram incubadas a 37°C por 48 horas. Após o crescimento, Unidades Formadoras de Colônia (UFC) foram isoladas por esgotamento com a alça de platina (figura 12). As placas foram incubadas a 37°C por 48 horas. As colônias isoladas foram então conservadas em tubos contendo o meio de isolamento. Para cada isolado os ensaios foram feitos em triplicata.



A



B

Figura 12: Isolamento da carga bacteriana em meio contendo 1% de amido. Em (A) Placas contendo meio amido e em (B) colônias isoladas após 48 horas de incubação. Fonte: A autora

4.4. Caracterização da atividade hidrolítica em meio sólido

Os repiques em meio contendo amido foram incubados por 96 horas a 30°C. A atividade amilolítica foi determinada através da formação de halo transparente em torno das colônias, visualizado por revelação com Lugol a 4%. A atividade hidrolítica foi estimada semi-quantitativamente usando-se um índice enzimático (IE) que expressa a relação do diâmetro médio do halo de degradação e o diâmetro médio da colônia (STAMFORD et al., 1998). Nos ensaios o índice enzimático foi medido a cada 24 horas.

4.5. Identificação das cepas bacterianas pelo método de Gram

Os micro-organismos foram identificados parcialmente a partir do aspecto das colônias e de suas características morfológicas em microscopia ótica (GUERREIRO e SILVEIRA,1996). A técnica de coloração de Gram aliada à observação de lâminas a fresco foi utilizada para diferenciar os grupos de bactérias (FREITAS e PICOLI, 2007).

O método de Gram, que é um método de coloração que permite classificar bactérias em função das diferentes estruturas de parede celular a partir das colorações que estas adquirem após tratamento com agentes químicos específicos. A técnica consiste em tratar sucessivamente um esfregaço bacteriano, fixado pelo calor, com os reagentes: cristal violeta, lugol, etanol-acetona e fucsina básica.

4.6. Identificação das cepas microbianas por tipagem genética.

As cepas bacterianas de melhor produção enzimática nas condições estudadas foram identificadas por técnicas de biologia molecular, com a amplificação do gene rRNA 16S (subunidade menor do ribossomo) . Para a

extração do DNA genômico foi utilizado o kit comercial GenElute Bacterial Genomic Dna Kit (Sigma).

4.6.1. Extração de DNA

Foi realizado utilizando-se o GenElute Bacterial Genomic DNA Kit (Sigma). Inicialmente, as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm por 2 minutos. Em seguida, fez-se a ressuspensão celular com 180 μ L da solução T e juntamente, foi adicionado 20 μ L da solução de RNase. Misturou-se e esperou-se 2 minutos em temperatura ambiente. Após esta etapa, foi adicionado solução de proteinase K e incubou-se por 30 minutos em banho Maria em temperatura de 55°C. Após retirar do banho-maria, foram adicionados 200 μ L de solução C, incubando novamente em banho Maria por mais 10 minutos na mesma temperatura. Enquanto isso foi feita a preparação das colunas. Adicionou-se 500 μ L da solução de preparação das colunas e centrifugou-se por 12.000 rpm por 1 minuto e descartando-se o eluente. Retiraram-se as amostras do banho-maria, adicionando 500 μ L de etanol a 95% e a mistura permaneceu no *vortex* por 10 segundos. Em seguida, transferiu-se todo o conteúdo do microtubo para as colunas e centrifugou-se a 12.000 rpm por 2 minutos. Descartou-se o tubo que estava com as colunas e colocou-se um novo tubo para as mesmas colunas. A primeira lavagem foi feita com 500 μ L da solução de lavagem 1 e centrifugada por 2 minutos a 12.000 rpm. Descartaram-se os tubos contendo as colunas e colocou-se um novo tubo para as mesmas colunas. Na segunda lavagem, foram adicionados 500 μ L da solução de lavagem preparada segundo orientação do fabricante e centrifugou-se por 12.000 rpm por 1 minuto. Descartou-se o tubo da coluna e colocou-se um novo tubo. Colocou-se, 200 μ L da solução de eluição esperando 5 minutos em temperatura ambiente, para em seguida centrifugar por 1 minuto a 12.000 rpm. Posteriormente, todas as extrações foram estocadas a -20°C até a realização do PCR.

O DNA também foi analisado quanto a sua qualidade, por meio da análise em eletroforese em gel de agarose (SAMBROOK et al., 2001). A agarose foi preparada na concentração de 0,8% a 1,0% (p/v) em tampão de

corrida TAE contendo SYBR Safe DNA gel Stain a 0,5%. As amostras foram aplicadas no gel e submetidas à eletroforese com corrente e voltagem adequadas (1-5 V/cm). Para visualização da amostra de DNA o gel foi exposto à luz ultravioleta e fotodocumentado.

4.6.2. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para a amplificação parcial do gene ribossomal bacteriano RNA 16S foi realizada a reação da polimerase em cadeia (PCR). A reação utilizada continha o tampão 20 mM Tris HCl (pH 8,4), dNTP, MgCl e o iniciador universal 27F 5' AGA GTT TGA TCM TGG CTC- 3' e 1492R 5' GGY TAC CTT GTT ACG ACT - 3' além de Taq-polimerase, e de DNA. O programa de amplificação consistiu de desnaturação a 95°C por 3 minutos, seguido de 25 ciclos a 95°C de 1 minuto, 51°C por 1 minuto e 30 segundos e 72°C por 3 minutos. Após os ciclos, foi realizada uma extensão final por 30 minutos a 72°C. Os produtos de PCR, com aproximadamente 500 pares de bases foram purificados com o auxílio do Kit do GenElut PCR Clean Kit, conforme orientação do fabricante e encaminhados para sequenciamento.

4.6.3. Sequenciamento

Cada reação utilizou cerca de 80-100 ng de produto purificado em um volume máximo de 6,3 µl, 1,2 µl de iniciador a 2,7 pmol, 1 µl de ABI Prism Big Dye Terminator ready reaction mix e 1,5 µl de tampão de diluição (5 X), do kit (BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing versão 3.1, Applied Biosystems). A princípio, sequências parciais de rRNA 16S foram obtidas de todos os isolados utilizando o iniciador 27F 5' AGA GTT TGA TCM TGG CTC- 3'.

O controle do sequenciamento apresentava 0,5 µl DNA fita dupla pGEM®-3Zf(+), 2,0 µl do iniciador -21 M13, fornecidos pelo fabricante, além de 1 µl de ABI Prism Big Dye Terminator ready reaction mix, 1,5 µl de tampão de diluição 5 X e 5,0 µl de água livre de nuclease. O programa de sequenciamento

empregado apresentava um total de 25 ciclos de 10 segundos a 96° C, 5 segundos a 50° C e 4 min a 60° C.

Os produtos gerados em cada um dos poços da placa foram incubados por 15 minutos com 80 µl de isopropanol a 75% à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Decorrido o tempo de incubação, as placas foram centrifugadas por 45 minutos a 4000 rpm a 21 °C (Centrifuga 5810R, Eppendorf) para precipitação. Os sobrenadantes foram descartados pela inversão. Em seguida, foram incubadas a 75° C por 5 minutos no termociclador para a secagem do material. A desnaturação foi realizada com 10 µl de formamida. Subsequentemente, a amostra foi colocada em contato com gelo e imediatamente conduzida para o sequenciador automático. A separação dos fragmentos de DNA foi realizada com o ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer, Applied Biosystems. O tempo e a voltagem utilizados na injeção da amostra foram de 10s e 1.6 kV. Cada corrida foi realizada a 60° C por 2,800 s a 5µAmps e 13,4 kV.

4.6.4 Reconstrução filogenética

Sequências parciais do rRNA 16S, contendo aproximadamente 500 pb foram utilizadas a fim de posicionar as amostras no espaço filogenético. As sequências foram submetidas à busca por similaridade nas bases de dados do NCBI (GenBank-<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) através da ferramenta Basic Local Alignment Search Tools (Blast) (ALTSCHUL et al., 1997) e do SEQ Match do Ribossomal Database Project, RDP (COLE et al., 2005). O número de acesso das linhagens-tipo mais próximas foi obtido com base na lista de nomes validados publicada no LPSN (EUZÉBY, 2008). De posse deste número, as sequências de rRNA 16S das linhagens foram capturadas no NCBI, para fins de comparação.

O alinhamento de todas as sequências foi realizado com o Clustal W (THOMPSON, HIGGINS e GIBSON, 1994). A árvore filogenética e a matriz de similaridade foram geradas com o auxílio do MEGA 4.0 (TAMURA et al., 2007), com a opção de deleção completa. O modelo de reconstrução das árvores filogenéticas utilizado foi o Neighbor Joining (SAITOU e NEI, 1987). As árvores

foram construídas utilizando a distância correta de Jukes e Cantor (1969), com base em uma matriz de similaridade calculada através da distância p (análise par a par). A topologia da árvore filogenética não enraizada resultante foi analisada com um valor de *bootstrap* baseado em 1000 réplicas (FELSENSTEIN, 1985).

4.7. Determinação da Atividade hidrolítica em meio líquido

As cepas isoladas que apresentaram maior IE foram testadas quanto à capacidade de hidrolisar o amido em solução. Para o ensaio o pré inóculo foi preparado de forma a promover após diluição uma concentração de células de aproximadamente 6×10^8 cel/mL (Figura 13). As amostras foram recolhidas em triplicata nos tempos 0, 12, 24, 48, 72 e 96 horas de incubação. As amostras relativas aos controles: (C1) contendo apenas o meio amido sem o pré-inóculo, (C2) contendo o meio sem amido e acrescido de pré inoculo e (C3) contendo meio sem amido e sem pré-inóculo, também foram recolhidas em triplicata. Após o tempo de incubação, as amostras foram centrifugadas, tiveram o pH aferido e foram armazenadas sob refrigeração para posterior análise de amido e açúcares redutores.



Figura 13: Pré-inóculo em meio amido 1% em triplicata. Fonte: A autora

4.7.1. Dosagem do amido

Conforme Soccol (1992), é um método colorimétrico baseado na coloração azul desenvolvida quando há a formação do complexo amido-iodo. O reativo iodo-iodeto é preparado por diluição a 4% da seguinte solução de base: KI 30g/L e I₂ 3g/L. A reação colorida é obtida adicionando-se 0,3 mL da amostra convenientemente diluída a 7,2 mL desse reativo. A densidade ótica é lida a 620 nm.

4.7.2. Dosagem dos açúcares redutores

Os açúcares redutores foram determinados pela reação com o ácido 3,5-dinitrosalicílico “DNS” conforme Soccol, (1992) citado por SPIER (2005). Em meio básico e a temperatura elevada, o ácido 3,5-dinitrosalicílico passa a 3-amino-5-nitrosalicílico. Desenvolve-se uma coloração amarelo café que absorve a 540 nm como pode ser observado na figura 14 A e B.

Para o preparo do reativo DNS, dissolveu-se por aquecimento 5 g de ácido 3,5-dinitrossalicílico em 100 mL de NaOH a 2 N. Separadamente dissolveu-se também com aquecimento, 150 g de tartarato duplo de sódio e potássio em 250 mL de água destilada. As duas soluções foram misturadas e completou-se o volume para 500 mL com água destilada. Conservou-se em temperatura de refrigeração em embalagem de vidro âmbar envolvida em papel alumínio (SPIER, 2005).

Para dosagem, as amostras foram diluídas de modo a se obter um teor equivalente em glucose inferior a 1,0 g/L. Adicionou-se 0,5 mL da amostra convenientemente diluída a 0,5 mL do reativo DNS, colocando-se em banho a 100°C por 5 minutos e em seguida a 0°C por mais 5 minutos. Adicionou-se 2 mL de água destilada. As amostras foram homogeneizadas. Elaborou-se uma reta padrão a partir de uma solução de glucose com concentração inferior a 1 g/L que foi lido a 540 nm. A densidade ótica das amostras foi medida nesse mesmo comprimento de onda. Os teores em glucose – equivalente (g/L) foram obtidos por projeção sobre a reta padrão.



A



B

Figura 14: Dosagem dos açúcares redutores pelo método DNS. Em: A) amostras sendo aquecidas em placa aquecedora; B) Mudança de coloração após o aquecimento.
Fonte: A autora

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Seleção de Cepas

Isolados dos resíduos de cacau e de dendê que cresceram em meio sólido contendo amido a 1% como única fonte de carbono, foram selecionados para avaliação da respectiva atividade amilolítica. Entre as 20 cepas isoladas dos resíduos de cacau e selecionadas em meio amido, cinco delas (Cepa cacau1c, Cepa cacau2c, Cepa cacau3p, Cepa cacau4p, Cepa cacau5c), sendo três isoladas da casca (Cepa cacau1c, Cepa cacau2c e Cepa cacau5c) e duas isoladas da polpa (Cepa cacau3p, Cepa cacau4p) apresentaram inicialmente atividade amilolítica (Tabela 1). Entretanto, a Cepa cacau5c perdeu a atividade após a segunda passagem em meio de cultura.

Entre as 20 cepas isoladas dos resíduos do dendê em meio contendo amido como única fonte de carbono, apenas uma (Cepa dendê1c) apresentou atividade amilolítica (Tabela 1). Dessa forma, seis cepas isoladas dos resíduos de cacau e dendê apresentaram atividade amilolítica, após o isolamento. Entretanto, apenas cinco (Cepa cacau1c, Cepa cacau2c, Cepa cacau3p, Cepa cacau4p Cepa dendê1c) continuaram apresentando atividade estável após 10 passagens.

Tabela 1: Atividade amilolítica de cepas bacterianas isoladas de casca ou polpa de dendê ou cacau

Atividade Enzimática	Cepas positivas na primeira passagem	Cepas que perderam atividade até 2ª passagem	Cepas positivas analisadas até 10ª passagem
Cacau			
Amilásica	Cepacacau1c Cepacacau2c Cepacacau3p Cepacacau4p Cepacacau5c	Cepacacau5c	Cepacacau1c Cepacacau2c Cepacacau3p Cepacacau4p
Total	5	1	4
Dendê			
Amilásica	Cepadendê1c	-----	Cepadendê1c
Total	1	0	1

Inúmeras metodologias foram descritas de forma a facilitar a seleção e o isolamento de micro-organismos excretores de hidrolases. Estas metodologias são principalmente baseadas em cultivos dos micro-organismos em meio sólido, onde o meio específico apresenta a capacidade de identificar a produção de uma determinada enzima (MACIEL, 2006; STAMFORD; 1998; HANKIN, 1975). No presente trabalho a metodologia utilizada para isolamento de micro-organismos produtores de amilases mostrou-se efetiva.

