

Aline Aparecida dos Reis

Produção e Caracterização de amilases bacterianas:
 α -amilase e Ciclodextrina Glucanotransferase (CGTase)

São José do Rio Preto
2015

Aline Aparecida dos Reis

Produção e Caracterização de amilases bacterianas:
 α -amilase e Ciclodextrina Glucanotransferase (CGTase)

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Heloiza Ferreira Alves do Prado

São José do Rio Preto
2015

Reis, Aline Aparecida dos.

Produção e caracterização de amilases bacterianas : α -amilase e ciclodextrina glucanotransferase (CGTase) / Aline Aparecida dos Reis. -- São José do Rio Preto, 2015

108 f. : il., tabs.

Orientador: Heloiza Ferreira Alves do Prado

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Microbiologia. 2. Enzimas - Aplicações industriais. 3. Amido. 4. Amilase. 5. DNA. 6. Fermentação. 7. Reação em cadeia de polimerase. I. Alves-Prado, Heloiza Ferreira. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 663.15

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

Aline Aparecida dos Reis

Produção e Caracterização de amilases bacterianas:
 α -amilase e Ciclodextrina Glucanotransferase (CGTase)

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Comissão Examinadora

Prof^a. Dr^a. Heloiza Ferreira Alves do Prado
UNESP – Ilha Solteira
Orientador

Prof. Dr. João Cláudio Thoméo
UNESP – São José do Rio Preto

Prof^a. Dr^a. Ana Maria Rodrigues Cassiolato
UNESP – Ilha Solteira

São José do Rio Preto
20 de julho de 2015

AGRADECIMENTOS

A DEUS, presente em todos os momentos da minha vida

Ao meu companheiro Wesley, pela eterna compreensão, carinho e apoio.

A minha irmã Priscila, pelas palavras de conforto e conselhos.

A minha família, pelo sentimento de honra e orgulho de minha trajetória.

A Profª Drª Heloiza pelos ensinamentos, amizade, confiança e dedicação.

A todas amigas da faculdade, colegas do laboratório e da vida, pela ajuda e solidariedade.

A CAPES pela concessão de bolsa de Mestrado e a FAPESP pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho.

RESUMO

Em conjunto com outras enzimas que degradam amido, as α -amilases e CGTases são incluídas na família 13 glicosilhidrolases caracterizada por uma conformação $(\alpha/\beta)_8$ -barril. As amilases são grupo importante de enzimas industriais, representando cerca de 25% do mercado mundial de enzima.. Foram isoladas linhagens bacterianas de áreas do Cerrado que apresentaram alta produção de amilases em estudos anteriores. Devido ao interesse em ampliar os conhecimentos de α -amilases e CGTase com potencial de aplicação industrial, no presente trabalho, propôs-se realizar estudos de análises físico-químicas e do efeito da fonte de carbono, na produção de α -amilase das linhagens microbianas A-1.2 e A-18 e de CGTase produzida por *Paenibacillus campinasensis* H69-3 utilizando na fermentação submersa os amidos solúvel, trigo, milho, batata e mandioca; farelo de trigo e mandioca; Maizena e Arrozina como diferentes fontes de carbono alternativas Além disso, propôs-se aperfeiçoar os estudos de produção de amilases pela linhagem microbiana A-1.2 por meio da otimização dos constituintes nutricionais do meio de cultivo em que cada um dos ensaios do planejamento fatorial foi executado em triplicata e dessa forma, consideraram-se as médias dos resultados obtidos dessas repetições. Iniciar estudos de biologia molecular com a CGTase produzida por *P. campinasensis* H69-3 buscando estratégias para a clonagem e expressão da CGTase em hospedeiro heterólogo (*Escherichia coli*). As linhagens A-1.2 e A-18 tiveram as fontes de carbono amido solúvel, amido de mandioca, amido de milho e farelo de mandioca como os substratos que maximizaram a produção da enzima por ambas as linhagens, e o tempo de fermentação com maiores atividades foi entre 72 e 96 horas. O perfil de produção ao longo do tempo da CGTase de *P. campinasensis* H69-3 indicou o amido solúvel, amido de mandioca e a Maizena como as fontes de carbono que propiciaram as mais altas atividades enzimáticas. O tempo de 72 horas foi o mais apropriado nos testes enzimáticos, proporcionando 350 U mL⁻¹ de atividade amilásica e 25 U mL⁻¹ de atividade CGTase. A caracterização físico-química das

enzimas durante os testes enzimáticos mostrou que a temperatura ótima ficou em 65°C para ambas as linhagens e o pH ótimo em pH 7,0 para a linhagem A-18 e em pH 6,5 para a linhagem A-1.2. A CGTase apresentou atividades significativas em um intervalo de pH de 5 a 6,5 e um pico no pH 7,5 nas fonte amido solúvel e Maizena e a temperatura ideal deste mix enzimático foi 50°C, mas na temperatura de 80°C também houve alta atividade enzimática. A otimização dos constituintes nutricionais do meio de cultivo de A-1.2 resultou na seguinte composição do meio de cultivo: 2,78% amido solúvel, 0,50% extrato de levedura, 0,30% peptona, 0,30% K₂HPO₄, 0,06% MgSO₄.7H₂O, 0,05% (NH₄)₂SO₄ com atividade média de α-amilase de 3796 U/mL, o que resultou em um aumento de 3 vezes na atividade enzimática em relação ao meio não otimizado. A concretização significativa do estudo encontra-se no fato de extrato de levedura, a fonte de nitrogênio que muitas vezes ser a mais cara, não serem significantes para o melhoramento da produção de amilase. Os ensaios moleculares com a CGTase produzida por *P. campinasensis* H69-3 apresentaram a extração do DNA genômico de *P. campinasensis* confirmada por eletroforese em gel de agarose que resultou em uma banda única e homogênea de 12kb correspondente ao DNA pretendido. Após o alinhamento, os primer's Forward ATGGAATTCATCACCCGATAC e Reverse ATCTCTAGAATTTTGCCAGTC com sítios para enzimas de restrição EcoRI e BamHI foram desenhados para serem utilizados para amplificação do gene *cgt* e através da técnica de PCR, um fragmento correspondente da região codificante do gene *cgt* de *P. campinasensis* foi amplificado, sendo possível a observação de uma única banda com aproximadamente 2500pb. Dessa forma, estudos de micro-organismos com boa atividade para CGTase, que visem a diminuição dos custos de produção, o aumento da disponibilidade de CD são interessantes para o setor industrial. O emprego de técnicas recentes de manipulação genética, que disponibilizem uma CGTase melhorada, são igualmente importantes

Palavras-chave: Microbiologia. Enzimas – Aplicações Industriais. Amido. Amilase. DNA. Fermentação. Reação em Cadeia de Polimerase.

ABSTRACT

*Together with other enzymes that degrade starch, α -amylases and CGTases are included in the family 13 glycosylhydrolases, characterized by a conformation $(\alpha/\beta)_8$ -barrel. Amylases are an important group of industrial enzymes, accounting for approximately 25% of the world enzyme market. Bacterial strains from the Cerrado areas, which have shown a high production of amylase in the previous studies, have been isolated. Due to the interest in expanding the knowledge of α -amylase and CGTase with potential for industrial application, the present work proposes to conduct studies of physical and chemical analysis and the effect of carbon source on the production of α -amylase of A-1.2 and A-18 microbial strains, as well as CGTase produced by *Paenibacillus campinasensis* H69-3 in submerged fermentation using the soluble starch, wheat, corn, potato and cassava; wheat bran and cassava; Maizena and Arrozina like various alternative sources of carbon. Furthermore, it proposes enhancing the amylase study of the microbial strain A-1.2 by optimizing the nutritional components of the culture medium in which each of the factorial design experiments has been carried out in triplicate, and thus considering the average results of these repetitions. To initiate molecular biology studies with CGTase produced by *P. campinasensis* H69-3 searching strategies for the cloning and expression of the CGTase in a heterologous harbourer (*E. coli*). The A-1.2 and A-18 strains were the carbon sources of soluble, cassava and corn starch, and cassava bran as the substrate that maximized the enzyme production by both strains. And the fermentation time with higher levels of activity was between 72 and 96 hours. The production profile over the CGTase *P. campinasensis* H69-3 time has indicated the soluble and cassava starch and Maizena as carbon source that provided the highest enzymatic activities. The 72 hours period of time has been more appropriate in enzymatic tests, providing 350 U ml⁻¹ of amylase activity, and 25 U ml⁻¹ CGTase activity. The physicochemical characterization of the enzymes for enzymatic tests have shown that the optimal temperature was at 65°C for both strains, and the optimum pH at pH 7.0 for the A-18 lineage and at pH 6.5 for the A -1.2 strain. The CGTase showed significant activity in a pH range of 5 to 6.5, and a peak at pH 7.5, and the soluble starch Cornstarch source, and the optimal temperature of this enzyme mix was at 50°C, but at*

80°C there was high activity enzyme as well. The optimization of the nutritional constituents of the 1.2-cultivation medium resulted in the following composition of cultivation medium: 2.78% soluble starch, 0.50% yeast extract, 0.30% peptone, 0.30% K_2HPO_4 , 0.06% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.05% $(NH_4)_2SO_4$ with 3796U/ml α -amylase activity, which resulted in a threefold increase in enzymatic activity in relation to the not optimized. A significant achievement of the study lies in the fact that yeast extract, the source of nitrogen that is often the most expensive, are not significant for the improvement of amylase production. Molecular assays with CGTase produced by *P. campinasensis* H69-3 presented the extraction of genomic DNA of *P. campinasensis* confirmed by electrophoresis on agarose gel resulted in a single and homogeneous 12kb band corresponding to the desired DNA. After the alignment, the primer's ATGGAATTCATCACCCGATAC Forward and ATCTCTAGAATTTTGCCAGTC Reverse, with EcoRI and BamHI sites for restriction enzymes have been designed to be used for amplification of the *cgt* gene. And through the PCR technique, a corresponding fragment of the coding region of the gene *cgt* of *P. campinasensis* was amplified, making it possible to observe a single band with approximately 2500pb. Thus, the studies of microorganisms with good activity for CGTase, aimed at reducing production costs and increasing the CD availability are interesting for the industrial sector. The use of newer techniques of genetic manipulation that provides improved CGTase is equally important.

Keywords: Microbiology. Enzymes – Industrial Applications. Starch. Amylase. DNA. Fermentation. Polymerase chain reaction.

LISTA DE FIGURAS

Figura II.1- Representação esquemática da ação das enzimas envolvidas na degradação do amido.....	06
Figura II. 2– Representação esquemática das estruturas: a) $(\beta/\alpha)_8$ -barril e b) 3D de uma Ciclodextrina glucanotransferase.	11
Figura II.3 – Nível de organização dos domínios de enzimas que degradam o amido.....	11
Figura II.4 - Característica e fórmula estrutural da molécula de ciclodextrina	15
Figura II.5 - Representação esquemática das reações de transglicosilação catalisadas pela Ciclodextrina glucanotransferase.....	15
Figura IV.1- Sítio de clonagem e expressão do vetor pH6HTN His6HaloTag® T7	41
Figura V.1 – Efeito da fonte de carbono na produção enzimática da linhagem A-1.2(a) e A-18 (b), cultivada s sob fermentação submersa, após 72 horas de fermentação.....	42
Figura V.2 – Perfil de produção enzimática das linhagens A-1.2 e A-18, sob fermentação submersa, em diferentes fontes de carbono. a) atividade dextrinizante A-1.2, b) atividade α -amilase A-1.2, c) atividade dextrinizante A-18, d) atividade α -amilase A-18.....	43
Figura V.3 – Perfil de produção enzimática de <i>Paenibacillus campinasensis</i> H69-3, sob fermentação submersa, em diferentes fontes de carbono. a) atividade dextrinizante, b) atividade CGTase.	44
Figura V.4- Perfil de produção da atividade enzimática específica ($U\ mg^{-1}$ proteína) produzida pela linhagem <i>Paenibacillus campinasensis</i> H69-3 utilizando diferentes substratos.	44
Figura V.5 - Caracterização físico-química da α -amilase produzida pelas linhagens A-1.2 (—■—) e A-18 (—●—) utilizando farelo de mandioca. (a) pH ótimo; (b) temperatura ótima.	47
Figura V.6 - Caracterização físico-química da CGTase produzida pela linhagem <i>P. campinasensis</i> H69-3 utilizando diferentes substratos: Amido de mandioca (—■—), amido solúvel(—●—) e Maizena (—▲—). (a) pH ótimo; (b) temperatura ótima.	48
Figura V.7 – Efeitos principais e de interações dos fatores estudados no planejamento fatorial 2^{6-1} com três ensaios no ponto central, baseado no teste t “student” $t_{(13; 0,95)}= 2,16$	53

Figura V.8 - Superfície de resposta, demonstrando a interação entre amido solúvel e MgSO ₄ .7H ₂ O para o planejamento fatorial 2 ³ com 6 pontos axiais e 3 ensaios no ponto central.	59
Figura V.9 - Superfície de resposta, demonstrando a interação entre amido solúvel e extrato de levedura para o planejamento fatorial 2 ³ com 6 pontos axiais e 3 ensaios no ponto central.	59
Figura V.10 - Superfície de resposta, demonstrando a interação entre extrato de levedura e MgSO ₄ .7H ₂ O para o planejamento fatorial 2 ³ com 6 pontos axiais e 3 ensaios no ponto central.	60
Figura V.11 - Gel de eletroforese mostrando a confirmação da extração do DNA de <i>Paenibacillus campinasensis</i> H69-3. 1. Ladder Bio Labs. 2.3.4 e 5. DNA de <i>P. campinasensis</i> H69-3 de 12kb. 6. Ladder Invitrogen.	64
Figura V.12 - Localização dos primers desenhados a serem utilizados para a clonagem do gene <i>cgt</i> de <i>Paenibacillus. campinasensis</i> H69-3 com base no gene completo de ciclodextrina de <i>P. macerans</i> (>gi 2911477). Os primers Forward e Reverse estão grifados em amarelo e alaranjado nas posições 784-806 e 2827-2848, respectivamente.	66
Figura IV.13. Alinhamento gerado pelo software online Blast da sequência de <i>Paenibacillus macerans</i> (>gi 2911477).	66
Figura IV.14 - Gel de eletroforese mostrando o produto de PCR do DNA genômico a partir de <i>Paenibacillus campinasensis</i> H69-3.	68
Figure VIII.1 - Main interactions between factors in the factorial design 2 ⁶⁻¹ with three trials at the midpoint effects, based on the t test “student” $t_{(13; 0, 95)} = 2, 16$. Pareto chart of the standardized effects.	95
Figure VIII.2 - Response surface demonstrating the interaction between soluble starch and MgSO ₄ .7H ₂ O for the 2 ³ factorial designs with six axial points and 3 trials at the midpoint.	101
Figure VIII.3 - Response surface demonstrating the interaction between soluble starch and yeast extract for 2 ³ factorial designs with six axial points and 3 trials at the midpoint.	92
Figure VIII.4 - Response surface demonstrating the interaction between yeast extract and MgSO ₄ .7H ₂ O for the 2 ³ factorial designs with six axial points and 3 trials at the midpoint.	102

LISTA DE TABELAS

Tabela IV.1 - Fatores e valores dos níveis analisados no planejamento fatorial 2^{6-1} com três ensaios no ponto central.	37
Tabela IV. 2 - Matriz do planejamento fatorial 2^{6-1} com três ensaios no ponto central.....	37
Tabela IV.3 - Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na reação de PCR para amplificação do gene <i>cgt</i> a partir de DNA de <i>Paenibacillus campinasensis</i> H69-3..	40
Tabela IV.4 - Protocolo das misturas de reações utilizadas para a amplificação do gene da CGTase.....	40
Tabela V.1 - Atividade específicas obtidas com diferentes fontes de carbono na produção de amilases observadas na literatura.....	45
Tabela V.2 - Produção de amilase das fermentações, referente ao planejamento fatorial 2^{6-1} com três ensaios no ponto central.	51
Tabela V.3 - Estimativa de efeitos e análise de regressão calculada para o planejamento fatorial 2^{6-1} com três pontos centrais.	52
Tabela V.4 - Análise de variância, para o ajuste do modelo linear aos resultados do planejamento fatorial 2^{6-1} com três ensaios no ponto central. ...	54
Tabela V.5 - Matriz com os pontos em direção a máxima inclinação ascendente “steepest ascent”.....	56
Tabela V.6 - Produção de amilase das fermentações, referente ao planejamento fatorial 2^3 com seis pontos axiais e com três ensaios no ponto central.	56
Tabela V.7 - Estimativa de efeitos e análise de regressão calculados para o planejamento fatorial composto 2^3 completo, com pontos axiais e centrais....	57
Tabela V.8 - Análise de variância, para o ajuste do modelo quadrático aos resultados do planejamento fatorial composto 2^3 completo com pontos axiais e centrais.	57
Tabela V.9 - Estudos de produção de α -amilase microbiana por fermentação em estado sólido (SSF) e submersa (SbF) realizados com atividades experimentais.	61
Table VIII.1 - Factors and values of levels analyzed in factorial design 2^{6-1} with three trials at the center point.	91

Table VIII.2 - Production of amylase Brews, referring to the 2^{6-1} factorial design with three trials at the midpoint.	92
Table VIII.3 - Estimated effects and regression analysis calculated for the 2^{6-1} factorial design with three central points.	94
Table VIII.4 - Analysis of variance for the linear fit to the results of the factorial design 2^{6-1} with three trials at the midpoint model.	96
Table VIII.5 - Mother with points toward the maximum upslope "steepest ascent"	97
Table VIII.6. Amylase production of fermentation, referring to the 2^3 factorial designs with six axial points and three tests at the midpoint.	98
Table VIII.7 - Estimated effects and regression analysis calculated for compound 2^3 full factorial designs, with axial and central points.	99
Table VIII.8 - Analysis of variance for the adjustment of the quadratic model to the results of the factorial design comprised 23 complete with axial and central points.	99
Table VI.9- Studies of microbial α -amylase production by fermentation in solid state and submerged performed with experimental activities.	103

SUMÁRIO

Agradecimentos.....	i
Resumo	ii
Abstract	iv
Lista de figuras	vi
Lista de tabelas	viii
Sumário	x
I. INTRODUÇÃO	1
II. Revisão de literatura	4
II.1. Amido	4
II.1.1. Enzimas degradadoras do amido	6
II.1.2. Aplicação das Enzimas Amilolíticas	8
II.2. Família 13 glicosil hidrolases	9
II.3. α -amilase	11
II.3.1. Características gerais	11
II.3.2. Produção	12
II.3.3. Aplicação	12
II.4. Ciclodextrina glucanotransferase (CGTase).....	14
II.4.1. Características gerais	14
II.4.2. Produção	17
II.4.3. Clonagem e expressão dos genes para ciclodextrina glucanotransferase.....	18
II.4.4. Aplicação Industrial.....	22
II.5. Processos fermentativos	26
II.5.1. Otimização das condições de cultivo	26
II.5.2. Aproveitamento de resíduos	28
III. Objetivos	29

IV. Material e Métodos	30
IV.1. Micro-organismos	30
IV.2. Isolamento de micro-organismos	31
IV.3. Produção das enzimas	32
IV.3.1. Fermentação submersa (FSm).....	32
IV.4. Determinação de atividade enzimática	32
IV.4.1. Atividade amilase.....	32
IV.4.2. Atividade CGTase.....	33
IV.4.3. Determinação de proteína	34
IV.5. Estudo do efeito das fontes de carbono.....	34
IV.6. Perfil de produção ao longo do tempo	35
IV.7. Caracterização físico-química das enzimas	35
IV.7.1. Efeito da temperatura	35
IV.7.2. Efeito do pH.....	35
IV.8. Planejamento experimental.....	36
IV.8.1 Otimização do meio de produção	36
IV.8.2. Planejamentos fatoriais	36
IV.8.3. Análises estatísticas	38
IV.9. Estratégias para Clonagem do gene para CGTase	38
IV.9.1. Extração do DNA genômico de <i>Paenibacillus. campinasensis</i> H69-3	38
IV.9.2. Amplificação do gene através da técnica de PCR	39
IV.9.3. Eletroforese	39
V. Resultados e Discussões.....	41
V.1. Efeito das fontes de carbono na produção de amilases	41
V.2. Perfil de produção das enzimas ao longo do tempo	42
V.3. Efeito das fontes de carbono e perfil de produção de CGTase	43
V.4. Caracterização físico - química das α -amilases	46

V.4.1. Efeito da temperatura e pH.....	46
V.5. Otimização da composição do meio de produção	49
V.5.1. Planejamento fatorial 2^{6-1} com três ensaios no ponto central.....	50
V.5.2 Deslocamento em direção à máxima inclinação ascendente “steepest ascent”	54
V.5.3. Planejamento fatorial composto 2^3 completo com pontos axiais.....	55
V.5.4. Confirmação experimental das condições otimizadas	60
V.6. Estratégias para Clonagem do gene para CGTase	64
V.6.1. Extração do DNA genômico de <i>P. campinasensis</i> H69-3.....	64
V.6.2. Síntese dos primer“s.....	64
V.6.3 Reação de PCR.....	68
VI. Conclusão.....	69
VII. Literatura citada.....	71
VIII. ANEXO I. Enhanced Amylase Production with Optimization of Nutritional Components by Using Response Surface Methodology	87

I.INTRODUÇÃO

A produção de amilases se iniciou no começo do século XX em decorrência do interesse industrial da produção de glicose a partir de materiais amilolíticos. Coube a Takamine o mérito de ter desenvolvido, no início do século passado, o primeiro método para a produção microbiológica de enzima em grande escala, a α -amilase fúngica Takadiastase (TAKAMINE, 1914; PANDEY et al., 2005).

O amido é a principal fonte de hidrato de carbono dietético para os seres humanos, presente em alimentos como arroz, milho, mandioca, trigo, batata, centeio e cevada. Além disso, é uma reserva de carboidrato encontrada nas folhas, sementes, raízes e tubérculos de muitas plantas (ZEEMAN; KOSSMANN; SMITH, 2010). Ao longo de milhares de anos, o homem tem cultivado estas plantas contendo um máximo rendimento de amido. Geralmente, composto por cerca de 20% de amilose, que corresponde a um polímero linear com resíduos de glicose com ligação α -1,4, e 80% de amilopectina, um polímero ramificado com resíduos de glicose ligados por ligação α -1,4 e 5% de ligações α -1,6-glicosídicas (ZEEMAN; KOSSMANN; SMITH, 2010; SHARMA; SATYANARAYANA, 2013; VAN DER MAAREL; LEEMHUIS, 2013).

A degradação industrial do amido é usualmente iniciada por α -amilase (α -1,4-glucanohidrolases) uma enzima muito comum em micro-organismos, podendo também ser extraída de plantas (AMID et al., 2014; SAGU et al., 2015). As amilases desramificantes, como as pululanases e ciclodextrinas

glucanotransferases (CGTases), hidrolisam as ligações do tipo α -1,6 (VAN DER MAAREL et al., 2002). As amilases são um grupo muito importante de enzimas industriais, sendo responsáveis por aproximadamente 25% do mercado de enzimas do mundo (WU et al., 2014; SAGU et al., 2015).

A utilização de enzimas tem aumentado significativamente nos últimos anos e o preço elevado ainda é uma das principais preocupações para aplicação industrial (MACIEL et al., 2008; SILVA et al., 2013). As enzimas são altamente valiosas para a indústria alimentar e ração animal devido à sua ampla gama de aplicações e custo-eficiência.

As amilases encontram aplicações, por exemplo, nas indústrias: têxtil, papel e celulose, de couro, detergentes, cervejas, bebidas destiladas, panificação, cereais para alimentação infantil, liquefação e sacarificação do amido, ração animal, indústria de fermentação (vitaminas, aminoácidos, antibióticos), indústria química e farmacêutica (GUPTA et al., 2003; PANDEY et al., 2005; XIE et al., 2014; EMTENANI et al., 2015).

Em 2013, o mercado de enzima industrial mundo tinha um valor de cerca de € 3.270.000.000, de acordo com o líder do mercado global, Novozymes, com uma quota de mercado de 47% (NOVOZYMES, 2013; SPOHNER et al., 2015).

Dessa forma, reduzir os custos e o tempo de produção da enzima e maximizar o rendimento por meio da otimização do meio de fermentação e de técnicas avançadas da biologia molecular, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), são objetivos fundamentais para a economia em aplicações industriais. (RODRIGUES; IEMMA, 2009; COWAN; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2011). A PCR foi desenvolvida na metade da década de 1980 por Kary Mullis. Esta técnica é capaz de produzir cópias de regiões específicas do DNA, ou seja, é capaz de amplificar apenas a região do DNA correspondente ao gene desejado, produzindo muitas cópias (WATSON et al. 1992).

Neste trabalho foi dada continuidade aos estudos anteriores (REIS; ALVES-PRADO, 2012a, 2012b, REIS et al., 2012c) em que foram isoladas linhagens microbianas do Cerrado Brasileiro produtoras de amilases com alta atividade

enzimática e cujas características físico-químicas da solução enzimática bruta se mostraram interessantes. Devido ao interesse em ampliar os conhecimentos de α -amilases e CGTase com potencial de aplicação industrial, no presente trabalho, propôs-se analisar físico-quimicamente as amilases produzidas pelas linhagens microbianas nomeadas de A-1.2, A-18 e da bactéria alcalofílica termotolerante *Paenibacillus campinasensis* H69-3 utilizando resíduos agrícolas como diferentes fontes de carbono. Além disso, propôs-se aperfeiçoar os estudos de produção de amilases por meio da otimização dos constituintes nutricionais do meio de cultivo e iniciar estudos de biologia molecular com a CGTase produzida por *P. campinasensis* H69-3 buscando a clonagem e expressão da CGTase em hospedeiro heterólogo (*Escherichia coli* ou *Sacharomyces cerevisiae*). Dessa forma, estudos de micro-organismos com boa atividade para CGTase, que visem a diminuição dos custos de produção, o aumento da disponibilidade de CD, são interessantes para o setor industrial. O emprego de técnicas recentes de manipulação genética, que disponibilizem uma CGTase melhorada, são igualmente importantes. Assim, foram obtidos maiores e melhores detalhes das enzimas analisadas, visando melhorar ainda mais suas características físico-químicas e viabilizar a aplicação industrial dessas enzimas.