A perda da atividade hidrolítica evidenciada para a Cepa cacau5c, pode ter sido promovida por perda de genes bacterianos, associados à síntese de amilases. A transferência gênica entre bactérias da mesma espécie, de espécies diferentes ou até mesmo de gêneros diferentes ou perda de genes para o ambiente, especialmente de genes localizados em estruturas plasmidiais, têm sido relatada na literatura (GRIFFITHS, 2000; JOHNSON, 2004).

A quantificação das atividades amilolíticas evidenciadas para as cepas: cacau1c, cacau2c, cacau3p, cacau4p e dendê1c (Figura 15) foram realizadas através da determinação do índice enzimático, calculado através da seguinte equação: $IE = (DH-DC) / DC$, onde DH equivale ao diâmetro do halo hipocrômico e DC equivale ao diâmetro da colônia (STANFORD, 1998). As medidas foram realizadas nos seguintes intervalos: 24, 48, 72 e 96 horas (Tabela 2). Segundo Stanford (1998) considera-se como um potencial produtor de amilase uma cepa com IE superior a 2,0. Entre os cinco isolados selecionados dos resíduos de cacau e dendê, quatro apresentaram índice enzimático superior a 2,0 (Cepa cacau1c, IE= 14, Cepa cacau2c IE= 9,0; Cepa cacau3p IE= 3,0; Cepa dendê1c IE= 9,0) e uma das cepas, apresentou índice enzimático menor que 2,0 (Cepa cacau4p IE= 1,5) (tabela 2) não sendo considerado como um potencial produtor de amilase. Os valores encontrados foram superiores aos descritos por Oliveira et al., (2007) que identificaram a atividade enzimática maior que 2,0 somente em 37% das cepas isoladas. Esse resultado demonstra os potenciais desses isolados na produção da enzima, assim como a adequação das fontes para o isolamento.

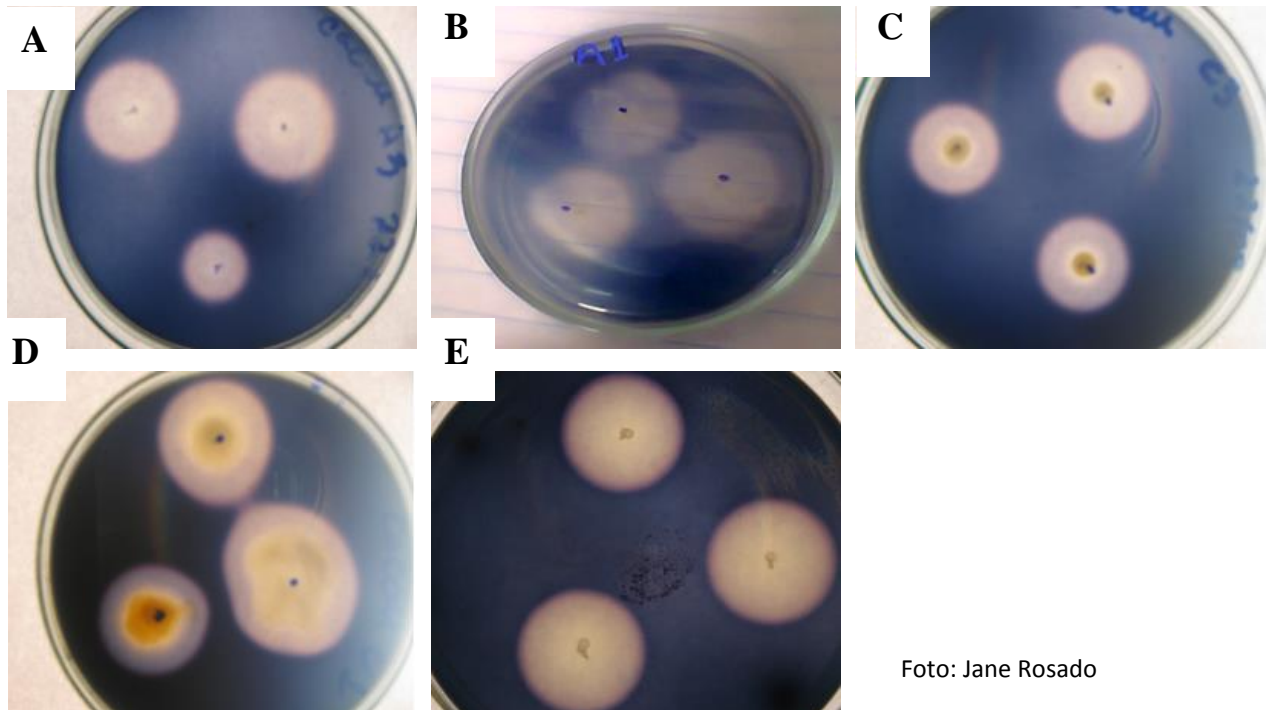


Foto: Jane Rosado

Figura 15: Atividade amilolítica de cepas isoladas de resíduos de cacau e dendê. As placas foram coradas com lugol a 4% após 96 horas de incubação. Em: (A) cepacacau1c, (B) cepacacau2c, (C) cepacacau3p, (D) cepacacau4p e em (E) cepadendê1c.

Tabela 2: Índice Enzimático das cepas amilolíticas dos resíduos do cacau e dendê medidos a cada 24 horas.

Cepas	24h	48h	72h	96h
cepacacau1c	8,0	9,0	11,5	14,0
cepacacau2c	1,3	3,7	6,0	9,0
cepacacau3p	0,8	1,3	2,6	3,0
cepacacau4p	0,2	0,3	1,0	1,5
cepadendê1c	2,5	4,3	6,5	9,0

5.2. Identificação Morfológica das Cepas

As cepas que apresentaram atividade amilolítica foram caracterizadas seguindo o método da coloração de Gram. Após realização do protocolo para coloração, a análise microscópica das lâminas revelou os seguintes morfotipos: Bacilo Gram negativo para as cepas cepacacau1c e cepacacau3p, Bacilo Gram positivo para as cepas cepacacau2c e cepadendê1c e Coco Gram negativo para a cepacacau4p. (Tabela 3).

Tabela 3: Identificação morfológica e Coloração de Gram das cepas que apresentaram atividade amilolítica.

Isolado	Morfotipo / Gram
cepacacau1c	Bacilo G-
cepacacau2c	Bacilo G+
cepacacau3p	Bacilo G-
cepacacau4p	Coco G-
cepadendê1c	Bacilo G+

5.3. Identificação Taxonômica das cepas com atividade amilolítica

A identificação genética foi realizada através da extração do DNA genômico das cepas, classificadas pelo IE, como potenciais produtoras de amilase. A eletroforese do material genético evidencia a qualidade do material obtido (Figura 16). A amplificação parcial do gene ribossomal bacteriano 16S, gene altamente conservado e utilizado na identificação bacteriana (GRAY et

al., 2001; DAMS et al., 1988; WOESE, 1987) foi realizada através da reação da polimerase em cadeia (PCR). As sequências foram analisadas com o auxílio do programa BlastN e de dados do Genbank. A análise das sequências similares identificadas pelo programa BLASTp foram utilizadas para compor a filogenia e permitiram a identificação das seguintes cepas: Cepa cacau1c - *Xanthomonas cordiae*, Cepa cacau2c - *Bacillus subtilis*, Cepa cacau3p *Acinetobacter baumannii*, Cepa dendê1c - *Paenibacillus tundrae* (figura 17).

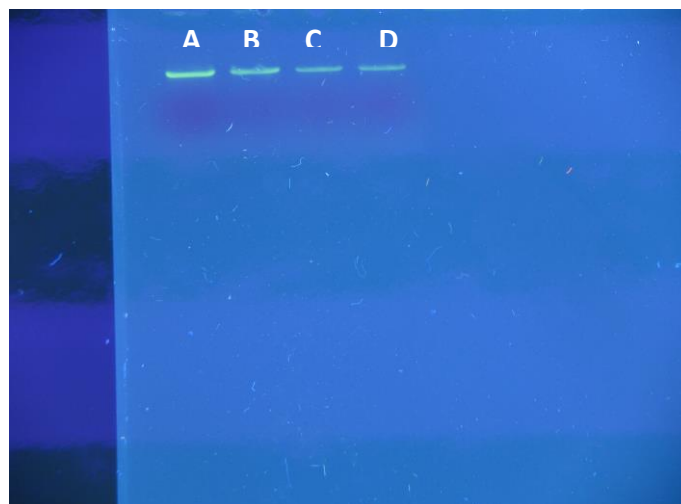


Figura 16: Eletroforese dos produtos de PCR purificados das cepas com atividade amilolítica. Em: A) cepa cacau1c; B) cepa cacau2c; C) cepa cacau3p; D) cepa dendê1c.

O material genético das cepas avaliadas foi enviado para sequenciamento, com exceção do material da cepa cacau4p que apresentou índice enzimático inferior a 2,0, não sendo então considerada como potencial produtora de enzima amilolítica.

Após sequenciamento, as seqüências foram comparadas por similaridade com as linhagens tipo do genbank (www.ncbi.com.br) e o alinhamento de todas as sequências foi realizado com o Clustal W com linhagens tipo com 97% de similaridade. A árvore filogenética e a matriz de similaridade foram geradas com o auxílio do MEGA 4.0, (figura 17).

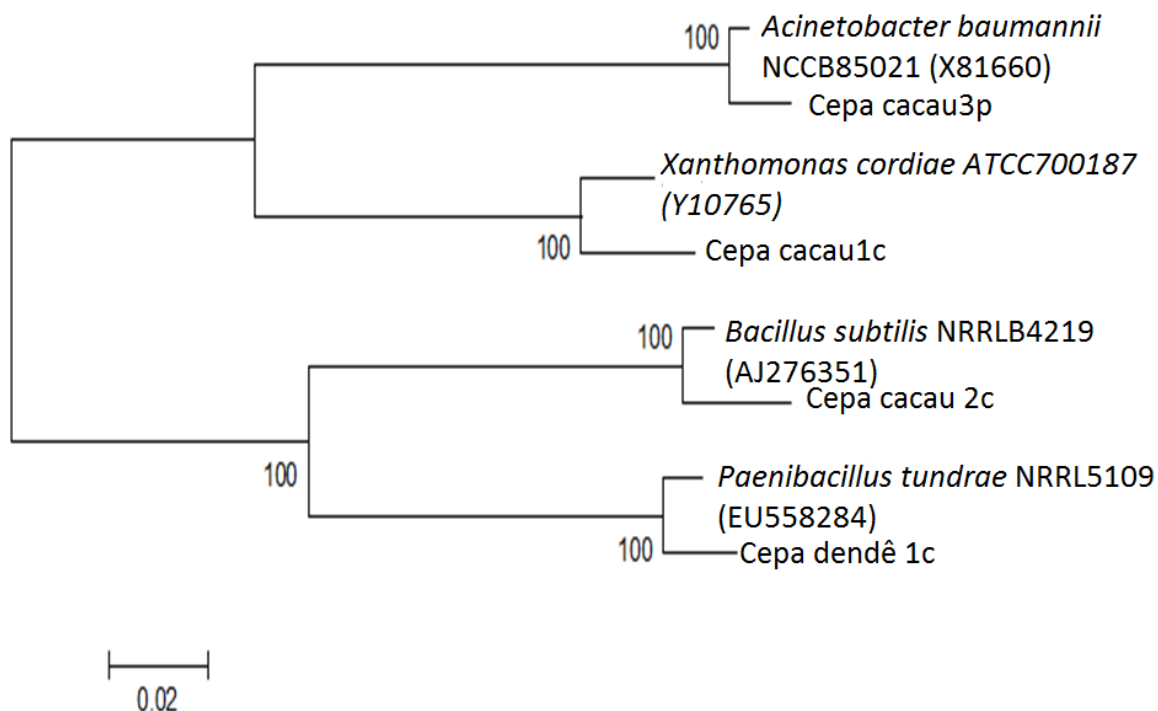


Figura 17: Identificação taxonômica das cepas isoladas dos resíduos do cacau e dendê que apresentaram atividade amilolítica. Árvore filogenética com as espécies tipo com linhagem e “entre parênteses” o número de acesso.

As três espécies isoladas da casca e da polpa dos resíduos de cacau e dendê e identificadas como: Ceca cacau1c - *Xanthomonas cordiae*, Ceca cacau2c - *Bacillus subtilis* e Ceca dendê1c - *Paenibacillus tundrae* são de gêneros comumente isolados de solo (BERGE et al., 2002), água, rizosfera, vegetais, alimentos, raízes de árvores, fezes de insetos (DAANA et al., 2002).

Segundo Borges (2002), o gênero *Xanthomonas* é composto por bactérias fitopatogênicas que afetam cultivares comerciais como o feijão, algodão, banana, tomate, cacau, dentre outros. Por outro lado, algumas espécies desse gênero são capazes de produzir polissacarídeos, especialmente xantana, de grande interesse para as indústrias de alimento, farmacêutica e de petróleo (RUIJSSENAARS, BONT e HARTMANS, 1999). Sobre a espécie *Xanthomonas cordiae*, são escassos os dados na literatura que evidenciam a exploração do seu potencial biotecnológico.

O gênero *Bacillus* compreende um grupo de bactérias em forma de bastonetes que produzem endosporos. Embora as bactérias do Gênero *Bacillus* sejam em geral patogênicas para os seres humanos e demais mamíferos, a espécie *Bacillus subtilis* não apresenta essa propriedade. O

Gênero *Paenibacillus* compreende um grupo de micror-organismos em forma de bastonetes, aeróbios ou anaeróbios facultativos que produzem esporos elípticos (ASH et al., 1993). Alguns são patógenos que causam doenças em larvas e pupas de insetos economicamente importantes (ALLIP e AGUILAR 1998).