II. REVISÃO LITERATURA

II.1. Amido

O amido é um dos polímeros de armazenamento mais abundantes na natureza e é um recurso para muitos processos industriais, incluindo a produção de materiais biológicos para alimentos, devido a sua funcionalidade em engrossar, emulsão estabilizante e agente substituto de óleo (SYNOWWIECKI, 2007), indústria têxtil, detergentes e biocombustíveis (ROY et al., 2013; VAN DER MAAREL; LEMMHUIS, 2013). Além de servir como alimento, também é processado industrialmente em uma série de derivados que são aplicados em diversos setores tais como fluídos de perfuração de petróleo, adesivos, papel e revestimentos de algodão, ou gelificantes, emulsionantes e agentes de aumento de viscosidade em produtos alimentares. O amido também gera alguns produtos de hidrólise, como maltodextrinas, xaropes de frutose elevada, tais como xarope de milho em escala industrial (VAN DER MAAREL; LEMMHUIS, 2013) a ser utilizados como agentes e / ou edulcorantes em refrigerantes, ketchup e doces. Os xaropes de glicose, derivados principalmente de milho ou amido de trigo, tornaram-se a matéria-prima básica para a indústria de bioetanol (BAI et al., 2012; ROY et al., 2013).

Quando destinado à utilização em alimentos e em produtos alimentícios é principalmente processado por aquecimento da mistura ou homogeneização de

amilose e amilopectina desestabilizando grânulos e tornando-os de fácil acesso para as enzimas digestivas (VAN DER MAAREL; LEMMHUIS, 2013).

O processo de hidrólise enzimática do amido é realizado em duas etapas: a liquefação e a sacarificação. No processo de liquefação, os grânulos de amido são dispersos em solução aquosa, aquecidos (causando a gomificação) e hidrolisados parcial e irreversivelmente, com auxílio de uma α -amilase (MAAREL et al., 2002). A temperatura de gomificação varia bastante entre os amidos de diferentes fontes botânicas, oscilando na faixa de 65 a 105°C, sendo necessário muitas vezes o emprego de altas temperaturas para a total gomificação.

Após a liquefação, a solução de maltodextrina é hidrolisada em glicose por uma enzima desramificante, seja endoenzima (isoamilase e pululanase) ou exoenzima (β -amilase e glicoamilase), atuando sobre as ligações glicosídicas α -1,6 da amilopectina (MAAREL et al., 2002). O resultado dessa segunda etapa, a sacarificação, é uma solução de sacarídeos de baixo peso molecular como glicose e maltose.

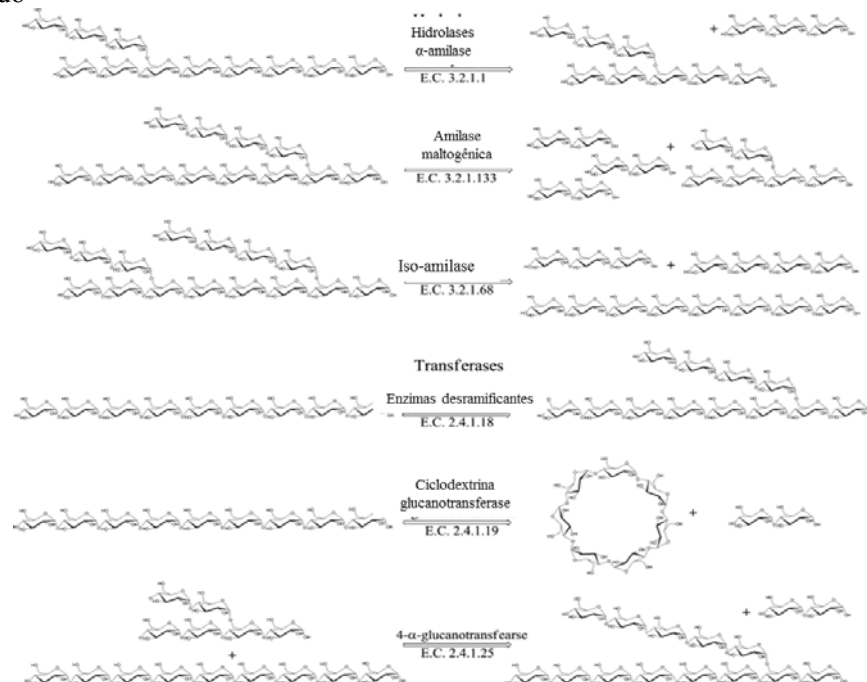
O processamento de amido geralmente emprega amilases termoestáveis e acidófilas no passo de liquefação. A atividade e a estabilidade da maior parte das amilases industriais utilizadas atualmente estão em declínio, pois as enzimas devem suportar um pH baixo no processamento do amido, e o passo de liquefação de amido funciona a um pH restrito de cerca de 6,5, sendo um pH maior do que o pH da suspensão de amido. Assim, a identificação e exploração microbiana de amilases termoestáveis e acidófilas (ativa em pH inferior a 6,5) são de grande demanda (EMTENANI et al., 2015).

No entanto, o modo convencional de processamento de amido requer um elevado fornecimento de energia, que por sua vez aumenta o preço dos produtos à base de amido. Por isso, foram feitos esforços consideráveis para produzir enzimas amilolíticas capazes de atuar em materiais com pH ácido, e a uma temperatura moderada muito abaixo da temperatura de gelatinização, o que seria econômico para as indústrias de processamento de amido (ASOODEH et al., 2010; ROY et al., 2013).

II.1.1. Enzimas degradadoras do amido

O amido pode ser degradado utilizando-se hidrólise ácida, ácida-enzimática, ou apenas enzimática, mas a utilização de enzimas amilolíticas, em substituição às substâncias químicas na produção de derivados de amido, tem apresentado algumas vantagens. Primeiro, quanto à especificidade das enzimas na produção de xaropes de açúcar com propriedades químicas e físicas conhecidas e segundo que a hidrólise enzimática é mais branda resultando em poucas reações intermediárias e menor escurecimento. As várias enzimas capazes de degradar o amido são chamadas de amilases hidrolíticas, que quebram as ligações na molécula do amido, reagindo em presença de água, resultando em uma nova extremidade não redutora (Figura II.1) (VAN DER MAAREL et al., 2002; CHRISTIANSEN et al., 2009).

Figura II.1- Representação esquemática da ação das enzimas envolvidas na degradação do amido



Fonte: van der Maarel e Leemhuis (2013) com modificações.

Basicamente, existem quatro grupos de enzimas que convertem o amido: endoamilases, exoamilases, enzimas desramificantes e as transferases. (VIHINEN; MÄNTSÄLÄ, 1989; VAN DER MAAREL et al., 2002):

Endoamilases: são capazes de quebrar as ligações α - 1-4 aleatoriamente nas moléculas de amido, produzindo oligossacarídeos de vários tamanhos, ramificados ou não. Uma típica endoamilase é a α -amilase (EC 3.2.1.1) que é encontrada em uma grande variedade de organismos, desde Archae até Bactéria e Eucaria. Glicose, maltose, maltotriose, maltotetraose, maltopentaose e maltohexaose são produtos originários da ação de α -amilase.

Exoamilases: são capazes de atuar nas ligações α -1,4 a partir da extremidade não redutora da molécula de amido, gerando apenas produtos de baixo peso molecular, principalmente glicose e maltose. β -amilase (EC 3.2.1.2) é um representante das exoamilases que converte o amido em maltose e β -dextrina limite. Muitas dessas enzimas são incapazes de atuar nas ligações α -1,6 e a degradação de compostos ramificados fica incompleta, resultando em compostos com alta massa molecular (dextrinas limite). A glucoamilase (EC 3.2.1.3) é outra amilase importante desse grupo que atua no amido ou oligossacarídeos liberando β -glicose. A α -glicosidase (EC 3.2.1.20) pode quebrar as ligações α -1,6, porém essa reação é mais lenta, quando comparada com a hidrólise das ligações α -1,4.

Enzimas desramificantes: são enzimas que quebram exclusivamente ligações do tipo α -1,6. Exemplos de enzimas desramificantes são a isoamilase e a pululanase. A isoamilase (EC 3.2.1.68) quebra especificamente as ligações α -1,6 de amilopectina e dextrinas ramificadas. Tanto isoamilase como pululanase hidrolisam as ligações α -1,6 da amilopectina liberando oligossacarídeos lineares de cadeia longa como produto final. A pululanase pode ser classificada em dois grupos de acordo com a especificidade ao substrato e o produto formado: pululanase do tipo I e pululanase do tipo II. A pululanase do tipo I (EC 3.2.1.41) hidrolisa as ligações α -1,6 do pululano, que é um polímero formado por unidades de maltotriose unidas pelas ligações glicosídicas α -1,6 e de oligossacarídeos ramificados, liberando maltotriose e oligossacarídeos lineares, respectivamente. A

pululanase do tipo II ou amilopululanase hidrolisa também, as ligações α -1,4 da amilopectina liberando açúcares menores como glicose, maltose e maltotriose.

Em contraste com o descrito acima, as enzimas pululano hidrolase I e pululano hidrolase II são incapazes de quebrar a ligação glicosídica α -1,6 do pululano ou de substratos ramificados, ambas quebaram apenas as ligações glicosídicas α -1,4. A pululano hidrolase tipo I ou neopululanase (EC 3.2.1.135) hidrolisa pululano à panose. A pululano hidrolase tipo II ou isopululanase (EC 3.2.1.57) hidrolisa pululano a isopanose. Recentemente foi descrita a pululano hidrolase tipo III em Archea, podendo hidrolisar tanto as ligações glicosídicas α -1,4 bem como α -1,6 do pululano, liberando maltotriose, panose e maltose.

Transferases: são enzimas que quebram ligações glicosídicas α -1,4 da molécula doadora e transferem parte do doador a um aceptor glicosídico com a formação de uma nova ligação glicosídica. As enzimas amilomaltase (EC 2.4.1.25) e ciclodextrina glucanotransferase (CGTase, EC 2.4.1.19) formam uma nova ligação α -1,4, enquanto as enzimas de ramificação (EC 2.4.1.18) formam uma nova ligação α -1,6. Essas enzimas realizam reações de transglicosilção intermolecular e intramolecular, dependendo da posição do fragmento a ser transferido se está entre duas moléculas de açúcar (amilomaltase) ou se faz parte da mesma cadeia polissacarídica (CGTase e algumas enzimas ramificantes), respectivamente (BERTOLDO; ANTRANIKIAN, 2002).

II.1.2. Aplicação das Enzimas Amilolíticas

Com a utilização de enzimas, os ingredientes se tornam mais eficientes fazendo com que resíduos em grandes quantidades sejam evitados. Os maiores produtores de enzimas importantes são Danisco com participação de mercado de 21%, DSM com participação de mercado de 6%, AB Enzimas com uma quota de mercado de 5% e BASF, com uma quota de mercado de 4% (SPOHNER et al., 2015).

As enzimas têm sido usadas tradicionalmente para laticínios, panificação, fabricação de cerveja e vinicultura, por séculos, e sua aplicação mantém o pão

macio e fresco por mais tempo, aumenta o volume de massa e pode compensar as variações de farinha e qualidade do malte. Além disso, as enzimas são usadas para reduzir a concentração de álcool e calorias na cerveja. Em enologia, o teor de enxofre pode ser reduzido, e a clareza da cor do vinho pode ser mantida, sabores e a capacidade de filtração podem ser melhorados. Na fabricação de ração animal, as enzimas são usadas principalmente para aumentar a disponibilidade de nutrientes essenciais (por exemplo, de fitase). Elas são usadas para complementar os espectros de atividades de enzimas que estão presentes na alimentação ou as próprias enzimas digestivas dos animais (LEE et al., 2013; SPOHNER et al., 2015).

Dependendo do uso pretendido, as enzimas alimentares podem ser divididas nas seguintes categorias: ingredientes alimentares, aditivos alimentares e auxiliares tecnológicos. Ingredientes alimentares são enzimas adicionadas por motivos nutricionais, mas isso raramente é o caso. Mais vulgarmente, as enzimas são adicionadas por razões técnicas. As enzimas que ainda estão presentes numa forma ativa no produto final são definidas como aditivos alimentares. Caso contrário, as proteínas presentes no produto geralmente pertencem à categoria de auxiliares de processamento (SPOHNER et al., 2015).

II.2.Família 13 glicosil hidrolases

As α -amilases juntamente com outras enzimas amilolíticas como pululanases, CGTases, α -glicosidase, isoamilase, amilases produtoras de maltooligosacarídeos, glucodextranase e neopululanase degradam o amido são incluídas na família 13 glicosil hidrolases (EMTENANI et al., 2015) caracterizadas por uma conformação $(\beta/\alpha)_8$ -barril (VAN DER VEEN, 2000; SYNOWWIECKI, 2007; JANECEK; SVENSSON; MACGREGOR, 2011; ZHOU, YI, et al., 2012; HAN et al., 2013; ARA et al., 2015).