Dados da literatura mostram que algumas espécies de *Paenibacillus* e de *Bacillus* produzem antibióticos (PIURI et al., 1998) e enzimas extracelulares como: pectinases (KOBAYASHI et al., 2001), quitinases (TRACHUK et al., 1996), celulases (SANCHEZ et al., 2004), lipases (PRIM et al., 2000), xilanases (GOSALBES et al., 1991), proteases (CHRISTIANSEN e NIELSEN, 2002) e amilases (HAKI e RAKSHIT, 2003). Esse fato os torna interessantes do ponto de vista biotecnológico, podendo consistir em fonte potencial para produção de amilases (GIRARDIN et al., 2002).

O dado mais inusitado que obtivemos foi o isolamento da Cepa cacau3p, identificada como *Acinetobacter baumannii*. Esta espécie é geralmente isolada de materiais clínicos e hospitalares. Trata-se de uma bactéria que parece ter propensão para desenvolvimento de resistência antimicrobiana extremamente rápida, afeta pacientes criticamente doentes em unidades de tratamento intensivo (CISNERO, 2003). Essa espécie possui importância médica por ser capaz de produzir metalo- β -lactamases (MBLs), que segundo Arakawa (2000), são enzimas com atividade sobre vários betalactâmicos, incluindo cefamicinas e carbapenens, e ainda sobre os inibidores de betalactâmicos, como ácido clavulânico e sulbactam. Não foram encontrados na literatura dados que descrevam produção de enzimas de interesse industrial associada a bactérias do gênero *Acinetobacter*. Os dados aqui apresentados merecem investigação posterior.

5.4. Caracterização da Atividade Amilolítica em meio líquido

Na maioria dos processos biotecnológicos que envolvem a hidrólise do amido, a reação se processa em meio líquido. Dessa forma, as cepas que apresentaram índice enzimático acima de 2,0, determinado em meio sólido, Cepa cacau1c, cepa cacau2c, Cepa cacau3p e Cepa dendê1c foram avaliadas em ensaios de caracterização da atividade amilolítica em meio líquido. A

atividade foi determinada monitorando-se em cada tempo pré-determinado (0, 12, 24, 48, 72 e 96 horas) a porcentagem de amido e de açúcares redutores em solução. As cepas cepacacau2c e cepadende1c, após 24 horas de inoculação promoveram a diminuição na concentração de amido em cerca de 70% do valor inicial (figura 18). Essas cepas alcançaram seus pontos de saturação de atividade máxima em 48h e não foi observada a hidrólise total do amido. Cerca de 30% do substrato permaneceu presente no meio reacional sem sofrer hidrólise até 96 horas após a incubação (figura 18). As cepas cacau1c (*Xantomonas cordiae*) e cacau3p (*Acinetobacter baumannii*) produziram hidrólise total do amido no meio reacional em 48 horas após a inoculação (figura 18).

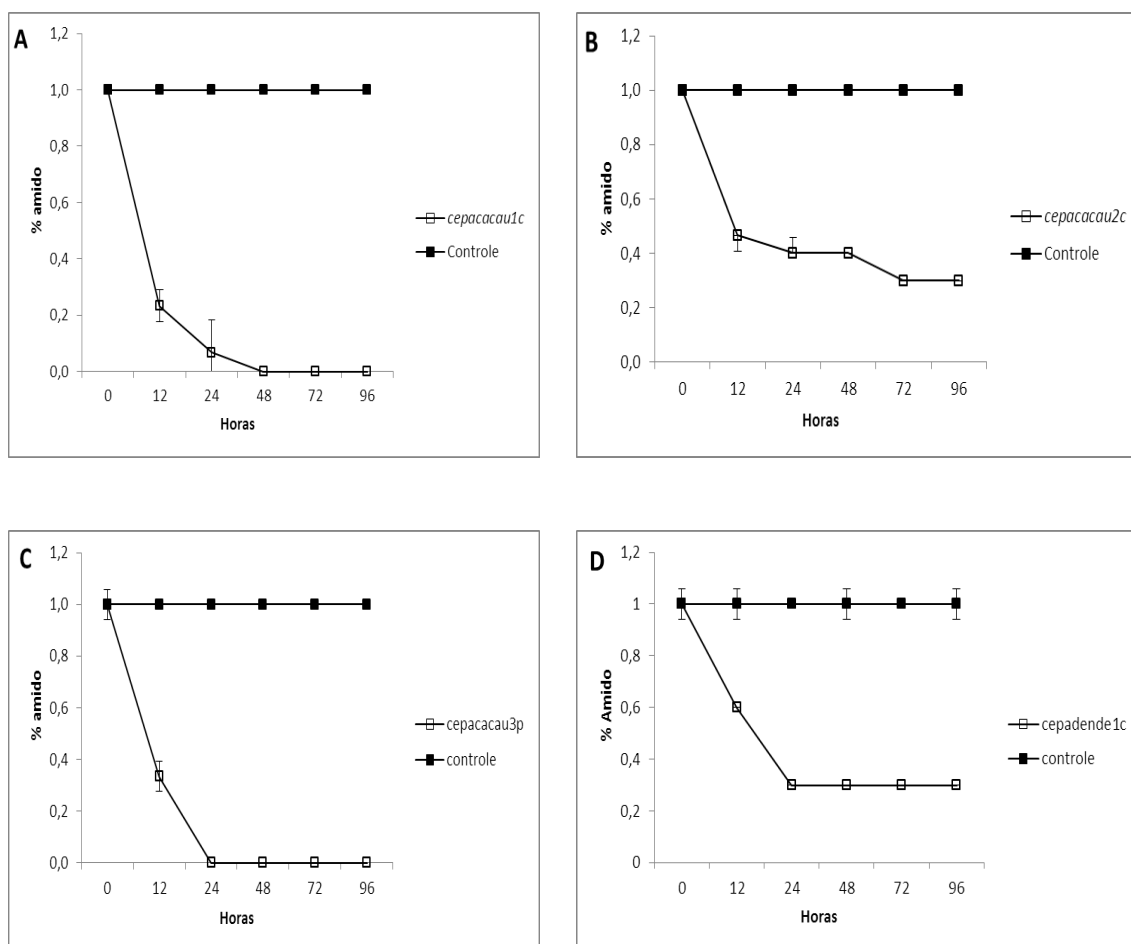


Figura 18: Variação da concentração de amido nos meios em função do tempo e em presença das diferentes cepas. Em: (A) Cepa cacau 1c; (B) Cepa cacau 2c; (C) Cepa cacau 3p; (D) Cepa dende 1c. As alíquotas foram coletadas para determinação da concentração de amido nos tempos especificados.

5.5. Quantificação de açúcares redutores

A concentração de açúcares redutores nas alíquotas analisadas varia em função da hidrólise do amido e da sua utilização como combustível metabólico pelas bactérias presentes no meio. O aumento na concentração de açúcares redutores foi evidenciado nas primeiras 12 horas em presença de todas as cepas testadas (figura 19). Entretanto foi mais intenso para as Cepas cacau2c (*Bacillus.subtilis*) e cacau 3p (*Acinetobacter.baumannii*) (figura 19).

A inibição da produção de amilase pela presença de glicose em solução é conhecida como repressão catabólica (MONTEIRO e ULHOA, 2006; FERNANDES et al., 2007). Em meio de cultivo, a produção ou a liberação da glicose devido à degradação do amido utilizado como indutor e como fonte de carbono, pela ação de amilases excretadas pelos micro-organismos pode inibir a produção da enzima (FERNANDES et al., 2007). A liberação de glicose evidenciada a partir da determinação de açúcar redutor presente em meio de cultivo líquido pode ter sido a causa da inibição da degradação do amido a partir de 24hs observada para a Cepa dendê1c (*Paenibacillus.tundrae*) e na Cepa cacau2c (*Bacillus subtilis*) (figura 19). Esse efeito não foi observado para a Cepas cacau1c (*Xanthomonas.cordiae*) e cacau3p (*Acinetobacter baumannii*), que apresentaram um aumento mais intenso na porcentagem de açúcares redutores nas primeiras 12hs (figura 19) não acompanhado de redução na atividade amilásica, a qual foi capaz de promover hidrólise total do amido (Figura 19). As Cepas cacau1c (*Xanthomonas cordiae*) e cacau3p (*Acinetobacter baumannii*) foram consideradas as mais indicadas para análise de produção da enzima em cultivo líquido por não sofrer repressão catabólica com o aumento da concentração de glicose.

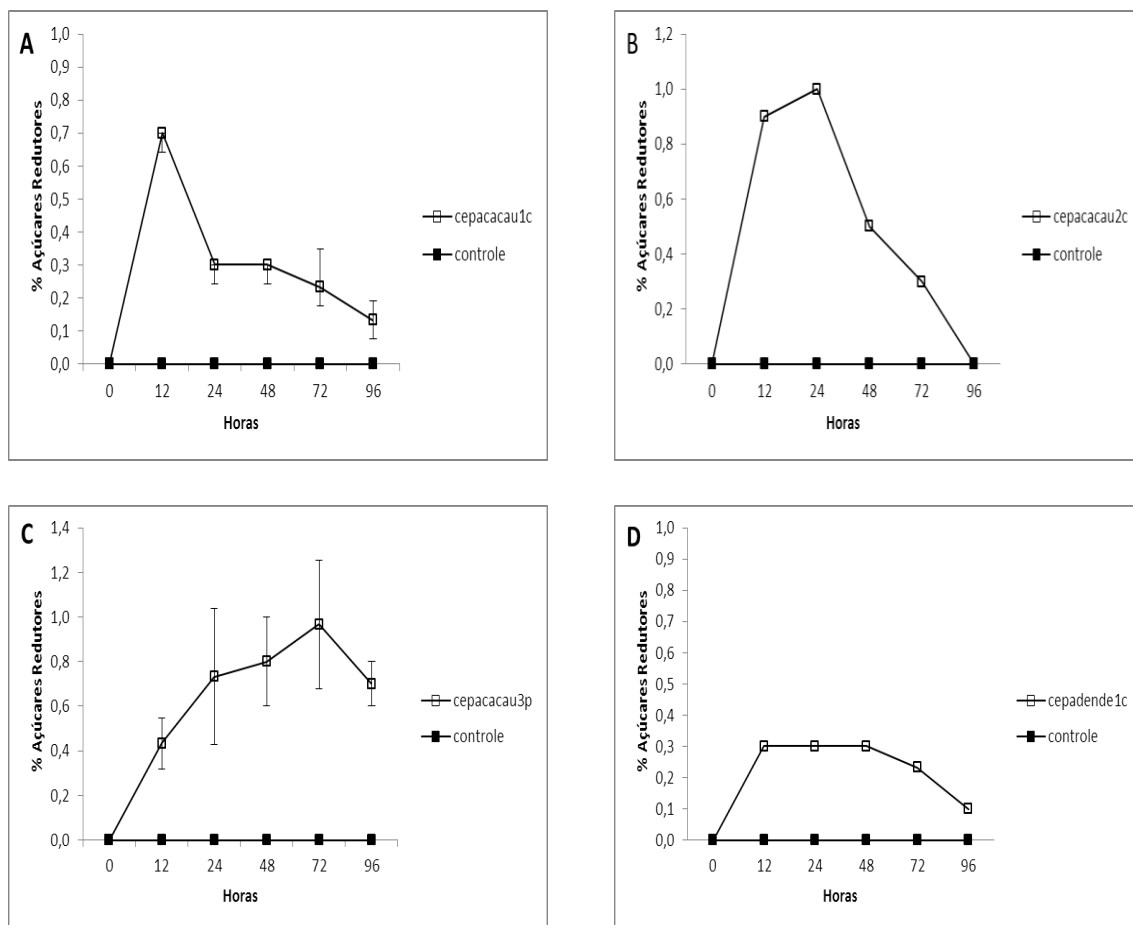


Figura 19: Variação da concentração de açúcares redutores em função do tempo e em presença das diferentes cepas testadas. Em: (A) Cepa cacau 1c; (B) Cepacacau 2c; (C) Cepacacau 3p e em (D) Cepadende 1c.

As velocidades de degradação do amido não se mostraram compatíveis com valores previamente descritos na literatura (SPIER, 2004; MONTEIRO e ULHOA, 2006; FERNANDES et al., 2007) para reações que se processaram na presença de fungos filamentosos. Entretanto, para a utilização de enzimas fúngicas em meio líquido, torna-se necessário etapas de concentração e purificação parcial da enzima, quando há perspectiva de aplicação em processos biotecnológicos (GUPTA et al., 2003). Além disso, as α -amilases fúngicas são mais sensíveis a variações de pH e temperatura quando comparadas às enzimas bacterianas (GUPTA et al., 2003; REED, 1975). Esse fato propicia um maior potencial de aplicação biotecnológica às enzimas bacterianas.

6. CONCLUSÕES

Considerando que o objetivo geral deste trabalho foi selecionar bactérias produtoras de enzimas amilolíticas a partir do isolamento da microbiota presentes em resíduos das lavouras cacauzeiras e dendezeira, pode-se concluir que as técnicas de isolamento, assim como as fontes das amostras de micro-organismos mostraram-se efetivas para a obtenção de micro-organismos produtores de amilases.

- As seguintes cepas bacterianas foram isoladas a partir de resíduos das lavouras cacauzeira e dendezeira: Cepa cacau 1c, Cepacacau 2c, Cepacacau 3p, Cepadende 1c e Cepa cacau4p.
- Entre as bactérias isoladas, quatro apresentaram índice enzimático superior a 2,0: Cepa cacau1c, IE= 14; Cepa cacau2c IE= 9,0; Cepa cacau3p IE= 3,0 e Cepa dendê1c IE= 9,0.
- As cepas isoladas foram identificadas como:
Cepa cacau1c - *Xanthomonas cordiae*,
Cepa cacau2c - *Bacillus subtilis*,
Cepa cacau3p *Acinetobacter baumannii*,
Cepa dendê1c - *Paenibacillus tundrae*.
- Entre as quatro cepas com significativa atividade amilolítica em solução, a cacau1c, *Xantomonas cordiae* além de não ser regulada por repressão catabólica, apresentou o maior índice enzimático (14). Dessa forma, constitui-se no principal alvo para posterior caracterização de propriedades bioquímicas, de modo a determinar suas formas mais prováveis de aplicação em processos biotecnológicos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, A.L.V. **Identificação de Bactérias filamentosas em processos de lamas activadas através da técnica de hibridização in situ de fluorescência (FISH)**, 2004. 142p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia do Ambiente) UM/DEB Braga, Portugal.

ADEWALE, I. O.; AGUMANU, E. N.; OTIHOKORONKWO, F.I. Comparative studies on α -amylases from malted maize (*Zea mays*), MILLET (*Eleusine coracana*) and Sorghum (*Sorghum bicolor*). **Carbohydrate Polymers**, v.22, p. 2-16, 2006.

ALLIP, A.M.; AGUILLAR, O.M. Characterization of isolates of *Paenibacillus larvae susp. larvae* from diverse geographical origin by polymerase chain reaction of Box primers. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.72, p. 21-27, 1998.

ANDRADE, B.E. Dendzeiro: Uma planta que promete progresso para a Amazônia. **Relatório técnico**. Belém: CPATU, 2010.

ASH, C.; PRIEST, F.G.; COLLINS, M.C. Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test. *Antonie van Leeuwenhoek*, v.64, 1993, p.253-260.

ASLTSCUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYER, S.E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v.215, p. 403-410, London, 1990.

ARAKAWA, Y.; SHIBATA, N.; SHIBAYAMA, K.; KUROKAWA, H.; YAGI, T.; FUJIWARA, H. Convenient test for screening metallo- β -lactamase: producing gram-negative bacteria by using thiol compounds. **J. Clin. Microbiol.**, v.38, p.40-43, 2000.

BANNER, D.W. Structure of Chicken muscle triose phosphate isomerase determined by crystallography at 2.5 Å resolution using amino acid sequence data. **Nature**, v. 255, p. 609-614, 1975.

BELITZ, H. D.; GROSCH, W. **Química de los alimentos**. Zaragoza: Acríbia, 1988. 813p.

BEMILLER, J. N. Starch modification: changes and prospects. **Starch/Stärke**, v. 49, n.4, p. 127-131, 1997.

BERGE et al. *Paenibacillus graminis* sp. nov., and *Paenibacillus odorifer* sp. nov., isolated from plant roots. Soil and food. **International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52, p. 607-616, 2002.

BERGEY, D.H.; BREED, R.S. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 7 ed. Baltimore: Williams & Wilkins. 1957.

_____. _____. 8 ed. Baltimore: Williams & Wilkins. 1974

BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. Biocontrole de plantas: Uso e Perspectivas. **Embrapa Meio Ambiente**, 2009. 341 p.

BIGELIS, R. Carbohydrates. In: Nagodawithana, T., Reed, G. **Enzymes in Food Processing**. 3 ed. New York: Academic Press, 1993, p. 121-158.

BON, E.P.S.; FERRARA, M.A.; CORVO, M.L. **Enzimas em biotecnologia – produção, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro: Interciência, 2008. 506p.

BOONE, D.R. & CASTENHOLZ, R.W. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology** 2 ed., Volume One, Springer-Verlag, USA. 2001.

BORGES, C. D. **Caracterização da goma xantana em função da cepa de *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* e das condições operacionais**. Pelotas, 2002, 49 f. (Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, UFPe.

BRENA, B.M. et al. Chromatographic methods for amylases. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v.684, p 217 – 237, Setembro, 1996.

BRENNER, D.J.; STALEY, J.; KRIEG, N. The *Proteobacteria*. Poliphasic Taxonomy. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. New York: Springer-Verlag. 2 ed, v. 2. 2005. p. 43-48.

BRIEN, R. O.; FOWKES, N. Modification patterns in germinating barley malting II. **Journal of Theoretical Biology**, v. 23, p. 315-325, 2005.

BUISSON, G.; DUKE, E.; HASER, R.; PAYAN, F. Three dimensional structure of porcine pancreatic α -amylase at 2.9 Å resolution: role of calcium in structure and activity. **EMBO J.**, v.13, p. 3909-3916, 1987b.

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

CARVALHO, G. G. P., PIRES, A. J. V., SILVA, F. F, VELOSO, C. M., SILVA, R. R., SILVA, H. G. O., BONOMO, P. MENDONÇA, S. S. Comportamento ingestivo de cabras leiteiras alimentadas com farelo de cacau ou torta de dendê. **Pesq. Agropec. Bras.**, Brasília, v.39, n.9, p.919-925, 2004.

CEPEDA, E.; HERMOSA, M.; BALLESTEROS, A. Optimization of maltodextrin hydrolysis by glucoamylase in a batch reactor. **Biotechnology and Bioengineering**, v.76, p.70-76, 2001.

CEPLAC. Participação na produção de cacau em amêndoa, por Estado, no país em 1999. Disponível em : < <http://babelfish.altavista.com./cgi-bin>>. Acessado em maio de 2013.

CEREDA, P. M. Propriedades gerais do amido, **Culturas de tuberosas amiláceas latino americanas**. Fundação Cargill, v. 1, 2001. 221 p.

CLARK, S. C.; HAYES, P. M.; HENSON, C. A. Effects of single nucleotide polymorphisms in β -amylase1 alleles from barley on functional properties of the enzymes. **Plant physiology and biochemistry**, v. 41, p. 798-804, 2003.

CISNERO, J.M.; PACHON, J. *Acinetobacter baumannii*: nosocomial pathogen difficult to control. **Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.**, v. 1, n. 5, p.221-223, 2003.

COELHO, M.A.Z. **Tecnologia Enzimática**. FAPERJ; Petrópolis, RJ: EPUB, 2008. 288p.

COLE, J.; CHAI, B.; FARRIS, R.; WANG, Q.; KULAM, S.; MCGARRELL, D.; GARRITY, G.; and TIEDJE, J. The ribosomal database project (RDP): sequences and tools for high-throughput rRNA analysis. **Nucleic Acids Res.**, v. 33, p.294 – 296, 2005.

COLWELL, R.R. Polyphasic taxonomy of the genus vibrio. Numerical taxonomy of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and related vibrio species. **Journal of bacteriology**, v.104, p.410-433, 1970.

COSTA, J.A.V. **Estudo da Produção de Amiloglucosidase por *Aspergillus Níger* NRRL 3122 em Fermentação Semi-Sólida de Farelo de Arroz**. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos), Universidade Estadual de Campinas, 1996, 203p.

CHRISTIENSEN, T. NIELSEN, J. Production extracellular of proteases and glucose uptake in *Bacillus clausii* in stead state and transient continous culture. **Journal of Biotechnology**, v 97, p. 265-273, 2002.

CURTIS, T.P.; SLOAN, W.T.; SCANNELL, J.W. Estimating prokaryotic diversity and its limits. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.99, p.10494-10499, 2002.

DAANE et al. PAH-degradation by *Paenibacillus* spp. and description of *Paenibacillus naphthalenovorans* sp.nov., a naphthalene-degradating bacterium from rizosphere of salt marsh plants. **International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.52, p.131-139, 2002.

DAMS, E.; HENDRIKS, L.; VAN DE PEER, Y.; NEEF, J.-M.; SMITS, G., VANDENBEMPT, I. WACHTER, R. **Nucleic Acids Res.**, v. 16, (suppl), r87-r175, 1998.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Disponível em: <http://www.embrapa.br>>. Acessado em maio de 2013

EMBRAPA. MATTOS, P.L.P.; CARDOSO, E.M.R. **Cultivo da Mandioca para o Estado do Paraná**: Importância Econômica. Embrapa: Mandioca e Fruticultura. Sistemas de Produção N. 13, Jan. 2003. p.1-2. Disponível em: http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Mandioca/mandioca_para/importancia.htm> Acesso em: junho de 2013.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Suínos e Aves, 2004. Disponível em: <http://www.cnpsa.embrapa.br/?/artigos/2003/artigo-2003n019.html; ano=2003>. Acesso maio de 2013.

EMBRAPA SOLOS. Zoneamento agroecológico do dendezeiro para as áreas desmatadas da Amazônia legal (**Relatório-síntese**), Rio de Janeiro, 2010. Disponível em: <http://www.cnps.embrapa.br/> >acessado em maio de 2013.

ENEJE, L.O.; OGU, E.O.; ALOH, C.U.; ODIBO, F.J.C.; AGU, R.C.; PALMER, G.H. Effect of steeping and germination time on malting performance of Nigerian white and yellow maize varieties. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 1013–1016, 2004.

ENZIMAS. Enzimas e Cinética Enzimica. 2005. Disponível em: http://users.med.up.pt/ruifonte/PDFs/PDFs_arquivados_anos_anteriores/2006-2007/enzimas_e_cinética_enzimica.pdf> Acessado em maio de 2013.

ENZIMAS. As Enzimas nos Alimentos. Aditivos e Ingredientes: Editora Insumos. 2008. Disponível em: http://www.insumos.com.br/aditivos_e_ingredientes/materias/80.pdf> acessado em maio de 2013.

ENZIMAS. Enzimas em Panificação. Aditivos e Ingredientes: Ed. 36, Nº62ºA, Editora Insumos. 2009. Disponível em: http://www.insumos.com.br/aditivos_e_ingredientes/materias/118.pdf> Acessado em maio de 2013.

EUZEBY, J.P. (2008). Listo f prokariotic names with standing in nomenclature copyright 1997-2009. Disponível em: <http://www.bacterio.net>>. Acessado em junho de 2013.

FELLOWS, P. **Tecnología del Procesado de Los Alimentos**: Princípios e Práticas. Zaragoza: Editorial Acribia, 1994. p.172-177.

FELSENSTEIN, J.; KUHNER, M. K.; J. YAMATO. Estimating effective population size and mutation rate from sequence data using Metropolis-Hastings sampling. **Genetics**, v.140, p. 1421-1430, 1995.

FERNANDES, M.L.M.; SAAD, E.B.; MEIRA, J.A.; RAMOS, L.P.; MITCHELL, D.A.; KRIEGER, N. Esterification and transesterification reactions catalysed by

addition of fermented solids to organic reaction media. **J. Mol. Catal. B. Enzym.**, v. 44, p. 8-13, 2007.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **Anual Agriculture Statistics**. Rome: FAO, 2010. 368 p.

FOX, G.E.; PECHMAN, K.R.; WOESE, C.R. Comparative cataloging of 16S ribosomal ribonucleic acid: molecular approach to prokaryotic systematics. **International Journal of Systematics Bacteriology**, v. 27, p. 44–57, 1977.

FREIRE, E. S.; ROMEU, A. P.; PASSOS, F. V. **Aproveitamento de resíduos e subprodutos da pós-colheita do cacau**. Ilhéus: CEPLAC/CEPEC, 1990. 24p.

FREITAS, R. F.; PICOLI, S. U. **A coloração de Gram e as variações na sua execução**. Centro Universitário de Feevale – Laboratório de Biomedicina. News Lab, Ed. 2007. 82p.

FURLAN JÚNIOR, J.; KALTNER, F. J.; AZEVEDO, G. F. P. et al. **Biodiesel: Porque tem que ser dendê**. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, Palmasa, 2006. 205p.

GASQUES, J. G.; BASTOS, E. T. 2003. Crescimento da Agricultura. **Boletim de Conjuntura**, nº 60. Disponível em: http://www.agriculturasamazonicas.ufpa.br/.../José_Garcia_Gasques_&_Eliana_Telest.>. Acesso em junho de 2013.

GEORG-KRAEMER, J.E.; MUNDSTOCK, E. C.; CAVALLI-MOLINA, S. Developmental expression of amylases during barley malting. **Journal of cereal science**, v. 33, p.279-288, 2000.

GIRARDIN, H.C. et al. Antimicrobial Activity of food borne *Paenibacillus* and *Bacillus* spp. Against *Clostridium botulinum*. **Journal of food Protection**, v.65, p.806-813, 2002.

GOES, K.G.P.; ANDRADE, D.S.; AMARAL, H.F.; RIGONATO, J. Caracterização fenotípica de isolados de *Frankia* sp de Casuarinaceas. **Rev. Brasileira de Agroecologia**, v. 2, 2007.

GODOY, M. G. **Produção de lipase microbiana e dextoxificação simlutânea de rejeitos agroindustriais**. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos) Instituto de Química, da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Rio de Janeiro, RJ. 2009.

GOMES, M.; BIONDI A.; BRIANEZI, T.; GLASS, V. **O Brasil dos agrocombustíveis: Impactos das Lavouras sobre a Terra, o Meio e a Sociedade - Gordura Animal, Dendê, Algodão, Pinhão-Manso, Girassol e Canola**. Centro de Monitoramento dos Agrocombustíveis, 2009, 69p.

- GOODFELLOW, M. **Microbial systematics: background and uses**. In: Applied Microbial Systematics Priest, F.G. & Goodfellow, M. (eds), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. 2000.
- GOZALBES, R. et al. Two β -glucanases genes are clustered in *Bacillus polymyxa*: Molecular cloning, expression and sequence analysis of genes encoding a xylanases and an endo- β -(1,3)-(1,4)-glucanase. **Journal of Bacteriology**, v. 173. p.7705-7710, 1991.
- GRAMINHA, E.B.N.; GONÇALVES, A.Z.L.; PIROTA, R.D.P.B.; BALSALOBRE, M.A.A; GOMES, E.R.S. Enzyme production by solid-state fermentation: Application to animal nutrition. **Animal Feed Science and Technology**, v. 144, p. 1–22, 2008.
- GRAY, N.D.; HEAD, I.M. Linking genetic identity and function in communities of uncultured bacteria. **Environmental Microbiology**, v.3, p. 481-492, 2001.
- GRIFFITHS, A.J.F. et al. **Introdução a genética**. 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2000. p.194-197, 344-345.
- GUERREIRO, R. T.; SILVEIRA, R. M. B. **Glossário ilustrado de fungos: termos e conceitos aplicados à micologia**. Porto Alegre: Universidade/ UFRGS, 1996.
- GUPTA, R.; MOHAPATRA, H.; GOSWAMI, V.K.; CHAUHAN, B. Microbial α -Amylases: a Biotechnological Perspective. **Process. Biochem.**, v.38, p. 389-393, 2003.
- HARGER, C.; SPRADA, D.; HIRATSUKA, E. **Amilase Fúngica**. In: Bioquímica das Fermentações, 1982. 56p.
- HAKI,G.D.; RASKSHIT, S.K.Developments in Industriale importante thermostable enzymes: a reiew. **Bioresource Thechnology**, v. 89, p. 17-34, Oxford, 2003.
- HANDELSMAN, J. Metagenomics: Application of Genomics to Uncultured Microorganisms. **Microbiol Mol Biol Rev.**, v. 68, p.669-685, 2004.
- HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. L. The Use of Solid Media for Detection of Enzyme Production by Fungi. **Mycological Society of America**, v. 67, n. 3, p. 597-607, 1975.
- HEIJDEN, M.G.A.; BARDGETT, R.D.; STRAALLEN, M.N. The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. **Ecology Letters**, v.11, p.296–310, 2008.
- HIZUKURI, S. Starch: analytical aspects. In: Eliasson A-C. **Carbohydrates in food**. New York: Marcel Dekker; 1996. p. 347-429.