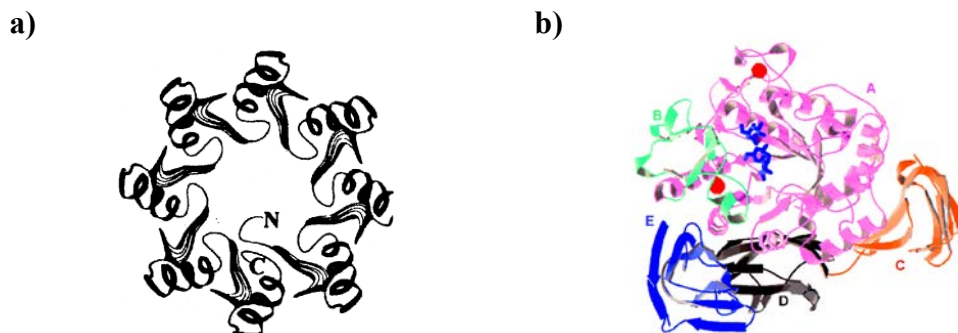
A maioria dos membros da família GH13 é constituída por uma estrutura tridimensional básica das enzimas amilolíticas que consiste de três domínios comuns: A, B, e C. No entanto, a estrutura tridimensional de CGTase revela dois domínios adicionais, D e E, em adição aos domínios A, B, e C. O domínio A

possui uma estrutura de núcleo catalítico $(\beta/\alpha)_8$, seguido pelo domínio C que consiste em cadeias- β . O domínio B é inserido entre a terceira cadeias- β e a terceira α hélice de um $(\beta/\alpha)_8$ -barril (Figura II.2a). Desta forma, os domínios A e B formam a fenda de ligação do substrato e contêm os resíduos catalíticos. E o domínio C tem sido importante como o substrato de ligação. Os dois domínios adicionais, D e E, subsequente à região C-terminal do domínio C, e enquanto que a função do domínio D é desconhecida, o domínio E está envolvido na ligação de amido granular que possui uma organização independente de domínio que retém a atividade de ligação ao amido quando isolado dos outros quatro domínios (A a D) da CGTase. Portanto, os domínios D e E podem desempenhar papéis fundamentais na degradação de polissacarídeos com ligação α -1,4 (Figura II.2b) (VAN DER VEEN, 2000; ZHOU YI, et al., 2012; HAN et al., 2014).

As enzimas são biocatalizadores de processos químicos complexos, principalmente em condições brandas. A exploração de enzimas em processos laboratoriais, industriais e comerciais é o resultado da sua elevada atividade em meio aquoso, alta especificidade para o substrato e alta seletividade do produto. No entanto, algumas enzimas foram selecionadas por meio da evolução natural para exercer as suas funções fisiológicas sob condições extremas, e operar de forma otimizada a diferentes graus de temperaturas, salinidade e pH. Para serem bem sucedidos na indústria, os biocatalisadores precisam ser estáveis e funcionais em condições que possam estar muito longe de seus ambientes fisiológicos.

Comumente, as enzimas naturais não cumprem todos os requisitos de um biocatalisador industrial e necessitam da melhoria de uma ou mais características funcionais antes da sua implementação nos processos químicos. Tais melhorias podem ser alcançadas utilizando diferentes ferramentas. Por exemplo, o desenvolvimento de novos genes metagenômicos fez as enzimas estarem prontamente acessíveis a ambientes termofílicos, mesmo quando os micro-organismos parentais não são cultiváveis. A rápida clonagem e over-expressão de genes de enzimas alvo em hospedeiros adequados é agora um processo rápido e de rotina (COWAN; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2011).

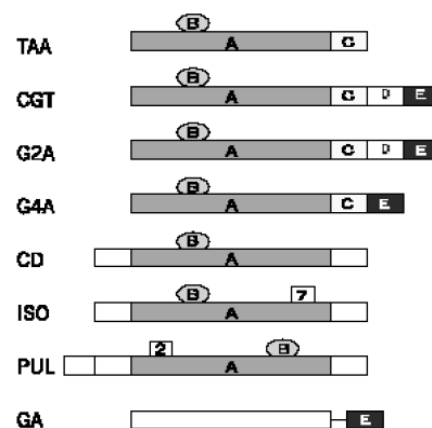
Figura II.2– Representação esquemática das estruturas: a) $(\beta/\alpha)_8$ -barril e b) 3D de uma CGTase.



Fonte modificada: Nilsen e Borchet (2000).

Na Figura II.3 pode ser observada a disposição dos domínios de algumas enzimas envolvidas na degradação do amido.

Figura II.3- Nível de organização dos domínios de enzimas que degradam o amido.



Fonte: van der Veen et al. (2000). TAA: α -amilase de *Aspergillus oryzae* (Taka amilase A); CGT: CGTase de *Bacillus circulans*; G2A: α -amilase maltogênica de *Bacillus stearothermophilus*; G4A: α -amilase formadora demaltotetraose de *Pseudomonas stutzeri*; CD: ciclodextrinase de *Klebsiela oxytoca*; ISO: isoamilase de *Pseudomonas amyloclavata*; PUL: pululanase de *Klebsiela aerogenes*; GA: glucoamilase de *Aspergillus niger* (família 15 das glicosil hidrolases).

II.3. α -amilase

II.3.1. Características gerais

As α -amilases são capazes de catalisar as ligações glicosídicas α -1,4 de um modo de ação endo, liberando um mix de oligossacarídeos e atendem a uma ampla gama de aplicações em processamento de amido, fabricação de cerveja, fermento, e as indústrias de detergentes, por meio da qual eles classificam o

primeiro em termos de utilização comercial (GUPTA et al., 2003; EMTENANI, 2015). As α -amilases com características desejáveis, tais como estabilidade térmica, especificidade de substrato, um perfil amplo pH, atividade melhorada, e resistência adequada contra os agentes de desnaturação como metais pesados merecem grande atenção na indústria (EMTENANI, 2015).

II.3.2. Produção

A produção de amilases por fermentação submersa (SMF) e fermentação em estado sólido (SSF) foi exaustivamente investigada e é afetada por uma variedade de fatores físico-químicos que incluem: a composição do meio de crescimento, pH médio, concentração de fosfato, a idade do inóculo, temperatura, aeração, fonte de carbono e fontes de nitrogênio (VIHINEN; MÄNTSÄLÄ, 1989; GUPTA et al., 2003; GHASEMI et al., 2010; NWAGU; OKOLO, 2011). As fontes de nitrogênio comumente utilizadas incluem farinha de soja, extrato de levedura, peptona e extrato de carne (OLIVEIRA et al., 2007; NWAGU; OKOLO, 2011).

Amilases que mostram atividade ótima em pH ácido, são usadas principalmente em xarope de glicose e panificação indústrias, ao passo que aqueles que mostram atividades em pH alcalino têm encontrado aplicações em formulações de detergentes para a roupa (GHORBEL et al., 2009; ROY et al., 2013).

II.3.3. Aplicação

Esta enzima pode ser de origem bacteriana e fúngica; sendo que apresenta algumas características em comum, como relativa estabilidade térmica (70°C-15 minutos), labilidade ácida (todas são inativadas a pH 3,6 por curto tempo), e aumento da estabilidade na presença de íons de cálcio. A viscosidade de uma solução de amido diminui rapidamente com a hidrólise pela alfa-amilase-liquefação do amido. A atividade da enzima decresce rapidamente com o menor grau de polimerização do substrato. O processo de catálise é acelerado quando se tem amido gelatinizado. As principais aplicações são na produção de xaropes de amido e açúcares e na panificação com a complementação da farinha utilizando α -amilase fúngica.

Uma vez que este grupo de enzimas tem um amplo espectro de aplicações industriais, é necessária uma contínua busca de novas amilases com propriedades extremas para enfrentar os desafios em processos industriais severos e condições extremas, tais como o aumento do sal, baixa ou alta temperatura e pH ácido ou alcalino. Atualmente, muita atenção tem sido dada à enzimas exploradas a partir de organismos vivos em habitats extremos. Como os nichos exclusivos do oceano da comunidade microbiana têm considerável potencial de exploração, o ecossistema marinho tem atraído grande interesse como um recurso para o isolamento e identificação de enzimas extremófilas (WU et al., 2014).

Várias amilases com características específicas, tais como atividade a baixas temperaturas, tolerância ao sal e estabilidade do pH tem sido isoladas e identificadas a partir de bactérias marinhas, tais como a α -amilase da bactéria *Nocardiopsis* sp. 7326 que abriga oceanos profundos, e *B. subtilis* tolerante ao sal de uma biblioteca metagenômica marinha (WU et al., 2014).

Amilases com propriedades desejáveis de tolerância ao sal e estabilidade alcalina possuem extensas aplicações biotecnológicas, especialmente na indústria de detergentes para máquinas lavar louça e da indústria têxtil. Além disso, as α -amilases com uma temperatura ótima de 50-65°C tem uma potencial vantagem sobre as α -amilases hipertermófilas para uso na liquefação de amido, uma vez que pode reduzir a formação de subprodutos e a demanda de energia (WU et al., 2014).

Zunongwangia profunda (MCCC 1A01486), uma cepa marinha isolada da superfície da água do mar na área costeira de Fujian, China, foi relatada por produzir grandes quantidades de amilases. (QIN; HUANG; LIU, 2014; WU et al., 2014). Após ser clonada, purificada e completamente caracterizada, foi confirmada que era uma α -amilase altamente alcalina-estável e tolerante ao sal (WU et al., 2014).

II.4.Ciclodextrina glucoamilase (CGTase)

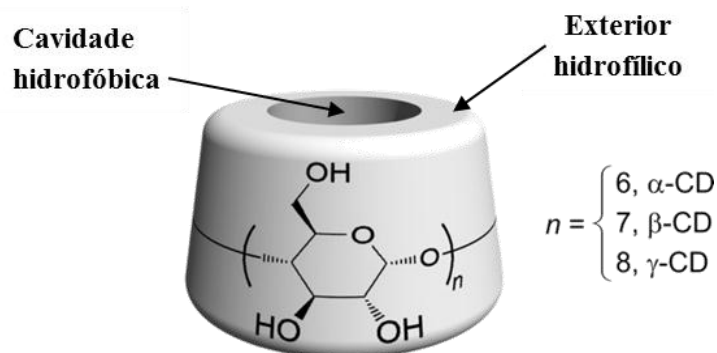
II.4.1. Características gerais

A ciclodextrina glucoamilase (CGTase) representa um dos grupos de amilases microbianas mais importantes industrialmente por ser capaz de converter o amido em açúcares. Esta conversão ocorre por meio de uma reação de ciclização que os transforma em oligossacarídeos cíclicos não redutores chamados ciclodextrinas (CD), importados na célula, onde são ali processados para fornecer energia ao hospedeiro (IBRAHIM et al., 2012; 2013; 2014; VAN DER MAAREL; LEEMHUIS, 2013).

A disposição estérica de unidades de glicose da molécula de ciclodextrina (CD) resulta na forma de um cone truncado oco com uma superfície exterior hidrofílica e uma cavidade interna hidrofóbica, que permite as CDs reter uma grande variedade de moléculas hóspedes, para formar complexos de inclusão com várias moléculas (Figura II.4) (IBRAHIM et al., 2012; 2013; 2014; POÓR et al., 2015) e serem solúveis em água (WENZ; HAN; MULLER, 2006). Todavia, este complexo de estabilidade e seletividade pode ser substancialmente aumentado com as modificações químicas adequadas (LARRAÑNETA; ISASI, 2014; POÓR et al., 2015; SHEN et al., 2015). Os complexos de inclusão são formados com diversos compostos orgânicos e inorgânicos. A inclusão do composto nas moléculas de CD pode levar a alterações favoráveis nas propriedades químicas e físicas das moléculas hóspedes (IBRAHIM et al., 2014).

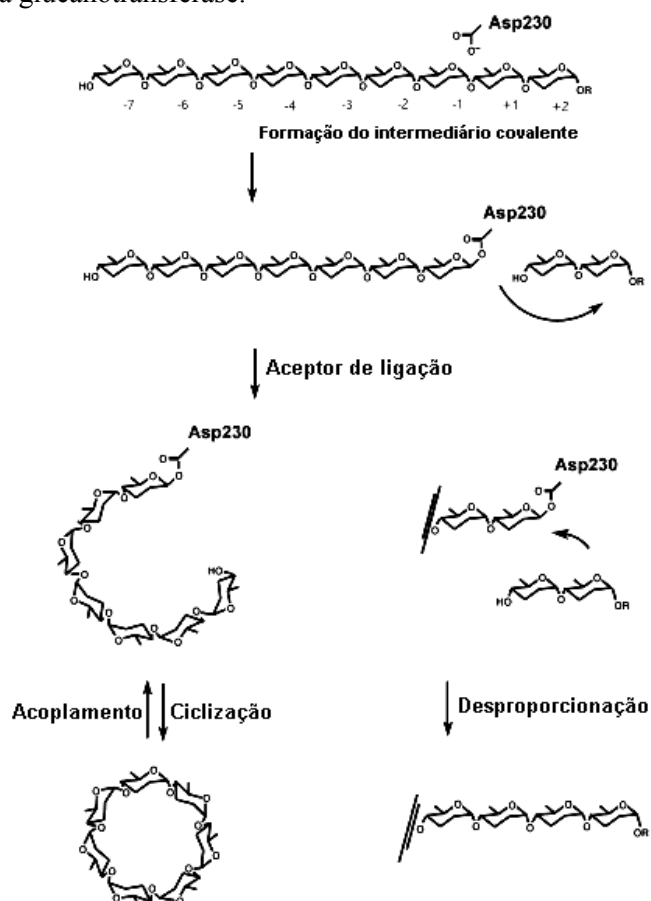
A CGTase representa um dos grupos mais importante de amilases microbianas que catalisam quatro reações diferentes: ciclização, acoplamento, desproporcionamento e as reações de hidrólise do amido (Figura II.5), (ARA et al., 2015; COSTA et al., 2015). Tais reações favorecem os três tipos principais de CD: α -, β -, e γ -ciclodextrina, que são compostos por seis, sete e oito α -1,4 unidades de glicose ligadas, respectivamente (Figura I.4) (VIHINEN; MÄNTSÄLÄ, 1989; WENZ; HAN; MULLER, 2006; IBRAHIM et al., 2012; 2013; 2014; POÓR et al., 2015).

Figura II.4- Característica e fórmula estrutural da molécula de ciclodextrina (WENZ; HAN; MULLER, 2006).



Fonte modificada: Leemhuis et al. (2003).

Figura II.5 – Representação esquemática das reações de transglicosilação catalisadas pela Ciclodextrina glucanotransferase.



Fonte: Leemhuis et al. (2003). Alves-Prado et al. (2005). No primeiro passo da reação, um Ácido Aspártico (Asp) é ligado covalentemente, no sítio de clivagem, formando um oligossacarídeo intermediário. Em um segundo passo, esse oligossacarídeo é transferido para uma molécula receptora.

A CGTase tem sido encontrada em várias espécies bacterianas aeróbias mesofílicas, principalmente *Bacillus*. No entanto, devido ao nível de expressão limitada, é uma CGTase com fatores limitantes na preparação de CD (CHENG et al., 2011; LI et al., 2014; ARA et al., 2015). As CGTases do tipo selvagem têm sido conhecidas por produzir um mix de α , β e γ -CD em diferentes taxas, permitindo as CGTases individuais a serem classificadas em α , β e γ -CGTases. Como a separação de diferentes CDs é dispendiosa e demorada, a síntese de um tipo de CD é de grande interesse (IBRAHIM et al., 2012; WANG et al., 2013). As CGTases utilizadas para a produção industrial de CDs exibem baixa seletividade de produto, pois o processo de isolamento de uma única CD tem alto custo e demanda um longo período de tempo (WANG et al., 2013).

Dessa forma, estudos de micro-organismos com boa atividade para CGTase, que visem a diminuição dos custos de produção, o aumento da disponibilidade de CD são interessantes para o setor industrial. O emprego de técnicas recentes de manipulação genética, que disponibilizem uma CGTase melhorada, são igualmente importantes.

Na produção da proteína heteróloga de interesse, o gene da proteína a ser expresso deve primeiramente ser inserido em um vetor de expressão. Os vetores de expressão são capazes de se auto-replicar e regular a expressão dos genes neles codificados. As estruturas que formam um vetor são: promotores, origens de replicação, sítios iniciadores e terminadores tanto da transcrição como da tradução, marcadores seletivos, sítios de múltipla clonagem ou de ligação do gene isolado. Para a clonagem de genes são utilizados três tipos de vetores: plasmídeos, bacteriófagos e cosmídeos (EINSFELDT, 2010).

Este processo de produção de proteína recombinante não é um processo natural da célula hospedeira, sendo assim, muitas vezes causa problemas à célula, dificultando a produção da proteína heteróloga. Desta forma, a produção da proteína recombinante envolve vários fatores, como características da proteína a ser produzida, vetores e hospedeiros utilizados, escolha do processo utilizado e purificação da proteína produzida, sendo que todos estes fatores precisam ser profundamente conhecidos. Para a expressão, a célula é cultivada sob pressão

seletiva, na maioria dos casos através da adição de antibiótico no meio de cultivo e, desta forma, apenas as células que possuem o plasmídeo com o gene de resistência ao antibiótico poderão crescer. Um dos problemas do uso de antibiótico é a contaminação da biomassa e do produto, o que não seria aceitável para proteínas utilizadas para fins médicos (BANEYX, 1999; EINSFELDT, 2010). Além disso, este método pode se tornar inviável em escala industrial, pois os custos da adição de antibióticos poderiam ser enormes e, para produtos com fins alimentícios e farmacêuticos, os antibióticos devem ser removidos no processo de purificação (EINSFELDT, 2010).

II.4.2. Produção

O primeiro micro-organismo descrito na literatura como produtor de CGTase foi o *Bacillus amylobacter* (*Clostridium butyricum*) com o qual Villers produziu as primeiras dextrinas de Schardinger. O *Bacillus macerans* (*Aerobacillus macerans*) foi isolado em 1904 por Schardinger. Mais tarde, em 1939, Tilden e Hudson (1942) realizaram os primeiros estudos com CGTase produzida por esse micro-organismo e comprovaram que as CDs não eram produtos sintetizados durante o metabolismo microbiano, e sim, resultado da ação de uma enzima extracelular, produzida pelo micro-organismo, que hidrolisava o amido e compostos relacionados.

Os parâmetros fermentativos para a produção de CGTase pelos diferentes tipos de fermentação como a submersa, submersa com substrato e em estado sólido, bem como, diferentes fontes de carbono e nitrogênio foram analisadas. Dentre alguns dos micro-organismos estudados nesses ensaios ao longo dos anos estão listados a seguir: o *Bacillus alkalophilic* CGII (FREITAS et al., 2004; AGUIAR et al., 2014), *B. cereus* (JAMUNA et al., 1993; RAMAKRISHNA et al., 1994), *B. circulans* (PONGSAWASDI E YAGISAWA, 1987; AGUIAR et al., 2014), *B. circulans* DF 9R (COSTA et al., 2015), *B. firmus* (GAWANDE et al., 1998), *B. lehensis* (ELBAZ; SOBHI; ELMEKAWY, 2014), *B. macerans* (PÓSCI et al., 1998; AGUIAR et al., 2014), *B. sp* (NAKAMURA E HORIKOSHI, 1976; ALVES-PRADO et al., 2002a), *B. sp* subgrupo alcalophilus E16 (ALVES-

PRADO, 2002b), *B. stearothermophilus* linhagens 2/2, R2 e HR1 (RAHMAN et al., 2004; AGUIAR et al., 2014), *Paenibacillus campinasensis* (YIM et al., 1997; YOON et al., 1998; ALVES-PRADO et al., 2006), *B. megaterium*, *B. subtilis*, *Micrococcus varians*, *M. luteus* e *Klebsiella pneumoniae* (AGUIAR et al., 2014), e dos gêneros *Klebsiella*, *Anaerobranca*, *Thermoanaerobacter*, *Thermoanaerobacterium* e *Thermococcus* (COSTA et al., 2014). *Paenibacillus* é um gênero de bactérias amplamente distribuído no ambiente. Algumas das espécies que pertencem a este gênero têm sido isoladas a partir do solo (GARBEVA et al., 2003; LEE et al., 2013), água e em diferentes rizosferas de plantas (LEE et al., 2013).

Os meios testados para a produção de CGTase, inicialmente, foram do tipo sólido. Kitahata et al. (1974) propuseram um meio líquido, usando amido solúvel e caldo de maceração de milho, enquanto Nakamura e Horikoshi (1976) propuseram dois tipos de meio de produção, um com amido solúvel e caldo de maceração de milho e outro denominado de meio II, composto de amido solúvel, extrato de levedura, peptona, K_2HPO_4 , $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ e Na_2CO_3 . Esse último meio foi o mais difundido entre os pesquisadores, sendo que a maioria dos autores utiliza esse meio de produção como base para fermentações com micro-organismos produtores de CGTase, principalmente *Bacillus*.

II.4.3. Clonagem e expressão dos genes para ciclodextrina glucanotransferase

A produção de enzimas pelos micro-organismos selvagens é relativamente baixa, quando se visa sua aplicação industrial. Então, torna-se necessário o uso de um sistema de over-expressão para a produção industrial de enzimas. Atualmente, diversos genes de micro-organismos produtores de enzimas foram clonados. Os genes que codificam a CGTase têm sido clonados em hospedeiros heterólogos e homólogos com o objetivo de aumentar a produção, conhecer a estrutura da enzima e seu mecanismo de ação e modificar suas propriedades, adequando-as a aplicações industriais (EINSFELDT, 2010).

Para atender a demanda industrial, proteínas de interesse podem ser produzidas em altos níveis por meio da utilização da engenharia genética. A expressão de proteínas recombinantes pode ser realizada em bactérias, em leveduras ou em células de insetos, plantas ou mamíferos. Para a expressão da proteína de forma bem sucedida, a escolha do sistema de expressão é de fundamental importância e deve levar em consideração a estrutura da proteína, sua funcionalidade e complexidade e, também, a produtividade desejada (DEMAIN; VAISHNAV, 2009; EINSFELDT, 2010).

A bactéria gram-negativa *Escherichia coli* é amplamente utilizada na indústria da biotecnologia para a produção de proteínas recombinantes (EINSFELDT, 2010; GARCÍA et al., 2013) inclusive em escala comercial isto porque, além de oferecer várias vantagens, como a capacidade de crescer rapidamente em altas concentrações celulares e em substratos baratos, possui genética bem caracterizada e existem vários vetores e cepas mutantes disponíveis comercialmente. Além disso, o genoma de *E. coli* pode ser modificado com facilidade, suas células têm capacidade de acumular mais de 80% da sua massa seca em proteína recombinante e ainda sobrevivem em uma variedade de condições de cultivo (DEMAIN; VAISHNAV, 2009; EINSFELDT, 2010).

A clonagem e a over-expressão do gene para a CGTase pode fornecer um caminho direto de maior eficiência e expansão do mercado de ciclodextrinas, devido à possibilidade de aumento significativo de rendimento da enzima que pode vir a ocorrer. A secreção de CGTase ativa pelo hospedeiro pode simplificar a purificação da enzima. Por outro lado, a CGTase do sobrenadante pode ser aplicada diretamente na produção de ciclodextrina, se a concentração da enzima for suficientemente alta e o sobrenadante livre de inibidores. Alguns ensaios de clonagem e expressão do gene para CGTase serão comentados a seguir (EINSFELDT, 2010).

Schmid (1989) e sua equipe conseguiram clonar e secretar em *E. coli*, CGTases do tipo α , β e γ . Para tanto, foi construído um plasmídeo de expressão onde o gene estrutural da α -CGTase produzida por *Klebsiella oxytoca* M5 foi colocado sob o controle induzível do „*tac*-promotor“. Mais tarde, eles conseguiram

clonar em um plasmídeo de expressão para β -CGTase produzida por *Bacillus* sp 1-1 alcalofílico. Essa CGTase ficou levemente modificada quando comparada à enzima nativa, considerando a sequência de aminoácidos da região N-terminal. No entanto, tal mudança não afetou a atividade específica da enzima. Tais autores estudaram ainda a expressão de CGTase no hospedeiro homólogo *B. subtilis*. No entanto, *B. subtilis* produz altas quantidades de proteases extracelulares e citoplasmáticas. Isso poderia dificultar a produção de proteínas estranhas. Foi assim usado um hospedeiro com sistema de secreção de protease negativa. Tal hospedeiro carrega também um derivado do gene *sacQ* regulatório positivo que melhora a transcrição a partir do promotor da subtilisina. O rendimento da CGTase expressa em *B. subtilis* foi 300 vezes maior que na linhagem selvagem (SCHMID, 1989; OHDAN et al., 2000).

Alguns pesquisadores clonaram a CGTase produzida por diferentes micro-organismo em hospedeiro heterólogo *E. coli* usando como vetores plasmídeos dos tipos pUB110 (Takano et al., 1986); pBR322 (KANEKO et al., 1988, KANEKO et al., 1989); pUC (SIN et al., (1991); pCRII e pET-21(+) (LEE; TAO, 1994). Outros autores usaram a técnica da construção de uma biblioteca genômica para alcançar a clonagem do gene para CGTase, como Nitschke et al (1990) com CGTase de *B. circulans* n°8; Kitamoto et al. (1992) com CGTase de *Bacillus* sp. KC201; Jorgensen et al. (1997) com CGTase de *Thermoanaerobacter* sp. ATCC53627; Kim et al. (1998) com CGTase produzida por *Brevibacillus brevis* CD162; Martins et al. (2003) com a CGTase produzida por *Bacillus agaradhaerens* LS-3C e Thiemann et al. (2004) com a CGTase produzida por *Anaerobranca gottschalkii*.

Nesse sentido, a obtenção do gene da enzima clonado em uma linhagem de fácil monitoramento é o passo fundamental para os estudos na área da engenharia genética que visem melhorar as características enzimáticas, como por exemplo, estabilidade, especificidade, termoestabilidade, pH de ação e aumento da produção.

Para o desenvolvimento de aplicações industriais mais generalizados, há uma necessidade em diminuir o custo de produção de β -ciclodextrina. Um meio

eficaz para conseguir este objetivo consiste em reduzir a quantidade de proteína de CGTase necessária durante o processo, porque esta enzima é um fator de custo significativo na produção de β -ciclodextrina. Assim, mutantes de CGTase com elevada atividade de ciclização são de grande interesse industrial (LI, Z. et al., 2014b; HUANG et al., 2014).

Estudos atuais apontam que alguns efeitos provocados por mutações em aminoácidos em sítios da molécula da enzima podem melhorar a termoestabilidade conformacional da molécula, aumentar significativamente a atividade de ciclização e a produção de ciclodextrina (HUANG et al., 2014).

Uma vez que a produção industrial de ciclodextrinas é finalizada sob temperaturas elevadas, as CGTases empregadas no processo necessitam ter uma excelente estabilidade a estas temperaturas. Portanto, é importante estabelecer a termoestabilidade de CGTases com potenciais papéis industriais. A estabilidade térmica de uma enzima depende de vários fatores intrínsecos (composição de aminoácidos) e extrínsecos (íons metálicos, presença de co-fatores, pH, etc.). O aumento da estabilidade térmica da enzima utilizada num processo industrial pode ser feito de várias maneiras: a enzima atualmente a ser utilizada pode ser substituída por uma enzima mais termoestável, identificada por screening de termófilos extremófilos, a enzima existente pode ser estabilizada por modificação química, engenharia de proteínas ou imobilização, ou a mistura reacional pode ser alterada, utilizando compostos poli-hidroxi, para aumentar a estabilidade térmica da enzima existente (LI C. et al., 2014).