HOLDEN, M.T.G.; TITBALL, R.W.; PEACOCK, S.J. **Genomic plasticity of the causative agent of melioidosis, *Burkholderia pseudomallei***. PNAS. 101. 2004. p. 14240-14245.

HORIMOTO, L. K.; CABELLO, C. Propriedades Viscográficas de Amidos de Mandioca, Batata Doce e Mandioquinha Salsa Nativos e Cationizados por Diferentes Tratamentos. **Energia na Agricultura**, v. 22, n.3, p. 74-85, 2007.

HOLT, J.G **Bergey's manual of determinative bacteriology**. Maryland: Williams and Wilkins, 1994. 787p.

ILUYEMI, F. B., HANAFI, M. M., RADZIAH, O. KAMARUDIN, M. S. Fungal solid state culture of palm kernel cake. **Bioresource Technology** 97, p.477–482, 2006.

INDECA (2011). PORTA BRASIL FATOR. Encontro sobre a lavoura do cacau em Rondônia. Disponível em: www.indeca.com.br/clipping/fator_brasil_julho11.pdf. Acesso em junho de 2013.

JANECEK. Domain evolution in the α -amylase family. **Journal of Molecular Evolution**. 45, p.322-331, 1997.

JOHNSON, T.J.; SKYBERG, J.; NOLAN, L.K. Multiple Antimicrobial Resistance region of a putative virulence plasmid from an *Escherichia coli* Isolate Incriminated in avian colibacillosis. **Avian. Disease**, v.48, p. 351-360, 2004.

JUGE, N.; NOHR, J.; GAL-COËFFET, M. F.; KRAMHØFT, B.; FURNISS, C. S. M.; PLANCHOT, V.; ARCHER, D. B.; WILLIAMSON, G.; SVENSSON, B. The activity of barley α -amylase on starch granules is enhanced by fusion of a starch binding domain from *Aspergillus niger* glucoamylase. **Biochemical et biophysica (BBA) – Proteins & Proteomics**, v. 1764, p. 275–284, 2006.

JUKES, T.; CANTOR, C. **Evolution of protein Molecules**. Mammalian Protein Metabolism. Academic Press, New York. 1969.

KAGAWA, M. et al. Crystal Structure of *Bacillus subtilis* α -amilase in complex with acarbose. **Journal of Bacteriology**, v.185, n.23, p. 6981-6984, 2003.

KIELING, D. D. **Enzimas – Aspectos Gerais**. Trabalho (Disciplina de Engenharia Bioquímica)- Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2002.

KIM, S.J.; LEE, C.M.; HAN, B.R.; KIM, M.Y.; YEO, Y.S.; YOON, S.H.; KOO, B.S.; JUN, H.K. Characterization of a gene encoding cellulase from uncultured soil bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, n. 282, p. 44–51, 2008.

KITAMURA, P. C. Dendê: Oferta e demanda no mercado internacional. Belém: EMBRAPA/CPATU, 1990. 24p. (documentos, 51).

KIRK, O.; BORCHERT, T.V.; FUGLSANG, C.C. Industrial enzyme applications. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p. 345-351, 2012.

KOBAYASH et al. Purification and Properties of a high-molecular-weight, alkaline exopolygalacturonase from a strain of *Bacillus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.29, p. 70-75, 2001.

KOSHLAND. Stereochemistry and the mechanism of Enzymatic reactions. **Biological Reviews**, v.28,p.416-436, 1953.

KUNZE, W. Technology brewing and malting. Research and teaching institute of brewing, 1996. Disponível em: <<http://www.vlbberlin.org/english/kunze/enzym.htm>>. Acesso em maio de 2013.

LANE,D.L.; PACE,B.; OLSEN,G.J.; STAHAL, D.A.; SOGIN,M.L.; PACE,N.R. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. **Proceedings of the National Academic of Science**. 1985. p. 6955-6959.

LEADLAY, P. F. **An Introduction to Enzyme Chemistry**. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 1993.

LEHNINGER, A. L. **Enzimas**. Bioquímica: tradução da 2ª. edição americana, supervisão: José Reinaldo Magalhães. São Paulo, Edgard Blucher, 1976.

_____.NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. 3 ed. São Paulo: Sarvier, p.839, 2002.

_____.; _____. 5 ed. São Paulo, Brasil: Sarvier, 2007.

LEMOS, C. M. Y., FUCHS, E., GOMES, E., SILVA, R. da. Glucoamilase: Estrutura e termoestabilização. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, ed.31 jul./dez. 2003

LEMOS, J. L. S. Seleção de microrganismos para a produção de xilanases em bagaço de cana-de-açúcar. CETEN (2006). Disponível em: <http://www.cetem.gov.br/publicação/cetem_sta_35.pdf> Acessado em maio de 2013.

LIN, W.L.; FELDBERG, R.S.; CLARK, E.D.B. Kinetics of Cell Growth and Heterologous Glucoamylases Production in Recombinant *Aspergillus nidulans*. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 41, p. 273-279, 1993.

MACGREGOR, E.A.; JANECEK, S.; SVENSSON, B. Relationship of sequence and structure to specificity in the α -amylase family. **Biochim. Biophys., Acta**, v.1546, p.1–20, 2001.

MACIEL, G. M. **Desenvolvimento de bioprocesso para produção de xilanases por fermentação no estado sólido utilizando bagaço de cana de**

- açúcar e farelo de soja.** 2006.133p. Dissertação (Mestrado em Processos Biotecnológicos) Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.
- MACKENZIEA, D. A.; JEENES, D. J.; GOU, X.; ARCHER, D. B. Molecular basis of glucoamylase over production by a mutagenised industrial strain of *Aspergillus niger*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.26, p.193-200, 2000.
- MAURER, R. Practitioner's Guide to Plant Based Digestive Enzymes. Original Internist, 2003.
- MDIC- Ministério de Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior- Nutrição Animal, MDIC aponta para prioridades de investimentos. **Rev. Alimentos e Bebidas**. 2012.
- MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chem.**, v. 31, p. 426-8, 1957.
- MOHAN, B.H.; GOPAL, A.; MALLESHI, N.G.; THARANATHAN, R.N. Characteristics of native and enzymatically hydrolyzed ragi **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, coracana and rice (*Oryza sativa*) starches. *Carbohydrate polymers*, v.59, 2005. p.43-50.
- MOLINA-CANO, J.L.; RUBIÓ, A.; IGARTUA, E.; GRACIA, P.; MONTOYA, J.L. Mechanisms of malt extract development in barleys from different European regions. II. Effect of barley hordein fractions on malt extract yield. **Journal of the Institute of Brewing**, v.106, p. 117–123, 2000.
- _____. J. L.; POLO, J. P.; ROMERA, E.; ARAUS, J.L.; ZARCO, J.; SWANSTON, J.S. Relationships between barley hordeins and malting quality in a mutant of cv. Triumph I. Genotype by environment interaction of hordein content. **Journal of Cereal Science**, v.34, p. 285–294, 2001.
- MONTEIRO, V.N.; ULHOA, C.J. Biochemical Characterization of a β -1,3 Glucanase from *Trichoderma koningii* Induced by Cell Wall of *Rhizoctonia solani*. **Current Microbiology**. v. 52, p. 92-99, 2006.
- MONDAL, P,C,B.; MAJUDER and MOHANTY, B.J Laboratory Based Approaches for Arcenic remediation from contaminated water: Recent Developments. **J.Has. Mat. B.**, v. 137, p. 464-479, 2006.
- MOREIRA, F.G.; LIMA, F.A.; PEDRINHO, S.R.F.; LENARTOVICZ, V.; SOUZA, C.G.M.; PERALTA, R.M.; Production of amylases by *Aspergillus tamaritii*. **Rev Microbiol.**, v.30. p. 157-62, 1999.
- MÓTYÁNA, G.S. Computer-aided subsite mapping of α -amylases. **Carbohydrate Research.**, v. 346, p. 410-415, 2011.
- MÜLLER, A.A.A.; BOTELHO, E. Aspectos gerais sobre a fenologia da cultura da palma de óleo. In Zoneamento Agroecológico, Produção e Manejo para a Cultura da Palma de Óleo. Rio de Janeiro: **Embrapa Solos**, 2010. 216 p.

NATURE Genomics and Taxonomy for all, Vol. 417, Issue 6889, 2002, 573p.

NETO, A. R.; VELOSO, C. M.; SILVA, F. F.; MENEZES, D. R.; OLIVEIRA, H. C.; AZEVEDO, S. T.; PINHEIRO, A. A.; JUNIOR, H. A. S.; ALMEIDA, P. J. P.; PEREIRA, M. M.; DIAS, D. L. S. **Farelo de cacau na dieta de novilhas leiteiras: viabilidade econômica**. ABZ (Associação Brasileira de Zootecnistas). João Pessoa, PB – UFPB/ABZ. 2008.

NGUYEN, Q. D.; REZESSY-SZABO, J. M.; CLAEYSSENS, M.; STALS, I.; HOSCHKE, A. Purification and Characterization of Amylolytic Enzymes from Thermophilic Fungus *Thermomyces lanuginosus* strain ATCC 34626. **Enzyme and Microbial Technology**, v.31, n. 3, p. 345-352, 2002.

NIELSEN, J.E.; BORCHERT, T.V. Protein engineering of bacterial α -amylases. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1543, p. 253-274, 2000.

NUNES, A; FARIA, A.P.S.; STEINMACHER, F. R; VIEIRA, J.T.C. **Processos enzimáticos e biológicos na panificação**. (Universidade Federal de Santa Catarina), Florianópolis. 2006. p.6-10.

OLIVEIRA, A. N.; OLIVEIRA, L, A.; ANDRADE, J. S.; JUNIOR, C. **Produção de Amilase por Rizóbios, usando farinha de pupunha como substrato**: Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, v. 27, n. 1, 2007. p.61-66.

PANDEY, A.; SELVAKUMAR, P.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P. Solid-state fermentation for the production of industrial enzymes. **Curr. Sci.**, v. 77, n. 1, p.149-162, 1999.

_____.Advances in microbial amylases. **Biotechnol. Appl. Biochem.**, v. 31, n. 2, p.35-152, 2000.

_____. **Enzyme Technology Ind** ed. New Delhi: Asiatech Publishers. 2005. 760p.

PARIZA, M. W.; JOHNSON, E. A. Histórico das Enzimas. WORKSHOP – As Enzimas Industriais na Produção de Alimentos. 2002. Disponível em: <http://www.anbio.org.br/eventos/worksh52.htm> Acesso em: maio de 2013.

PARK, Y.K.; SANTI, M.S.S. Induction of High Amyloglucosidase Producing Mutant from *Aspergillus awamori*. **Journal of Fermentation Technology**. v. 55, p. 93-195, 1977.

PASTORE, M. G. **Uso de Enzimas nas Indústrias de Alimentos**. 2010. UNICAMP. Disponível em: http://www.anbio.org.br/palestras/palestra_glaucia.ppt. Acesso maio de 2013.

PAUL, E.A.; CLARK, F.E. **Soil Microbiology and Biochemistry**. 2 ed. Academic Press: New York, N.Y.1996

PAYNE, G.W.; VANDAMME, P.; MORGAN, S.H.; LIPUMA, J.J.; COENYE T.; WEIGHTMAN, A.J.; JONES, T.H.; MAHENTHIRALINGAM, E. Development of a *recA* gene-based identification approach for the entire *Burkholderia* genus. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 7, p.3917-3927, 2005.

PERES, A. S. F **A cadeia produtiva do cacau**. In: Agronegócio Brasileiro: ciência, tecnologia e competitividade. 2 ed. Brasília: CNPq, 1998.

PIRES, A. J. V.; VIEIRA, V. F.; SILVA, F. F.; VELOSO, C. M.; SOUZA, A. L.; OLIVEIRA, T. N.; SANTOS, C. L.; CARVALHO, G. G. P. Níveis de Farelo de Cacau (*Theobroma cacao*) na alimentação de bovinos. **Revista Eletrônica de Veterinária**. REDVET ISSN., v. VI, n. 2, p.1695-7504, 2005.

PIURI, M.; RIVAIZ, C.S.; RUZAL, S.M. A novel antimicrobial activity of a *Paenibacillus polymixa* strain isolated from regional fermented sausages. **Letters in Applied Microbiology**, v.27, p.9-13, London, 1998.

PRAKASH, H.; JAISWAL, T.S. α -amilase: An ideal representative of thermostable Enzymes. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 167, n. 7, p.2123-2124, 2009.

PRIM, D. et al. A gene coding for a cell-bound esterase from *Paenibacillus sp.* PB-23, is a new member of the bacterial subclass of class B carboxylesterases. **Research in Microbiology**, v.151. p. 303-313, 2000.

REED, G. **Enzymes in Food Processing**. 2.ed. New York: Academic Press Inc., 1975. p. 62-87.

REDDY, N. S.; NIMMAGADDA, A.; RAO, K. R. S. S. An overview of the microbial α -amylase family. **Afr. J. Biotechnol.**, v. 2, n. 12. p.645-648, 2003.

REGULY, J.C. **Biotecnologia de Processos Fermentativos e suas Matérias-Primas**. Pelotas: UFPEL, 1996. 321p.

ROCHA, C.P. **Otimização da Produção de Enzimas Por *Aspergillus niger* em Fermentação em Estado Sólido**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) Engenharia Química de Universidade Federal de Uberlândia, 2010.

RODRIGUES FILHO, J.A.; CAMARÃO, A.P.; LOURENÇO JUNIOR, J. de B. Avaliação de subprodutos agroindustriais para a alimentação de ruminantes. **Embrapa Documentos**, 71, Belém: Embrapa-CPATU, 1993.

_____; GUIMARÃES, C.M.C.; **Consumo voluntário e digestibilidade “in vitro” de misturas constituídas parcialmente de subprodutos disponíveis no Estado do Pará**. Belém: EMBRAPA/CPATU, 1994.