Em seu trabalho, Li C. et al. (2010) constataram que a β -CGTase de *Bacillus circulans* STB01 tem uma termoestabilidade relativamente baixa (semi-vida <10 min a 60 ° C), o que limita severamente a sua aplicação industrial. Posteriormente, o autor seus colaboradores, Li C. et al. (2014) proporcionaram com sucesso uma melhor estabilidade térmica a esta enzima alterando o tampão de reação, utilizando o polietileno glicol (PEG), um polímero não iônico hidrofílico amplamente utilizado como um estabilizador de poli-hidroxi.

A estabilidade destes biocatalisadores é de grande preocupação em quase todos bioprocessos, devido ao seu impacto no custo e economia do processo.

Resultados mostram uma redução da estabilidade do biocatalisador em tempos de reação mais longos; rendimentos inferiores de produtos; e aumento da frequência de substituição do catalisador (IBRAHIM et al., 2014). A utilização de enzimas de micro-organismos termofílicos (ou seja, organismos que crescem de forma ótima na gama de 60-100 °C) tem sido frequentemente proposta como uma solução para o problema da estabilidade das enzimas. Todavia, mesmo utilizando estas enzimas estáveis, há espaço para algumas melhorias em suas propriedades (COWAN; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2011).

II.4.4. Aplicação Industrial da Ciclodextrina Glucanotransferase

As CDs possuem uma ampla gama de aplicações relacionadas à alimentação, produtos químicos, cosméticos, agricultura, produtos farmacêuticos e indústrias de plásticos (SZEJTLI, 1982; VAN DER MAAREL; LEEMHUIS, 2013; WANG et al., 2013; HANCI et al., 2014; IBRAHIM et al., 2014; ARA et al., 2015).

As aplicações de CD incluem, por exemplo, o aumento da solubilidade dos componentes ativos. Além disso, aplicações alimentícias e farmacológicas também são conhecidas (IBRAHIM et al., 2014; POÓR et al., 2015). Na indústria de alimentos, a propriedade de encapsulação da CD é vantajosa para solubilizar compostos hidrofílicos em água reduzindo a volatilidade de moléculas de odor. Além disso, estão sendo usadas como aditivos para mascarar sabores indesejáveis e para extrair o colesterol dos alimentos; bem como na prevenção do endurecimento de produtos da panificação, basicamente pelo fato da enzima ser estruturalmente muito semelhante à solução de enzima anti-endurecimento comercial Novamyl da Novozymes. A Novamyl é uma amilase maltogênica do *B. stearothermophilus* que cliva unidades de maltose a partir da extremidade não redutora das cadeias laterais da amilopectina, que retarda a retrogradação. O encurtamento de uma volta próxima ao sítio ativo mudou a Novamyl em uma CGTase. CGTases, e mutantes de CGTases, também foram relatadas para melhorar a qualidade de produtos de panificação (VAN DER MAAREL; LEEMHUIS, 2013).

Estudos recentes revelaram que certas ciclodextrinas são capazes de aumentar o sinal de fluorescência de numerosas micotoxinas; por esta razão, a sua aplicação analítica é altamente reconhecida (ZHOU et al., 2012). As micotoxinas são moléculas perigosas bem conhecidas, entre as quais a ocratoxina A (OTA) é um contaminante alimentar generalizado, ou seja, um metabólito secundário em espécies dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* que ocorrem em muitos alimentos (por exemplo, cereais, frutas, carne e produtos lácteos) e bebidas (por exemplo, leite, vinho, cerveja e café), bem como em alimentos para animais. Seus efeitos carcinogênicos, teratogênicos imunotóxicos e hepatotóxicos ainda estão sendo estudados. Além da utilização analítica de CD, outra importante aplicação é remover a OTA a partir da utilização do polímero β -CD-poliuretano em vinhos. A identificação de novos derivados de CD com preferência por OTA seria de grande importância médica. Uma vez que as CD são moléculas atóxicas, se a hipótese de que, caso se obtenha um complexo estável adequado, as CD teriam relação com a desintoxicação de OTA, mesmo em sistemas in vivo (POÓR et al., 2015).

Poór et al. (2015) estudaram uma CD quimicamente modificada que gera um complexo mais estável com OTA do que os derivados descritos anteriormente e declararam a hipótese de amônio quaternário de α -ciclodextrina (QABCD) possa ser um candidato adequado para atenuar a toxicidade OTA.

O Sugamadex é uma γ -ciclodextrina modificada que encontrou rapidamente um lugar no uso clínico por reverter seletivamente o bloqueio neuromuscular e a capacidade de encapsular rapidamente os bloqueadores neuromusculares esteroides, aumentando a quantidade desses no plasma e os separando dos receptores nicotínicos de acetilcolina. (MENEZES et al., 2012; HANCI et al., 2014). Esta CD atua na encapsulação da molécula de rocurônio, um relaxante muscular por meio de uma ligação não covalente, formando, assim, um novo complexo molecular que não age sobre a junção neuromuscular proporcionando a adequação ao tempo de ação do rocurônio que anteriormente, além de atuar na junção neuromuscular aumentava em seis vezes o risco de morte no período pré-operatório (MENEZES et al., 2012).

Os agentes anestésicos intravenosos são comumente introduzidos via cateter venoso em unidades de terapia intensiva (UTI) podendo ser contaminados por micro-organismos em várias fases durante o preparo para uso. É importante que as propriedades antibacterianas ou a capacidade dos agentes anestésicos propiciarem uma contaminação bacteriana sejam conhecidas (KELES et al., 2006; HANCI et al., 2014). Alguns agentes anestésicos, como o propofol, são conhecidos por propiciar o crescimento de micro-organismos, enquanto outros, como o sulfato de morfina, tiopental de sódio, citrato de fentanil, dexmedetomidina e midazolam podem inibir o crescimento microbiano. Esses medicamentos que são administrados por via intravenosa podem ser contaminados durante as várias fases de produção ou preparação. Algumas ciclodextrinas, como dimetil- β -ciclodextrina, foram usadas para aumentar a produção de *Helicobacter pylori*, enquanto outras, como hidroxipropil- β -ciclodextrina, foram descritas por impedir a produção bacteriana quando usadas para revestir próteses vasculares (HANCI et al., 2014). Hanci et al. (2014) avaliou e concluiu que o Sugamadex não apresentou efeitos antimicrobianos sobre *S. aureus*, *E. fecalis*, *E. coli* e *P. aeruginosa*. Keles et al. (2010) investigaram e concluíram que in vitro, o midazolam teve um efeito antimicrobiano, em *E. coli*, *P.aeruginosa*, *A. baumannii* e *E. coli* ESBL. Porém, propofol e dexmedetomidina, etomidato-lípuro não tiveram efeito antimicrobiano em qualquer um dos microrganismos testados.

A curcumina (Diferuloylmethane), derivada do açafrão (*Curcuma longa*), tem sido muito utilizada como tempero e agente aromatizante. Mas estudos relatam que a curcumina possui anticancerígeno, reduz o colesterol no sangue, previne a lesão hepática e inibe a agregação de plaquetas. Hidrogéis de ciclodextrinas estão sendo utilizados para aumentar a solubilidade e biodisponibilidade da curcumina (DAVIDOV-PARDO; AROZARENA; MARIN-ARROYO, 2013; EZHILARASI et al., 2013; KO et al., 2015).

O flúor é um elemento essencial para a manutenção adequada da saúde óssea humana. Por outro lado, uma quantidade em excesso de fluoreto é tóxica para todas as formas de seres vivos que provocam problemas gástricos e renais graves, esquelético e pode provocar danos no DNA (VILLAGRÁN et al., 2004;

BARUAH et al., 2015). Em seu estudo, Baruah et al. (2015) projetou um novo sistema baseado em pontos de carbono preparados a partir de gel de quitosana tampado com β -ciclodextrina e calix areno-25,26,27,28-tetrol para detecção sensível e seletiva de íons de flúor em meio aquoso. O sistema proposto foi eficaz na detecção mínima do flúor em água potável, $1,5\text{mg F.L}^{-1}$, definido pelo Ministério da Saúde através da publicação da Portaria 518, como o Valor Máximo Permitido (VMP) (DOU, 2004).

Os flavonóides naturais, especialmente os seus glicosídeos, são os polifenóis mais abundantes nos alimentos e têm diversas atividades biológicas. A biotransformação de agliconas de flavonóides em seus glicosídeos é vital na biossíntese de flavonóides. As principais estratégias biológicas que têm sido utilizadas para conseguir a glicosilação flavonóide no laboratório envolvem a engenharia de via metabólica e biotransformação microbiana (XIAO et al., 2014). As antocianinas são os mais abundantes glicosídeos flavonóides além de serem amplamente utilizados como pigmentos vegetais solúveis em água em produtos alimentares. A importância das atividades biológicas de antocianinas para a saúde humana e prevenção da doença também tem sido frequentemente relatada. Foram relatadas algumas atividades das antocianinas importantes para a saúde humana que incluíram excelentes propriedades antioxidantes, neuroprotetor, anticarcinogênica e funções antidiabéticos e saúde dérmica (NIZAMUTDINOVA et al, 2009; WU et al., 2015). No entanto, as antocianinas têm uma fraca estabilidade e podem ser facilmente hidrolisados em compostos incolores (WU et al., 2015). A co-pigmentação é uma estratégia conhecida para melhorar a estabilidade das antocianinas (YAN et al., 2013). A encapsulação de antocianinas com o uso de β -ciclodextrina pode ser útil para melhorar a estabilidade de armazenamento de antocianinas chokeberry e, também, a sua biodisponibilidade no trato gastrointestinal, o que pode melhorar os benefícios para a saúde (HOWARD; BROWNMILLER PRIOR; MAUROMOUSTAKOS, 2013; WU et al., 2015).

A erva *Scutellaria lateriflora* (Solidéu americana) tem sido utilizada na medicina tradicional para o tratamento de várias condições médicas, incluindo

distúrbios do sistema nervoso e câncer. Estudos anteriores já haviam relacionado essas propriedades medicinais para flavonóides presentes nas raízes e folhas desta espécie (PATEL et al., 2013; MARSH et al., 2014). Marsh et al. (2014) estudaram a biossíntese destes compostos bioativos em culturas de raiz pilosa de *S. lateriflora*. Vários compostos fenólicos, incluindo verbascoside, e as flavonas wogonin, baicaleína, escutelarina e glucuronídeos foram identificados. As culturas incubadas sob luz contínua e tratadas com metil- β -ciclodextrina, durante 24 h produziram níveis significativamente mais elevados de agliconas, baicaleína e wogonin.

Apesar da grande importância de CD para muitos campos da indústria, suas amplas aplicações ainda são limitadas significativamente por conta de seu baixo rendimento e alto preço. Portanto, a obtenção de novas CGTases tem uma grande contribuição científica e prática para a produção enzimática de CDs (ATANASOVA et al., 2011; LI, Z. et al., 2014a; ELBAZ; SOBHI; ELMEKAWY, 2014)

II.5. Processos fermentativos

II.5.1. Otimização das condições de cultivo

A produção de amilases é muito influenciada por fatores nutricionais e físico-químicos, tais como pH, temperatura de incubação e as fontes de carbono e nitrogênio, que diferem significativamente com a natureza bioquímica da estirpe microbiana. Por isso, a otimização dos componentes do meio de fermentação e as condições fisiológicas de crescimento é essencial para a otimização do padrão de síntese do produto. O método de otimização clássica, a otimização única variável, não só é demorado e tedioso, mas também não descreve os efeitos completos dos parâmetros do processo e ignora as interações combinadas entre os parâmetros físico-químicos. Em contraste, a aplicação da técnica de desenho experimental estatística em desenvolvimento um processo de fermentação pode melhorar o rendimento do produto, reduzir a variabilidade e duração do processo, e pode atingir mais o custo do processo eficaz (STERGIOU et al., 2014).

O processo de fermentação do meio e sua composição afeta grandemente o crescimento e a produtividade de enzimas extracelulares de micro-organismos. O custo e disponibilidade do substrato são considerações importantes, e, por conseguinte a seleção de um substrato apropriado desempenha um papel essencial no desenvolvimento de um processo eficiente de SSF (ZAR; ALI; HAQ, 2012).

Modelos estatísticos para a otimização têm sido empregados com sucesso na produção de enzimas na pesquisa mundial (MACIEL et al., 2008). As vantagens do planejamento experimental incluem: redução do número de experiências ou repetições e melhora da qualidade da informação obtida através dos resultados. Isto significa uma sensível diminuição do trabalho e, conseqüentemente, do tempo e do custo final (RODRIGUES; IEMMA, 2009).

A metodologia de superfície de resposta (RSM) é uma técnica usada para explicar os efeitos combinados de todas as variáveis envolvidas. Ela é resumida como uma coleção de ferramentas e técnicas para construir e explorar uma relação funcional aproximada entre a variável resposta e um conjunto de variáveis de cálculos estatísticos. A aplicação mais extensiva de RSM pode ser encontrada em várias situações em que as variáveis de entrada influenciam a medida do desempenho (chamado de resposta) de uma maneira que é difícil descrever. Pode ser possível obter uma expressão para a medida do desempenho com base nos valores obtidos a partir de experiências de resposta de uma combinação particular de variáveis de entrada (SONI et al., 2003; ZAR; ALI; HAQ, 2012).