_____; AZEVEDO, G. P. C. Utilização da Torta de Amêndoa de Dendê na Alimentação de Ruminantes. **Embrapa Documentos** 111- Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2001.

RUIJSSENAARS, H. J.; BONT, J.A.M.; HARTMANS, S. A pyruvated mannose specific xanthan lyase involved in xanthan degradation by *Paenibacillus alginoliticus* XL-1. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, p.2446-2452, Washington, 1999.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 4, p. 406-425, 1987.

SAHLSTRÖM, S.; BAEVRE, A. B.; BRÅTHEN, E. Impact of starch properties on hearth bread characteristics. II. Purified A- and B-granule fractions. **J. Cereal Sci.**, v.37, p. 285–293, 2003.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. **Molecular Cloning**: a Laboratory manual, 3 ed. Cold Spring Harbor Lobortory Press, Cold Spring Harbor, New York: CSHL, 2001.

SANCHEZ, M.M. et al. Synergistic activity of *Paenibacillus* sp. BP-23 cellobiohydrolase Cel48C in association with the contiguous endoglucanase Cel9B and with endo- or exo-acting glucan- ases from *Thermobifida fusca*. **Biotechnol Bioeng**, v. 87, p. 161–169, 2004.

SANTANA, R,S,M. **Produção de enzimas amilolíticas através da Fermentação em estado sólido**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. 2012.

SANT'ANNA JUNIOR, G. L. **Produção de Enzimas microbianas**. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. (Coords.). *Biotecnologia industrial - processos fermentativos e enzimáticos*. São Paulo: Edgard Blücher Ltda., 2001. p.351-362.

SANTOS, S. F. M.; NÓBREGA, J. E.; PINTO, G. A. S.; MACEDO, G. R.; SILVA, F. L. H. Caracterização do resíduo seco do pendúculo de cajú para obtenção de pectinases por fermentação semi-sólida. In: **Simpósio Nacional De Bioprocessos**, Recife, 2005.

SANTOS, E. A. **Caracterização de dendezeiros subespontâneos com base na produção de frutos e cachos**. Dissertação (Mestrado em Melhoramento de Plantas e Biotecnologia). Universidade Estadual do Oeste da Bahia - UESC, Ilhéus, BA, 2010.

SENA, J. V. C. **Informe Rural Etene**. Banco do Nordeste. Ano V – Fevereiro de 2011 nº02.
Disponível em: <http://www.bnb.gov.br/content/aplicacao/etene/etene/docs/ire_a_no5_n2.>. Acessado em maio de 2013.

SERVIOUR, R.J.; LINDREA, K.C.; GRIFFITHS, P.C.; BLACKALL, L.L. In: SERVIOUR, R. J. & BLACHALL, L.L. (eds). **The Microbiology of Activated** Springer-Verlag. New York: LLC, 1999, p.44-47.

SNEATH, P.H.A.; SOKAL, R.R. **Numerical taxonomy**. The principles and practice of numerical classification. San Francisco, W.H. Freeman. 1973.

SILVA, D.; TOKUIOSHI, K.; MARTINS, E.; SILVA, R.; GOMES, E. Production of pectinase by solid-state fermentation with *Penicillium viridicatum* RFC3. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, n. 4, p. 318-324, 2005.

SILVA, C.M.M.; ARAGÃO, M.S.; LIMA, M.J.O. **A logística reversa de resíduos sólidos da casca e da fibra da amêndoa do dendezeiro**: Estudo de caso empresa Agropalma. (Trabalho de Conclusão de Curso). Pará, 2011.

SILVA-RODRIGUES, M.B.; LIMA,C.J.B.;SOARES, S. E.; MOREAU, V. H.;FERRÃO-GONZALES,A.D. Hidrólise da casca do coco do dendê por fermentação em estado sólido para aplicação na produção de bioetanol.7º **Congresso Internacional de Bioenergia**, São Paulo, 2012.

SOCCOL, C.R.; ROJAN, P.J.; PATEL, A.K.; WOICIECHOWSKI, A.L.; VANDENBERGHE, L.P.S.; PANDEY, A. **Glucoamylase**. In: Enzyme Technology. New Delhi: Asiatec Publishers Inc., 2005. p.221-230.

SOUZA, E.L. Produção e Caracterização de α -Amilase Produzida por *Rhizopus* sp. **Arq. Biol. Tecnol.**, v. 39, n.4, p. 831-839, dez, 1996.

SPIER, M.R.; WOICIECHOWSKI, A. L.; SOCCOL, C. R. Produção de α -Amilase por *Aspergillus* em Fermentação no Estado Sólido de Amido de Mandioca e Bagaço de Cana-de-Açúcar. VI SEMINÁRIO BRASILEIRO DE TECNOLOGIA ENZIMÁTICA. **Anais** Enzitec 2004. Rio de Janeiro: Enzitec. v. 1. 2004. p.116-116.

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

_____. Production and characterization of amylases by *Aspergillus niger* under solid fermentation using agro industrial products. **J. Food Eng.**, v.2. n. 6, p.1-19, 2008.

STACKEBRANDT, E.; GOEBEL, B.M. A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. **Int Journal Syst. Bacteriol.**, v.44, p.846-849, 1987.

STAMFORD, T. L. M.; ARAÚJO, J. M.; STAMFORD, N. P. Enzymatic Activity of micro-organisms isolated from yam bean legume (*Pachyrhizus erosus* L. Urban) (*Pachyrhizus erosus* L. Urban). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 18, p. 382-385, 1998.

SURMELY, R.; ALVAREZ, H.; CEREDA, M.P.; VILPOUX, O.F. **Hidrólise do Amido**. In: Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas. v.3. Cap. 15. 2003. p.377-395.

SZAKACS, G. Production of Industrial Enzymes in Solid-State Fermentation. In: **Anais** International Congress on Bioprocess in Food Industries, Clermont-Ferrand, France. v. 1. 2004, 20 p.

TAMURA, K.; NEY, M. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Mol Bio Evol.**, v. 10, p. 512-526, 2007.

THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; IGGINS, D. G. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. XX, p.4876-4882, 1997.

TRACHUC et al. Chitanases of *Bacillus lincheniformis* B-6839: isolation and properties. **Canadian Journal of Microbiology**, v.42, p. 307-315, Ottawa, 1996.

TUNGA, R.; TUNGA, B.S. **Extra-cellular Amylase Production by Aspergillus oryzae Under Solid State Fermentation**. International Center for Biotechnology. Japan: Osaka University, 2003. 12p.

UITDEHAAG, J.C.M. X- ray structures along the reaction pthway of Cyclodextrin glycosyltransferase elucidate catalysis in the α -amylase family. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 6, p. 432-436, 1999.

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

VANDAMME, P.; POT, B.; GILLIS, M.; DE VOS, P.; KERSTERS, K.; SWINGS, J. Polyphasic Taxonomy, a Consensus Approach to Bacterial Systematics. **Microbiological Reviews**, v. 60, n. 2, p.407–438, 1996.

VARGAS, G. D. L. P. **Estudo da produção de lipase por *Penicillium simplicissimum* utilizando torta de soja como substrato**. Dissertação (Mestrado em Engenharia dos Alimentos), Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – Rio Grande do Sul. 2006.

VOET, D.; VOET, J.G. **Bioquímica**. 3 ed. Porto Alegre: ARTMED, 2006. 1596p.

XIAO, Z.; STORMS, R.; TSANG, A. A quantitative starch–iodine method for measuring alphaamylase and glucoamylase activities. **Analytical Biochemistry**, v.351, p.146-148, 2006.

WANDERLEY, M.D.; NEVES, E.; ANDRADE, C.J. Aspecto da produção industrial de enzimas. **Rev. Citino (Hestia)**, v. 1, n. 1, p. 30-36, 2011.

WARD, O. **Biotecnología de La Fermentación: Principios, Procesos e Productos**. Zaragoza: Editorial Acribia S.A., 1989. p. 64-67 e 233-247.

WOESE, C. R. & FOX, G. E. (1977) **J. Mol. Evol.**, in press.

WOESE, C.R. **Microbiol. Rev.**, 51, 1987. p.221-271.

WULFF, N.A., CARRER, H. & PASCHOLATI, S.F.. **Expression and Purification of Cellulase Xf818 from Xylella fastidiosa in Escherichia coli**. Current Microbiology. 53, 2006. p.198 –203.

YAP, W.H., ZHANG, Z. & WANG, Y. Distinct types of rRNA operons exist in the genome of the actinomycete *Thermomonospora chromogena* and evidence for horizontal transfer of an entire rRNA operon. **Journal of Bacteriology**. 1999.181: 5201–5209.

ZANIN, G. M. **Sacarificação de Amido em Reator de Leito Fluidizado com Enzima Amiloglucosidase Imobilizada**. Campinas, 1989. (Tese de Doutorado em Engenharia de Alimentos). FEA, UNICAMP.



Seleção e identificação de micro-organismos produtores de amilases isolados da microbiota associada a resíduos agrícolas de cacau e dendê

Jane Gleide Rosado de Jesus^{ab}, Gladysinay de Sousa Lessa^a, Thiago Bruce Rodrigues^a, Astrina Dias Ferrão-Gonzales^a, Elisabete Freire^{ab,c}, Samira Abdala Hanna^b, Vitor Hugo Moreau^{ab}

^aNúcleo de Biotecnologia (NuBioTec), Faculdade de Tecnologia e Ciências (FTC), Salvador, BA, Brasil.

^bDepartamento de Biotecnologia, ICS, Universidade Federal da Bahia (UFBA), Salvador, BA, Brasil.

^cDep. de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, RJ, Brasil.

doi: 10.7447/di.2013.002

INFORMAÇÕES

Histórico:
Recebido em
25/02/2013

Revisado em:
14/03/2013

Aceito em:
18/03/2013

Palavras-chave:
amilases, microorganismos,
agro-resíduos

AUTORES

JGRJ
Bióloga, Mestranda em
Biotecnologia (UFBA)

GSL
Bióloga, Mestranda em
Bioenergia (FTC)

TER
Microbiologista, Doutor em
Genética

ADEF
Farmacêutica, Doutora em
Química Biológica

EF
*bfreire@terra.com.br
Farmacêutica, Doutora em
Química Biológica

SAH
Farmacêutica, Doutora em
Microbiologia

VHM
Farmacêutico, Doutor em
Química Biológica

RESUMO

As enzimas são ferramentas importantes no estabelecimento de processos tecnologicamente limpos. As hidrolases constituem um dos mais importantes grupos de enzimas com aplicações em diferentes setores industriais. Os microorganismos, principal fonte de enzimas industriais, apresentam limitações quanto à produtividade. Dessa forma, a identificação de novas fontes para obtenção em larga escala de enzimas torna-se relevante. Esse trabalho, teve como objetivo investigar a possibilidade de obtenção de enzimas hidrolíticas a partir de resíduos agrícolas das lavouras cacaneira e dendeneira. A restrição de substrato no meio de cultivo foi utilizada para a triagem inicial de microorganismos produtores de amilase, lipase e celulase. Entre as cepas isoladas 4 apresentaram atividade amilolítica relevante com Índice Enzimático (IE) superior a 2,0. A extração, sequenciamento e análise filogenética do gene ribossomal bacteriano 16S permitiu a identificação das seguintes cepas com atividade amilolítica: *Pseudomonas tundrae*, *Xanthomonas cordiae*, *Bacillus subtilis*, *Acinetobacter baumannii*. As duas cepas mais promissoras com IE 14,0 e 9,0, *Xanthomonas cordiae* (Cepa cacau) e *Pseudomonas tundrae* (Cepa dendê) respectivamente, foram cultivadas em meio líquido e tiveram a atividade de amilase monitorada em solução. Esses dados demonstram que os microorganismos selecionados são promissores para obtenção de enzimas com potencial para aplicação na indústria.

ABSTRACT

TITLE: Selection and Identification of amylase producing microorganisms from agro-waste residues obtained from cocoa and palm industries.

Enzymes are important tools in establishing clean industrial processes. Hydrolases are the main group of enzymes with applications in many industrial sectors. Most enzymes applied to industry are isolated from microorganisms and identification and characterization of microbial systems that are able to produce enzymes in large scale are of pivotal importance. This work aimed to screen, characterize and produce hydrolytic enzymes from residual biomass from cocoa and palm cultures. Carbon source limitation was used in order to screen microorganisms for the production of amylase, lipase and cellulase. Four bacterial accesses showed relevant amylolytic activity with Enzymatic Index (EI) greater than 2.0. Sequence of the 16S rRNA gene allowed the identification of the following species with amylolytic activity: *Pseudomonas tundrae*, *Xanthomonas cordiae*, *Bacillus subtilis* and *Acinetobacter baumannii*. *X. cordiae* (Strain Cacau) and *P. tundrae* (Strain Dendê) were the most promising strains with EI 9.0 and 14.0 respectively. Both strains were grown in liquid medium and the amylase activity monitored in growth broth. These data demonstrate that the selected microorganisms are promising in obtaining enzymes with potential for application in industry.

Keywords: amylases, microorganisms, agro-waste

1. Introdução

Enzimas são proteínas específicas que atuam como

bio-catalisadores em diversos processos metabólicos (LENINGER et al., 2007). Desde o surgimento das primeiras civilizações, vêm sendo utilizadas em vários processos

biológicos, como a produção de pão, vinho e queijo. Portanto, a utilização biotecnológica das enzimas foi estabelecida previamente a obtenção de conhecimentos a respeito dos mecanismos moleculares nos quais se encontram envolvidas (HARGER et al, 1982; SPIER, 2005). Atualmente, as enzimas que degradam amido e celulose, amilases e celulases, são intensamente utilizadas nas indústrias de alimentos, têxtil e de detergentes, mesmo ainda consistindo em fator de produção de alto custo (BRAVO et al., 2000).

As células constituem-se, até hoje, o único meio para obtenção de biocatalisadores, visto que ainda não é possível destacar-se sua fabricação por síntese química. A literatura mostra que uma variedade de micro-organismos é capaz de produzir enzimas, através da fermentação, em condições experimentais definidas (PANDEY et al., 2005). Entretanto, a quantidade de enzima produzida, na maioria dos casos somado ao custo associado ao meio de cultivo inviabiliza a transposição do processo para escala industrial (OLIVEIRA et al., 2007). Dessa forma, a identificação de micro-organismos que produzam quantidades apreciáveis de enzimas, bem como a busca por meios de cultivo de baixo custo, torna-se oportuna para otimizar a produção industrial de enzimas de interesse biotecnológico gerando economia no processo produtivo (OLIVEIRA et al., 2007).