Seja k o número de fatores em estudo, cada qual com N níveis, denota-se um esquema fatorial completo por N^k . O planejamento fatorial mais simples e o mais estudado é aquele em que todas as variáveis são estudadas em dois níveis: superior (+) e inferior (-). O planejamento de dois níveis, tendo k variáveis em estudo, irá requerer a realização de 2^k ensaios diferentes, sendo denominado de fatorial 2^k . A adição de pontos axiais permite ajustar as respostas experimentais a um modelo de segunda ordem (RODRIGUES; IEMMA, 2009; ZIMBARD, 2014).

II.5.2. Aproveitamento de resíduos

O Brasil, por ser um país de grande atividade agrícola, é um dos que mais produzem subprodutos agroindustriais. A tendência atual é de aproveitar estes materiais, obtendo produtos com alto valor agregado, como as enzimas (MENEZES; SILVA; DURRANT, 2009, MARTINS et al., 2002).

A produção industrial de enzimas é geralmente limitada pelos custos dos substratos utilizados para o cultivo dos micro-organismos. Estima-se que por volta de 30 a 40% do custo envolvido na produção de enzimas esteja relacionado ao meio de cultura utilizado para o crescimento do micro-organismo. Assim, o uso de substratos alternativos é de grande importância para a redução dos custos de produção (BERNARDES et al., 2014).

As preocupações para reduzir a poluição ambiental têm incentivado o uso de fontes como os resíduos agro-industriais através de bioprocessos (SILVA et al., 2013). Resíduos vegetais representam uma fonte alternativa de nutrientes para o crescimento microbiano devido a redução de custos em vários processos fermentativos (BRIJWANI et al., 2010; SILVA et al., 2013) e à sua semelhança com o habitat natural dos micro-organismos, que servem como um substrato adequado para o crescimento microbiano com a consequente formação de produtos de interesse industrial (MILAGRES et al., 2004).

Recentemente, vários subprodutos têm sido utilizados como substratos para micro-organismos em processos fermentativos, visando à produção de enzimas. Por sua ampla disponibilidade e por representar uma fonte alternativa de baixo valor comercial, o aproveitamento destes materiais pode contribuir para a redução do custo operacional da produção enzimática, além de minimizar possíveis impactos ambientais decorrentes do seu descarte inadequado (LEITE et al., 2007; BERNARDES, 2014)

Farelos, palhas e farinhas de diferentes grãos e tubérculos, tais como cevada, milho, mandioca, batata, arroz, sorgo e trigo, têm sido utilizados como fontes de carbono no meio de fermentação, enquanto fontes de nitrogênio utilizadas incluem farinha de soja, extrato de levedura, peptona e extrato de carne (OLIVEIRA et al., 2007; NWAGU; OKOLO, 2011).

III. OBJETIVOS

No presente trabalho foi estudada a produção de amilases totais, α -amilase e CGTases por linhagens bacterianas isoladas de áreas de Cerrado, na região de Ilha Solteira-SP e do estado do Mato Grosso do Sul, com os seguintes objetivos:

- a) Seleção das fontes de carbono alternativas como substratos na produção enzimática de linhagens selecionadas em estudos anteriores
- b) Perfil de produção enzimática ao longo do tempo com as fontes de carbono selecionadas na etapa anterior com maior rendimento de atividade enzimática
- c) Caracterização físico-química da atividade enzimática bruta quanto à temperatura e pH ótimos das enzimas de interesse.
- d) Otimização do meio de cultivo visando à produção de amilase das linhagens selecionadas alcançando maiores atividades enzimáticas;
- e) Estratégias para clonagem e expressão do gene para CGTase:
 - Extração do DNA de *Paenibacillus campinasensis* H69-3;
 - Alinhamento das sequências de genes de CGTase
 - Síntese dos primers específicos para a amplificação do gene *cgt*;
 - Reação de PCR

IV. MATERIAL E MÉTODOS

IV.1. Micro-organismos

Linhagens bacterianas com boa produção de amilases foram selecionadas, entre os isolados de áreas de Cerrado, avaliadas em estudos anteriores e que seguiram o seguinte padrão de nomeação: primeira sigla em maiúsculo da enzima analisada, neste caso amilase (A) seguida do numeral da colônia isolada de forma aleatória (ALVES-PRADO et al, 2002a ,2002b, 2006; REIS; ALVES-PRADO, 2012a, 2012b, REIS, et al., 2012c). As linhagens com produção de amilases totais e α -amilases de maiores atividades foram nomeadas como A-1.2 e A-18. A linhagem com produção de CGTase com alta atividade na formação de CD foi identificada como da espécie alcalofílica termotolerante *Paenibacillus campinasensis* H69-3 pela Coleção Brasileira de Micro-organismos de Ambiente e Indústria (CPQBA) da UNICAMP. Os micro-organismos fazem parte da coleção de estudo do Laboratório de Microbiologia e Processos Biotecnológicos da UNESP Campus Ilha Solteira. As culturas foram mantidas em meio nutriente alcalino inclinado (ALVES-PRADO, 2000). Além disso, as características físico-químicas da solução enzimática bruta produzida por estas linhagens se mostraram interessantes.

IV.2. Isolamento de micro-organismos

Meio seleção para amilase

Aproximadamente 1,0 g de amostra de solo cultivado com produtos amiláceos, dejetos agrícolas, materiais de compostagem, foram coletados em campo e transferidos diretamente para frascos contendo 4 mL de meio nutriente proposto por Gomes et al, (2005) com algumas modificações, composto de: 2 g.L⁻¹ 0% amido solúvel; 2 g.L⁻¹ peptona; 2 g.L⁻¹ extrato de levedura; 1,4 g.L⁻¹ (NH₄)₂SO₄; 2 g.L⁻¹ K₂HPO₄; 2 g.L⁻¹ MgSO₄.7H₂O; 1,60 mg.L⁻¹ MnSO₄.H₂O; 1,40 mg.L⁻¹ ZnSO₄.7H₂O; 2,0 mg.L⁻¹ CoCl₂; pH 5,0. Após incubação a 45°C por 24 h, o material líquido será transferido por esgotamento em estria, com o auxílio de uma alça de inoculação, para placas de Petri contendo o mesmo meio acrescido de 1,5% agar. Todas as colônias morfológicamente diferentes foram purificadas por estriamento em placas. As culturas puras foram estocadas em ágar dextrosado de batata (PDA) inclinado e foram mantidas a 7°C, para os testes de produção.

Meio de seleção para CGTase

Aproximadamente 1 g de solos sombreados e agrícolas, como solos de hortas, culturas de mandioca, milho e banana, foi transferido diretamente para um frasco contendo 5 mL de meio nutriente alcalino, proposto por Nakamura e Horikoshi (1976) e composto por 10,0 g/L amido solúvel; 5,0 g/L peptona; 5,0 g/L extrato de levedura; 1,0 g/L K₂HPO₄; 0,2 g/L MgSO₄.7H₂O; 10,0 g/L Na₂CO₃* (*esterilizado separadamente e adicionado ao meio após atingir a temperatura de 60°C) ; pH 10,0. As amostras foram incubadas a 45°C, por aproximadamente 24 horas. Em seguida, o material será inoculado superficialmente, por esgotamento em estrias, em placas de Petri contendo meio de cultura seletivo para CGTase, proposto por Park et al (1989) composto por 10,0 g/L amido solúvel; 5,0 g/L peptona; 5,0 g/L extrato de levedura; 1,0 g/L K₂HPO₄; 0,2 g/L MgSO₄.7H₂O; 0,03 g/l fenolftaleína; 0,1 g/L alaranjado de metila; 15,0 g/L ágar; 10,0 g/L Na₂CO₃* (*esterilizado separadamente e adicionado ao meio após atingir a temperatura de 60°C) pH 10,0. Esse meio tem coloração vermelha e se houver a produção de CGTase pelo micro-organismo, haverá a formação de ciclodextrinas que se

complexa com a fenolftaleína, resultando em um halo amarelo, contrastante com o meio vermelho. As placas foram incubadas a 45°C, por períodos de até 144 horas. As colônias, que formaram o halo (CGTase positivas), foram transferidas para tubos de ensaio contendo meio inclinado de manutenção e armazenadas para os ensaios de produção.

IV.3. Produção das enzimas

IV.3.1. Fermentação submersa (FSm)

Os micro-organismos isolados foram analisados quanto à produção da enzima sob fermentação submersa usando amido solúvel como fonte de carbono. Cada linhagem foi cultivada em um frasco de Erlenmeyer de 125 mL, contendo 20 mL de meio de produção. A fermentação ocorreu a temperatura ambiente ($\pm 30^\circ\text{C}$) e agitação de 100 ciclos por minuto. O material fermentado foi centrifugado a 10.000xg por 10 minutos, mantidos posteriormente sob refrigeração. O sobrenadante foi usado como solução enzimática, livre das células para os ensaios de atividade enzimática. As linhagens que apresentaram maiores atividades enzimáticas foram estudadas quanto a produção das enzimas por fermentação submersa (FSm) visando o aproveitamento de resíduos agroindustriais como fontes alternativas de carbono.

IV.4. Determinação de atividade enzimática

IV.4.1. Atividade amilase

A atividade para amilase (1,4- α -D-gucano glucanohidrolase, E.C. 3.2.1.1) foi analisada utilizando os métodos dextrinizante descrito por Fuwa (1954) e Ponsawasdi e Yagisawasdi (1987) com modificações, e pela determinação de açúcar redutor usando o método de Somogyi-Nelson (1960).

Para o método dextrinizante, a mistura da reação foi composta por 0,1 mL da solução enzimática convenientemente diluída, onde foi adicionado a 0,3 mL de solução de amido solúvel a 0,5%, em tampão acetato 0,1 M, pH 5,5. Após incubação a 50 °C, por 10 minutos, a reação foi paralisada pela adição de 4,0 mL de solução de HCl 0,2 M. Em seguida, a reação recebeu 0,5 mL de reativo de Iodo

(0,30 % de KI e 0,03 % de I₂) e a mistura de reação foi diluída com 10 mL de água destilada. O controle foi preparado conforme o processo descrito, substituindo-se a enzima pelo volume equivalente de enzima inativa. A absorbância foi determinada a 700 nm em espectrofotômetro. Uma unidade de atividade foi definida como sendo a quantidade de enzima necessária para reduzir em 10 % a intensidade da cor azul do complexo Iodo-Amido por minuto.

Para o método de determinação de açúcar redutor por Somogyi-Nelson (1960) a mistura da reação foi composta por 0,1 mL solução de amido solúvel a 0,5 %, em tampão acetato pH 5,0, 0,1 M,. Após incubação a 50°C, por 10 minutos, a reação foi paralisada com 0,5 mL do reagente I e incubada em banho de gelo. Tal mistura foi incubada em banho de ebulição a 100°C por 10 minutos, e resfriada em banho de gelo por 5 minutos. Em seguida, 0,5 mL do reagente II foram adicionados e misturados até sua homogeneização, seguido de 3,5 mL de água. Após homogeneização foi determinada leitura em espectrofotômetro a 540 nm. Uma unidade de atividade amilase foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 µg de glicose por minuto, nas condições de reação, utilizando curva de calibração de glicose.

IV.4.2. Atividade CGTase

A atividade CGTase foi analisada pelo método fenolftaleína, baseado naquele proposto por Mäkelä et al. (1988) com algumas modificações. Para este método a mistura da reação foi composta por 0,1 mL da solução enzimática convenientemente diluída, onde foi adicionado a 0,4 mL de solução de amido solúvel a 1,0%, em tampão acetato 0,1 M, pH 5,5. Após incubação a 55°C, por 10 minutos, a reação foi paralisada pela adição de 250 µL de solução de Solução Na₂CO₃ 1,0M. Em seguida, a reação recebeu 200 µL de solução de trabalho de fenolftaleína 0,4mM, 1:10 (solução estoque/água) imediatamente antes do uso. (Solução estoque de fenolftaleína 3,75mM em etanol 94%). O volume final de 2,5 mL foi completado com água. O controle foi preparado conforme o processo descrito, substituindo-se a enzima pelo volume equivalente de enzima inativa. A absorbância foi determinada a 550 nm em espectrofotômetro. Uma unidade de

formação atividade CD foi definida como a quantidade de enzima que é produzido 1 μmol de $\beta\text{-CD}$ por minuto sob estas condições.

IV.4.3.Determinação de proteína

A proteína foi determinada pelo método de Hartree-Lowry, usando soro albumina bovina como padrão (HARTREE, 1972).

IV.5. Estudo do efeito das fontes de carbono

O ensaio ocorreu em duplicata em frasco de Erlenmeyer de 125 mL, contendo 20 mL de meio de produção contendo 0,5% de extrato de levedura; 0,5% de peptona; 0,1% de K_2HPO_4 ; 0,02% de MgSO_4 ; 1% de fonte de carbono; 0,5% de Na_2CO_3 (autoclavado separadamente) e suplementado com 1% de farinha de soja integral tostada como fonte adicional de proteína. A fermentação ocorreu a temperatura de 45°C e agitação de 100 ciclos por minuto durante 72 horas. O material fermentado foi centrifugado a 10.000/xg por 10 minutos, mantidos posteriormente sob-refrigeração. O sobrenadante foi usado como solução enzimática, livre das células para os ensaios de atividade enzimática.