O Brasil ainda importa a maior parte das enzimas que utiliza em diferentes setores industriais, embora apresente grande diversidade biológica que poderia ser explorada para a obtenção de organismos produtores de enzimas de interesse industrial (BON et al., 2008).

O dendê, *Elaeis guineensis* e o cacau, *Theobroma cacao*, originários da África e da América Central, respectivamente, são produtos agrícolas importantes da região sul Baiana. O fruto do dendê produz o óleo de dendê ou de palma com ampla utilização na culinária, inclusive internacional (EMBRAPA, 2006). O fruto do cacauiro constitui-se em matéria prima básica no fabrico do chocolate (EMBRAPA, 2004). Dessa forma, quantidades significativas de resíduos das lavouras dendezeiras e cacauceiras são abandonadas nas plantações sendo utilizados como fertilizantes. Essa prática possibilita propagação de pragas que, conseqüentemente, obriga o produtor rural a fazer o uso de defensivos agrícolas, geralmente altamente poluentes, afetando o solo e agredindo o meio ambiente (BETTOL, 2009). Outra destinação possível, e talvez mais viável, para estes resíduos seria a utilização dos mesmos como substratos para o cultivo de micro-organismos autóctone produtores de enzimas de interesse industrial. A identificação desses micro-organismos constitui-se em etapa inicial para o emprego alternativo dos resíduos.

A seleção de cepas de micro-organismos que produzam enzimas amilolíticas em quantidade elevada, pode consistir em opção para substituição das enzimas comerciais, convencionalmente utilizadas, gerando redução dos custos envolvidos na produção e aumentando a viabilidade econômica do processo. Dessa forma, este trabalho teve como objetivo selecionar e identificar microorganismos potenciais produtores de enzimas hidrolíticas de interesse industrial, obtidos a partir do isolamento da microbiota presentes nos resíduos das lavouras, cacauceira e dendezeira.

2. Material e Métodos

Os experimentos deste projeto foram realizados no Laboratório de Biotecnologia Industrial (LBI) da Faculdade de Tecnologia e Ciência (FTC) de Salvador e no Laboratório de Microbiologia Aplicada do Instituto de Ciências da Saúde (ICS) da Universidade Federal da Bahia (UFBA).

Coleta e preparação dos Agro-resíduos de cacau e dendê

Os resíduos de dendê e de cacau, cascas, folhas e galhos,

foram coletados na fazenda Juarana localizada no km 12, Rodovia Ilhéus-Bacará. Após coleta, efetuou-se a lavagem, em água corrente, a separação e a identificação, segundo a parte da planta coletada. Para isolamento dos micro-organismos, os agro-resíduos foram inicialmente triturados e incubados a 37°C por 48 horas em solução contendo: 1% de CaCl₂, 2% de NH₄Cl, 1% de MgSO₄ e 10% de K₂HPO₄. Esse procedimento permite o enriquecimento da amostra.

Isolamento das cepas microbianas

Para isolamento das cepas bacterianas, alíquotas de 100 µL da amostra enriquecida foram plaqueadas em meio mínimo contendo: CaCl₂ 0,05g/L, NH₄Cl 0,10g/L, MgSO₄ 0,05g/L, K₂PO₄ 0,40g/L, Agar bacteriológico 15 g/L e uma fonte de carbono específica compatível com a atividade enzimática a ser testada (1% de amido de milho solúvel ou 1% de carboximetilcelulose, ou 1% de tween 20). O inóculo foi feito com o auxílio da alça de drigalsky. As placas foram incubadas a 37°C por 48 horas. Após o crescimento, unidades formadoras de colônia foram isoladas separadamente por esgotamento com a alça de platina. As placas com o esgotamento foram incubadas a 37 °C por 48 horas. As colônias isoladas foram então conservadas em tubos contendo o meio de isolamento.

Caracterização das atividades amilárica, celulárica e lipásica em meio sólido

As cepas previamente isoladas foram repicadas no centro de placas de petri em presença dos meios do isolamento. Para cada isolado os ensaios foram feitos em triplicata. Os repiques em meio contendo amido foram incubados por 96 horas a 30°C. A atividade amilolítica foi determinada através da formação de halo transparente em torno das colônias, visualizado por revelação com Lugol a 4%. Os repiques em meio contendo carboximetilcelulose foram incubados por 96 horas a 30°C e a atividade celulárica foi determinada através da formação de halo transparente em torno das colônias, visualizado por revelação com vermelho congo, segundo protocolo previamente descrito (TEATHER, 1982). As placas contendo Tween 20, após o tempo de incubação, foram colocadas sob refrigeração a 4°C por dois dias para visualização do halo de degradação. A atividade hidrolítica foi estimada semi-quantitativamente usando-se um índice enzimático (IE) que expressa a relação do diâmetro médio do halo de degradação e o diâmetro médio da colônia (STAMFORD et al., 1998). Nos ensaios o índice enzimático foi medido a cada 24 horas.

Análise em gel de agarose

A eletroforese em gel de agarose foi realizada conforme descrito em Sambrook et al., 2001. A agarose foi preparada na concentração de 0,8% a 1,0% (p/v) em tampão de corrida TAE contendo SYBR Safe DNA gel stain a 0,5%. As amostras foram aplicadas no gel e submetidas à eletroforese com corrente e voltagem adequadas (1-5 V/cm). Para visualização da amostra de DNA o gel foi exposto à luz ultravioleta.

Identificação das cepas bacterianas pelo método de Gram

Os microorganismos foram identificados parcialmente a partir da morfologia das colônias e de suas características morfológicas em microscopia ótica. A análise microscópica dos fungos filamentosos baseou-se na descrição macromorfológica das colônias em meios de culturas (GUERREIRO & SILVEIRA, 1996).

Os microorganismos isolados, foram inicialmente identificados por suas características morfológicas e por microscopia ótica. A técnica de coloração de Gram aliada à observação de lâminas a fresco foi utilizada para diferenciar os

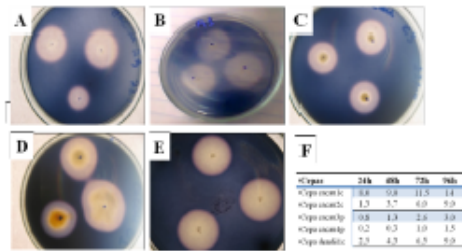


Figura 1: Atividade amilolítica de cepas isoladas de cacau e dendê. As placas foram coradas com lugol a 4%. Em (A) cepa Cacau1c, (B) cepa Cacau2c, (C) cepa Cacau3p, (D) cepa Cacau4p, (E) cepa Dendê1c. Em F, os índices Enzimáticos (IE) medidos a cada 24 horas.

grupos de bactérias (FREITAS & PICOLI, 2007).

Identificação das cepas bacterianas por tipagem genética

As cepas bacterianas de melhor produção enzimática nas condições estudadas foram identificadas por técnicas de biologia molecular, com a amplificação referente à subunidade menor do ribossomo. Para a extração do DNA foi utilizado o kit comercial GenElite Bacterial Genomic Dna Kit (Sigma) e seguiu-se o protocolo sugerido pelo fabricante.

Para a amplificação parcial do gene ribossomal bacteriano 16S foi realizada a reação da polimerase em cadeia (PCR) utilizando-se tampão Tris/HCl 20 mM (pH 8,4) contendo 50 mM KCl, o iniciador universal PF: 27F 5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC - 3' e PR: 1492R 5'-GGY TAC CTT GTT ACG ACT - 3' (NUBEL et al., 1996) e Taq-polimerase. Os produtos de PCR, com aproximadamente 430 pares de bases foram purificados com o auxílio do Kit GFX (Amersham Biosciences), conforme instruções do fabricante e encaminhados para sequenciamento.

As amostras foram adicionadas a 1-3 µL de ABI Prism Big Dye Terminator ready reaction mix, versão 3.1 (Applied Biosystems), 3 µL de iniciador 27F (4 µM), 1,5 µL de tampão de diluição (5 X) e 1,5 µL de água milliQ. O programa consiste de 30 ciclos de 15s a 96° C, 1s a 35° C e 4 min. a 60° C. A separação dos fragmentos de DNA foi realizada com ABI PRISM 3100 genetic analyzer (Applied Biosystems).

Para caracterização taxonômica das linhagens obtidas, inicialmente foram identificadas as espécies tipo mais próximas filogeneticamente através de buscas no Ribosomal Database Project (RDP) versão 9.21 (Cole et al., 2005). O RDP oferece a ferramenta Classifier (Wang et al., 2007), baseado em inferência Bayesiana simples, que permite a classificação rápida e precisa das sequências de rRNA 16S de acordo com a taxonomia proposta no Bergey's Manual. Foi utilizado o limite de 80% de confiança na análise das sequências de rRNA 16S.

As sequências foram checadas com o auxílio do programa BlastN para a confirmação da afiliação taxonômica das mesmas, junto ao banco de dados do Genbank. Para a determinação das relações filogenéticas entre as linhagens obtidas e as linhagens tipo, as sequências foram alinhadas com o auxílio do programa ClustalX, versão 1.81 (THOMPSON et al., 1997). A matriz de distância evolutiva foi calculada através do programa DNADIST do software PHYLIP versão 3.63 (FELSENSTEIN, 1995) utilizando o modelo de Jukes-Cantor.

Caracterização da atividade amilolítica em meio líquido

As duas cepas isoladas que apresentaram maior IE foram testadas quanto à capacidade de hidrolisar o amido em solução. Para o ensaio foi utilizado meio líquido contendo 1% de amido e uma concentração de células de aproximadamente 6×10^8 /mL. Aliquotas da solução foram recolhidas nos

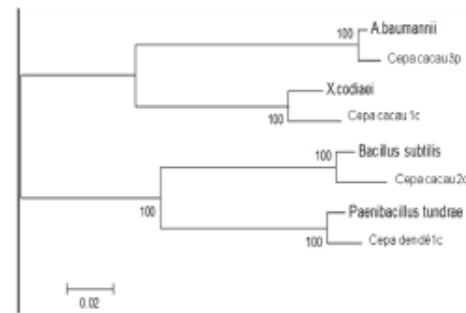


Figura 2: Cladograma do gene ribossomal bacteriano 16S das cepas isoladas do cacau e dendê que apresentaram atividade amilolítica.

tempos 0, 12, 24, 48, 72 e 96 horas, sendo subsequentemente submetidas à quantificação de amido e açúcares redutores. Os testes foram feitos em triplicata.

Para dosagem de amido utilizou-se o método colorimétrico baseado na coloração azul desenvolvida quando da formação do complexo amido-iodo conforme SOCCOL (1992). O reativo iodo-iodeto é preparado por diluição a 4% da seguinte solução de base: KI 30g/L e I2 3g/L. A reação colorida é obtida adicionando-se 0,3 mL da amostra convenientemente diluída a 7,2 mL desse reativo (quantidade suficiente para a leitura no espectrofotômetro). A densidade ótica é lida a 620 nm.

A concentração de açúcares redutores foi determinada pela reação com o ácido 3,5-dinitrosalicílico "DNS" (SOCCOL, 1992). Em meio básico, sob temperatura elevada, o ácido 3,5-dinitrosalicílico é convertido a 3-amino-5-nitrosalicílico. Desenvolve-se uma coloração amarelo café que absorve a 540 nm. Para dosagem, alíquotas de 0,5 mL da amostra foram convenientemente diluídas em 0,5 mL do reativo DNS, incubadas a 100°C por 5 minutos e em seguida a 0°C por mais 5 minutos. Elaborou-se uma reta padrão a partir de uma solução de glicose com concentração inferior a 1 g/L e procedeu-se a leitura a 540 nm. Os teores em glicose - equivalente (g/L) são obtidos por projeção sobre a reta padrão.

3. Resultados e Discussão

Seleção de Cepas

Isolados dos resíduos de cacau e de dendê que cresceram nos 3 diferentes meios de seleção foram testados para a avaliação das respectivas atividades: amilolítica, celulásica e lipásica. Entre as 20 cepas isoladas dos resíduos de cacau e selecionadas no meio contendo amido, 5 (Cepa cacau1c, Cepa cacau2c, Cepa cacau3p, Cepa cacau4p, Cepa cacau5c), sendo 3 isoladas da casca (Cepa cacau1c, Cepa cacau2c e Cepa cacau5c) e 2 isoladas da polpa (Cepa cacau3p, Cepa cacau4p) apresentaram inicialmente atividade amilolítica. Entretanto, Cepa cacau5c perdeu a atividade após a segunda passagem. Entre as 20 cepas selecionadas em meio contendo Tween 20, 3 (Cepa cacau6c, Cepa cacau7c, Cepa cacau8c) apresentaram atividade lipásica restrita a primeira passagem. Nenhuma das 20 cepas selecionadas em meio contendo carboximetilcelulose apresentou atividade celulásica (Tabela 1). Entre os 20 isolados dos resíduos do dendê selecionados em meio contendo amido, apenas 1 (Cepa dendê1c) apresentou atividade amilolítica. Entre os 20 selecionados em meio contendo Tween 20, 8 (Cepa dendê2c, Cepa dendê3c, Cepa dendê4c, Cepa dendê5c, Cepa dendê6c, Cepa dendê7c, Cepa dendê8c, Cepa dendê9c) apresentaram atividade lipásica restrita a primeira passagem. Nenhum dos isolados selecionados em meio contendo carboximetilcelulose apresentou atividade celulásica (Tabela 1). Dessa forma, 17

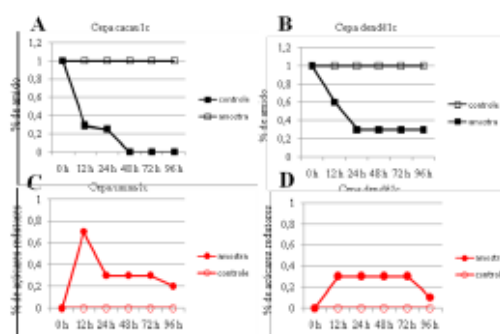


Figura 3: Quantificação de amido (A e B) e açúcares redutores (C e D) para caracterização da atividade amilolítica da cepa Cacau1c (A e C) e da cepa Dendê1c (B e D). Círculos abertos correspondem aos controles na ausência dos micro-organismos.

cepas isoladas de resíduos de cacau e dendê apresentaram atividade hidrolítica após isolamento. Entretanto, apenas 5 continuaram apresentando atividade amilolítica (Cepa cacau1c, Cepa cacau2c, Cepa cacau3p, Cepa cacau4p, Cepa dendê1c) estável após várias passagens. Metodologias baseadas em cultivos dos microrganismos em meio sólido, onde o meio específico apresenta a capacidade de identificar a produção de uma determinada enzima, vêm sendo amplamente utilizadas (MA CIEL, 2006; STAMFORD, 1998; HANKIN, 1975). No presente trabalho a metodologia utilizada para isolamento de microrganismos produtores de amilases mostrou-se efetiva.

A quantificação da atividade amilolítica das cepas: cacau1c, cacau2c, cacau3p, cacau4p e dendê1c foi realizada através da determinação do índice enzimático, calculado através da seguinte equação: $IE = (DH - DC) / DC$; onde DH equivale ao diâmetro do halo hipocrômico e DC equivale ao diâmetro da colônia. As medidas realizadas em períodos de 24, 48 e 72 horas (Figura 1A-F). Segundo Stanford (1998) considera-se como um potencial produtor de amilase uma cepa com IE superior a 2. Entre os 5 isolados selecionados dos resíduos de cacau e dendê, 4 apresentaram índice enzimático superior a 2 (Cepa cacau1c, Cepa cacau2c, Cepa cacau3p, Cepa dendê1c) (Figura 1 A-F). Os valores encontrados foram superiores aos descritos por Oliveira e col. (2007), que identificaram atividade enzimática maior que 2,0 somente em 37% das cepas isoladas. Demonstrando os potenciais desses isolados na produção da enzima, assim como a adequação das fontes para o isolamento.

Identificação das Cepas

As cepas que apresentaram atividade amilolítica foram identificadas seguindo o método da coloração de Gram. Após realização do protocolo para coloração, a análise microscópica das lâminas revelou os seguintes morfotipos: Bacilo- para as cepas cepacacau1c e cepacacau3p e Bacilo+ para as cepas cepacacau2c e cepadendê1c (Tabela 2).

A identificação genética foi realizada através da extração do DNA genômico das cepas, classificadas pelo IE, como potenciais produtoras de amilase. A amplificação parcial do gene ribossomal bacteriano 16S, gene altamente conservado e utilizado na identificação bacteriana (DAMS et al., 1988; WOESE, 1987) foi realizada através da reação da polimerase em cadeia (PCR). As sequências foram analisadas com o auxílio do programa BlastN e de dados do Genbank. A análise das sequências similares identificadas pelo programa BLASTp foram utilizadas para compor a filogenia e permitiram a identificação das seguintes cepas: Cepa cacau1c - *Xantomonas cordiaei*, Cepa cacau2c - *Bacillus subtilis*, Cepa cacau3p - *Acinetobacter baumannii*, Cepa dendê1c -

Tabela 1: Identificação das atividades: amilolítica, lipolítica e celulolítica de cepas bacterianas isoladas de casca ou polpa de dendê ou cacau em 2ª ou 6ª passagens

Atividade	Cepas positivas na primeira passagem	Cepas que perderam atividade até 2ª passagem	Cepas positivas analisadas até 6ª passagem
Cacau			
Amilolítica	Cepa cacau1c Cepa cacau2c Cepa cacau3p Cepa cacau4p Cepa cacau5c	Cepa cacau5c	Cepa cacau1c Cepa cacau2c Cepa cacau3p Cepa cacau4p
Lipolítica	Cepa cacau6c Cepa cacau7c Cepa cacau8c	Cepa cacau6c Cepa cacau7c Cepa cacau8c	-----
Cellulolítica	-----	-----	-----
Total	8	4	4
Dendê			
Amilolítica	Cepa dendê1c	-----	Cepa dendê1c
Lipolítica	Cepa dendê2c Cepa dendê3c Cepa dendê4c Cepa dendê5c Cepa dendê6c Cepa dendê7c Cepa dendê8c Cepa dendê9c	Cepa dendê2c Cepa dendê3c Cepa dendê4c Cepa dendê5c Cepa dendê6c Cepa dendê7c Cepa dendê8c Cepa dendê9c	-----
Cellulolítica	-----	-----	-----
Total	9	8	1

Paenibacillus tundrae (Figura 2).

Caracterização da Atividade Amilolítica

Na maioria dos processos biotecnológicos que envolvem a hidrólise do amido, a reação se processa em meio líquido. Dessa forma, as duas cepas que apresentaram índice enzimático mais elevado determinado em meio sólido, Cepa cacau1c e Cepa dendê1c foram selecionadas para ensaios de caracterização da atividade amilolítica em meio líquido. A atividade foi determinada monitorando-se a cada 24 horas a porcentagem de amido e de açúcares redutores em solução. Tanto a Cepa cacau1c quanto a Cepa dendê1c, após 24 horas de inoculação promoviam redução na concentração de amido em cerca de 80% do valor inicial (Figura 3A e 3B). Entretanto a reação que se processou em presença da Cepa dendê1c alcançou seu ponto de saturação em 24h e não foi observado a hidrólise total do amido. Cerca de 20% do substrato permaneceu presente no meio reacional sem sofrer hidrólise (Figura 3B). A Cepa cacau1c produziu hidrólise total do amido no meio reacional em 48 horas após a inoculação (Figura 3A).

A concentração de açúcares redutores nas alíquotas analisadas varia em função da hidrólise do amido e da sua utilização como combustível metabólico pelas bactérias presentes no meio. O aumento na concentração de açúcares redutores foi evidenciado nas primeiras 12 horas em presença da Cepa dendê1c (Figura 3D). Entretanto foi mais intenso para a Cepa cacau1c (Figura 3C).

A inibição da produção de amilase pela presença de glicose em solução é conhecida como repressão catabólica (FERNANDES et al., 2007; MONTEIRO & ULHOA, 2006). Em meio de cultivo, a produção ou a liberação da glicose devido à degradação do amido utilizado como indutor e como fonte de carbono, pela ação de amilases secretadas pelos microrganismos pode inibir a produção da enzima (FERNANDES et al., 2007). A liberação de glicose evidenciada a partir da determinação de açúcar redutor presente em meio de cultivo líquido pode ter sido a causa da inibição da degradação do amido a partir de 24h observada para a Cepa dendê1c (Figura 3B). Esse efeito não foi

Tabela 2: identificação morfológica dos isolados

Isolado	Morfológico/Gram
Cepa cacau1c	Bacilo Gram -
Cepa cacau2c	Bacilo Gram -
Cepa cacau3p	Bacilo Gram -
Cepa dendê1c	Bacilo Gram +

observado para a Cepa cacau1c que apresentou um aumento mais intenso na porcentagem de açúcares redutores nas primeiras 12hs (Figura 3 C) não acompanhado de redução na atividade amilásica, a qual foi capaz de promover hidrólise total do amido (Figura 3A). A Cepa cacau1c foi considerada a mais indicada para análise de produção da enzima em cultivo líquido por não sofrer repressão catabólica com o aumento da concentração de glicose.

As velocidades de degradação do amido não mostraram-se compatíveis com valores previamente descritos na literatura (FERNANDES et al., 2007; MONTEIRO & ULHOA, 2006; SPIER, 2004) para reações que se processaram na presença de fungos filamentosos. Entretanto, para a utilização de enzimas fúngicas em meio líquido, torna-se necessário etapas de concentração e purificação parcial da enzima, quando há perspectiva de aplicação em processos biotecnológicos (GUPTA et al., 2003). Além disso, as α -amilases fúngicas são mais sensíveis a variações de pH e temperatura quando comparadas as enzimas bacterianas (GUPTA et al., 2003; REED, 1975). Esse fato propicia um maior potencial de aplicação biotecnológica as enzimas bacterianas.

4. Conclusão

As técnicas de isolamento, assim como as fontes das amostras de microrganismos mostraram-se efetivas para a obtenção de microrganismos produtores de amilases. Entre as 4 cepas com significativa atividade amilolítica, a cacau1c, *Xantomonas cordiae* além de não ser regulada por repressão catabólica, apresentou o maior índice enzimático (14.0). Dessa forma, constitui-se no principal alvo para posterior caracterização de propriedades bioquímicas, de modo a determinar suas formas mais prováveis de aplicação em processos biotecnológicos.

5. Agradecimentos

Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

6. Referências

BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. *Biocontrole de plantas: Uso e Perspectivas*. Embrapa Meio Ambiente, 2009, 341p.

BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. *Enzimas em biotecnologia – produção, aplicações e mercado*. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2008, 506p

BRAVO, C.; CARVALHO, E.; SCHWAN, R.; GOMES, R.; PILON, L. Determinação de Condições Ideais para a Produção de Poligalacturonase por *Xylohyveromyces marxianus*. *Ciência e Agrotecnologia*, v. 24, n. 1, p.137-152. 2000.

DAMS, E.; HENDRIKS, L.; VAN DE PEER, Y.; NEEF, J.-M.; SMITS, G.; VANDENBEMPT, I. WACHTER, R. *Nucleic Acids Res*, 16 (suppl), r67-r175. 1998.

EMBRAPA. MATTOS, PL P.; CARDOSO, E.M.R. *Cultivo da Mandioca para o Estado do Paraná: Importância Econômica*. Embrapa: Mandioca e Fruticultura. Sistemas de Produção, n. 13, p.1-2. 2003. Disponível

em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/Fontes_HTML/Mandioca/mandioca_para_importancia.htm> Acesso em: 14 Jun 2004.

EMBRAPA. FURLAN, J. J. Furlan Júnior, José. *Dendê: manejo e uso dos subprodutos e dos resíduos*. Embrapa Documentos, 246, p. 12-17, 2006. Disponível em: <www.embrapa.br>. Acesso em 15/08/2007.

FELSENSTEIN, J.; KUHNER, M. K.; J. YAMATO. Estimating effective population size and mutation rate from sequence data using Metropolis-Hastings sampling. *Genetics* 140: 1421-1430. 1995.

FERNANDES, L. P.; ULHOA, C. J.; ASQUIERI, E. R.; MONTEIRO, V. N. Produção de amilases pelo fungo *Macrophomina phaseolina*. *Revista eletrônica de Farmácia*, v. 4, n. 1, p. 43-51, 2007.

FREITAS, R. F.; PICOLI, S. U. A coloração de Gram e as variações na sua execução. *Centro Universitário de Feevale – Laboratório de Biomedicina. News Lab*, Ed. 2007, p.82.

GUERREIRO, R. T.; SILVEIRA, R. M. B. *Glossário ilustrado de fungos: termos e conceitos aplicados a micologia*, Ed. Universidade/ UFRGS, 1996. 102 p.

GUPTA, R.; GIGRAS, P.; MOHAPATRA, H.; GO SWAMI, V. K.; CHAUHAN, B. Microbial α -Amylases: a Biotechnological Perspective. *Process Biochemistry*, v. 38, n. 11, p. 1599-1616. 2003.

HANKIN, Lester; ANAGNOSTAKIS, S. L. The Use of Solid Media for Detection of Enzyme Production by Fungi. *Mycological Society of America*, v. 67, n. 3, p. 597-607, 1975.

HARGER, C.; SPRADA, D.; HIRATSUKA, E. Amilase Fúngica. In: *Bioquímica das Fermentações*, 1982. 56 p.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D.L.; COX, M. M. *Princípios de Bioquímica*. 5 ed., São Paulo, Brasil, Sarvier, 2007.

MACIEL, G. M. *Desenvolvimento de bioprocesso para produção de xilanases por fermentação no estado sólido utilizando bagaço de cana de açúcar e farelo de soja*. 2006.133p. Dissertação (Mestrado em Processos Biotecnológicos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

MONTEIRO, VN.; ULHOA, C.J. Biochemical Characterization of a β -1,3 Glucanase from *Trichoderma koningii* Induced by Cell Wall of *Rhizoctonia solani*. *Current Microbiology*, v. 52, n. 2, p. 92-99, 2006.

OLIVEIRA, A. N.; OLIVEIRA, L. A.; ANDRADE, J. S.; CHAGAS-JUNIOR, A. F. Produção de amilase por rizóbios, usando farinha de pupunha como substrato. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 27, n. 1, p. 61-66, 2007.

PANDEY, A.; WEBB, C.; SOCCOL, C.R.; LARROCHE, C. *Enzym e Technology*. 1ª ed. New DeHi: Asiatech Publishers, Inc, 2005. 760 p.

REED, G. *Enzymes in Food Processing*. 2. ed. New York: Academic Press Inc., 1975. p.62-87.

SOCCOL CR (1992) *Physiologie et Métabolisme de Rhizopus en Culture Solide et Submergée en Relation Avec la Dégradation d'Amidon et la Production d'Acide L(+) Lactique*. Thèse de Doctorat. Mention Génie enzymatique, Bioconversion et Microbiologie, Université de Technologie de Compiègne. Compiègne-France, p. 218.

SPIER, M.R.; WOJCIECHOWSKI, A. L.; SOCCOL, C. R. *Produção de α -Amilase por Aspergillus em Fermentação no Estado Sólido de Amido de Mandioca e Bagaço de Cana-de-Açúcar*. VI SEMINÁRIO BRASILEIRO DE TECNOLOGIA ENZIMÁTICA. Anais Enztec 2004. Rio de Janeiro: Enztec, 2004. v. 1.

- p. 116-116.
- SPIER, M. R. *Produção de enzimas amilolíticas fúngicas α -amilase e amiloglicosidase por fermentação no estado sólido*. 2005. 178p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia dos Alimentos) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005. 28
- STAMFORD, T. L. M.; ARAÚJO, J. M.; STAMFORD, N. P. Enzymatic Activity of microorganisms isolated from yam bean legume (*Pachyrhizus erosus* L. Urban) (*Pachyrhizus erosus* L. Urban). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 18, p. 382-385, 1998.
- TEATHER, R. M.; WOOD, P. J. Use of congo red-poly-saccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 43, n. 4, p. 777-780, 1982.
- THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D. G. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, v. 25, n. 24, p. 4876-4882, 1997.
- WOESE, C. R. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.*, v. 51, n. 2, p. 221-271. 1987.