A avaliação do efeito da fonte de carbono como substrato na produção enzimática das linhagens A-1.2 e A-18, empregou-se farelo de trigo, farelo de mandioca, amido de trigo, amido de mandioca, amido solúvel, amido de milho e amido de batata. A fermentação se deu em frascos Erlenmeyer de 125 mL, a 30°C, 120 rpm contendo 20 mL de meio nutriente.

A produção de CGTase pelo *P. campinasensis* H69-3 visou o aproveitamento das fontes de carbono e nitrogênio alternativas, o micro-organismo foi submetido a ensaios de produção de ciclodextrinas, sob fermentação submersa utilizando diferentes substratos como fonte de carbono alternativa ao amido solúvel. As fontes de carbono analisadas foram: farinha de arroz comercial (Arrozina[®]), amido de milho comercial (Maizena[®]), amido de mandioca, farelo de trigo e amido solúvel.

IV.6. Perfil de produção ao longo do tempo

Para os ensaios do perfil de produção enzimática, que foi analisado ao longo do tempo, com as fontes de carbono selecionadas na etapa anterior, a produção as quais obtiveram as maiores atividades enzimáticas. A determinação da atividade enzimática foi realizada na solução enzimática bruta, que foi obtida por centrifugação a 10.000g por 10 min., a qual foi armazenada sob refrigeração.

Nas análises das linhagens A-1.2 e A-18, a fermentação foi realizada até 120 horas com amostragens a cada 24 horas. E nas análises de *P. campinasensis* H69-3, o perfil de produção enzimática foi analisado ao longo do tempo, até 96 horas com amostragens a cada 24 horas.

IV.7. Caracterização físico-química das enzimas

Para a caracterização físico-química da atividade enzimática bruta quanto à temperatura e pH ótimos da enzima de interesse foi utilizada a fonte de carbono que apresentou o melhor rendimento de atividade enzimática e foram realizados para os ensaios. A determinação da atividade enzimática foi realizada na solução enzimática bruta, que foi obtida por centrifugação a 10.000g por 10 min., a qual foi armazenada sob refrigeração.

IV.7.1.Efeito da temperatura

O efeito da temperatura na ação enzimática de amilase foi avaliado encubando as enzimas a temperaturas que variaram 5 °C, na faixa entre 30 a 80 °C em banho-maria pré-aquecido. A atividade residual foi determinada pelo método de Somogyi-Nelson, como descrito no item IV.4.1 com tampão acetato de sódio pH5,5. Para o efeito da temperatura na atividade CGTase foi utilizado o método fenolftaleína descrito por Mäkelä et al. (1988) como descrita no item IV.4.2. A atividade residual também foi determinada pelo método Fenolftaléina .

IV.7.2.Efeito do pH

O pH ótimo da atuação das amilases das linhagens A-1.2 e A-18 foi determinado utilizando tampões entre pH 3.0 a 8,0 (tampão McIlvaine) e pH 8,0 a

11,0 (tampão glicina-NaOH) sob a temperatura de 50°C proposta pelo método de Somogyi-Nelson (1960) descrita no item IV.4.1. Para atividade CGTase o pH ótimo foi determinado utilizando tampões entre pH 3,0 a 8,0 (tampão McIlvaine) e a atividade CGTase e residual foi determinada pelo método Mäkelä et al. (1988) como descrita no item IV.4.2.

IV.8. Planejamento experimental

IV.8.1.Otimização do meio de produção

Este processo foi escolhido para o estudo da otimização da produção, aplicando-se um planejamento experimental. Analisou-se as concentrações do meio de produção proposto por Gomes et al. (2005) para o cultivo de diversos micro-organismos. A linhagem nomeada como A-1.2, foi selecionada por apresentar boa e reprodutiva produção de α -amilase.

IV.8.2.Planejamentos fatoriais

O planejamento fatorial 2^{6-1} com três ensaios no ponto central teve o intuito de determinar, quantitativamente, quais fatores tiveram os maiores efeitos na produção da enzima amilase e as possíveis interações entre eles. Cada um dos ensaios do planejamento fatorial foi executado em triplicata e dessa forma, consideraram-se as médias dos resultados obtidos dessas repetições.

O delineamento experimental adotado para verificar a influência dos componentes do meio de produção, foi o planejamento fatorial 2^{6-1} com três ensaios no ponto central. Os componentes do meio (fatores), a serem analisados, foram as concentrações: de substrato, de peptona, de extrato de levedura, de K_2HPO_4 , $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ e de $(NH_4)_2SO_4$. Foram realizadas fermentações utilizando meio de produção na composição proposta por Gomes et al. (2005), de forma a estabelecer uma comparação com os demais meios testados. Os níveis dos fatores se encontram na Tabela IV.1. Foi realizado um sorteio para determinar a ordem dos ensaios e, desta forma, manter uma condição de aleatoriedade (Tabela IV.2).

Tabela IV.1 - Fatores e valores dos níveis analisados no planejamento fatorial 2^{6-1} com três ensaios no ponto central.

Fatores	Mínimo (-1)	Central (0)	Máximo (+1)
X ₁ - Substrato (%)	0,50	1,25	2,00
X ₂ - Extrato de levedura (%)	0,10	0,30	0,50
X ₃ - Peptona (%)	0,10	0,30	0,50
X ₄ - K ₂ HPO ₄ (%)	0,10	0,30	0,50
X ₅ - MgSO ₄ .7H ₂ O (%)	0,00	0,025	0,05
X ₆ - (NH ₄) ₂ SO ₄ (%)	0,05	0,10	0,15

Tabela IV. 2 - Matriz do planejamento fatorial 2^{6-1} com três ensaios no ponto central

Ensaio	Amido Solúvel	Extrato de Levedura	Peptona	K ₂ HPO ₄	MgSO ₄ .7H ₂ O	(NH ₄) ₂ SO ₄
1	+1	+1	+1	+1	+1	+1
2	+1	+1	+1	+1	-1	-1
3	+1	+1	+1	-1	+1	-1
4	+1	+1	+1	-1	-1	+1
5	+1	+1	-1	+1	+1	-1
6	+1	+1	-1	+1	-1	+1
7	+1	+1	-1	-1	+1	+1
8	+1	+1	-1	-1	-1	-1
9	+1	-1	+1	+1	+1	-1
10	+1	-1	+1	+1	-1	+1
11	+1	-1	+1	-1	+1	+1
12	+1	-1	+1	-1	-1	-1
13	+1	-1	-1	+1	+1	+1
14	+1	-1	-1	+1	-1	-1
15	+1	-1	-1	-1	+1	-1
16	+1	-1	-1	-1	-1	+1
17	-1	+1	+1	+1	+1	-1
18	-1	+1	+1	+1	-1	+1
19	-1	+1	+1	-1	+1	+1
20	-1	+1	+1	-1	-1	-1
21	-1	+1	-1	+1	+1	+
22	-1	+1	-1	+1	-1	-1
23	-1	+1	-1	-1	+1	-1
24	-1	+1	-1	-1	-1	+1
25	-1	-1	+1	+1	+1	+1
26	-1	-1	+1	+1	-1	-1
27	-1	-1	+1	-1	+1	-1
28	-1	-1	+1	-1	-1	+1
29	-1	-1	-1	+1	+1	-1
30	-1	-1	-1	+1	-1	+1
31	-1	-1	-1	-1	+1	+1
32	-1	-1	-1	-1	-1	-1
33	0	0	0	0	0	0
34	0	0	0	0	0	0
35	0	0	0	0	0	0

IV.8.3. Análises estatísticas

Os dados experimentais foram analisados estatisticamente em ensaios de triplicata de acordo com os planejamentos preestabelecidos, para verificar o nível dos efeitos dos fatores e de suas interações. As análises estatísticas dos dados foram realizadas pelo software "STATISTICA® for Windows" versão 5.0, utilizando a função "Experimental Desing".

IV.9. Estratégias para clonagem e expressão do gene para CGTase

IV.9.1. Extração DNA genômico de *Paenibacillus campinasensis* H69-3

Para as análises moleculares o micro-organismo foi cultivado sob fermentação submersa em frascos Erlenmeyer de 125 mL, contendo 20 mL de um meio alcalino, composto por amido solúvel, extrato de levedura, peptona, K_2HPO_4 , $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ e Na_2CO_3 . O cultivo se deu em BOD shaker por 72 horas a 45°C e 150 ciclos por minuto. A atividade CGTase foi analisada pelos métodos Dextrinizante e CD-fenolftaleína. As cepas que apresentaram as maiores atividades enzimáticas foram plaqueadas e a colônia pura foi utilizada para os ensaios de extração de DNA genômico seguindo o protocolo do Kit GenElute™ Bacterial Genomic DNA (SIGMA®) da seguinte maneira: 1,5 mL do meio cultivado *overnight* da colônia pura de *P. caminasensis* em 20 mL do meio alcalino foi pipetado em um tubo e centrifugado por 2 minutos a 12.000-16.000xg. O sobrenadante foi descartado e as células presas ao fundo do tubo foram ressuspendidas em 200 µL de solução de lisozima e incubadas a 37°C por 30 minutos. A lisozima age na quebra dos carboidratos da membrana celular (ERENO, 2007). A lise das células ocorreu com a adição de 20 µL da solução Proteinase K e 200 µL de solução de lise C para a suspensão celular, e agitação do tubo. As etapas seguiram o protocolo contido no kit. O filtrado coletado foi utilizado para as análises da extração do DNA.

Após a confirmação da extração do DNA em gel de agarose, a solução foi utilizada como molde para o isolamento e amplificação do gene que codifica a enzima CGTase através da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR).

IV.9.2. Amplificação do gene através da técnica de PCR

Com base na sequências gênicas de CGTases produzida por *Paenibacillus* ssp e *Bacillus* ssp, disponíveis no banco de dados GenBank (BLAST/NCBI), foi feito um alinhamento semi-global, pelos softwares ClustalW e BioEdit, afim de localizar trechos conservados e sintetizar manualmente os primer's específicos para a amplificação do gene *cgt* como observado na Tabela IV.3.

Os oligonucleotídeos iniciadores foram desenhados de forma a parearem com as extremidades 3' do gene de interesse. Nas extremidades 5' dos oligonucleotídeos iniciadores foram colocadas seqüências reconhecidas e clivadas por enzimas de restrição (sítios de restrição) de acordo com a estratégia de clonagem e vetor utilizados. Foram inseridas as sequências dos sítios de restrição das enzimas *EcoRI* e *XbaI* nos oligonucleotídeos senso e anti-senso, respectivamente. Estas enzimas foram escolhidas, de acordo com o vetor utilizado, neste caso pH6HTN His6HaloTag® T7 Vector (PROMEGA), de forma que, depois da clonagem, o vetor permita a expressão da proteína fusionada com uma cauda de histidina na sua extremidade carbóxi-terminal para facilitar posterior purificação. A Figura IV.1 mostra a sequênciã do sítio de clonagem e expressão do vetor pH6HTN His6HaloTag® T7, com uma representação da seqüência das enzimas de restrição onde foi inserido o gene *cgt*.

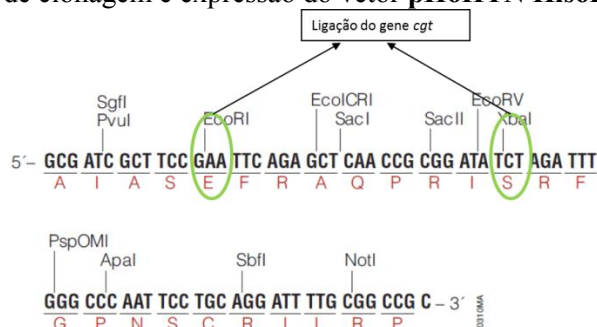
A amplificação do gene *cgt* foi feita utilizando a técnica de PCR. Para a amplificação gene *cgt* de *P. campinasensis* H69-3, foram testadas 4 diferentes misturas de reação, seguindo o protocolo apresentado na Tabela IV.4. A reação de PCR se deu com desnaturação inicial 94° C/3 minutos, com 30 ciclos de PCR (94° C/45 segundos, 47° C/50 segundos, 69° C/50 segundos) e uma extensão final 72° C/10 minutos. O DNA genômico foi utilizado na concentração de 200ng.mL⁻¹.

IV.9.3. Eletroforese

O DNA e os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose 1,0%. O tampão TAE 50x, foi preparado de acordo com Sambrook e Russel (2001). O tampão TAE 50x foi dissolvido para 1x e utilizado para dissolver a agarose e como tampão de corrida. A amostra foi diluída em tampão de amostra „Loading

buffer", composto por 0,25% azul de bromofenol; 0,25% xileno cianol FF e 30% glicerol em água. O gel foi corado com Nancy.

Figura IV.1- Sítio de clonagem e expressão do vetor **pH6HTN His6HaloTag® T7**



Fonte: PROMEGA Corporation 2014. Os círculos verdes indicam os sítios das enzimas de restrição, também adicionados aos oligonucleotídeos iniciadores, onde o gene *cgt* amplificado irá se ligar.

Tabela IV.3- Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na reação de PCR para amplificação do gene *cgt* a partir de DNA de *Paenibacillus campinasensis* H69-3.

Oligonucleotídeo iniciador	Sequência
Primer Senso	5'- ATGGAATTC-ATCACCCGATAC - 3'
Primer Anti-senso	5'- ATCTCTAGA-ATTTTGCCAGTC - 3'

Os sítios de clivagem das enzimas de restrição estão destacados em cor-de-rosa, sítio de *EcoRI* na sequência senso e *XbaI* na anti-senso.

Tabela IV.4 Protocolo das misturas de reações utilizadas para a amplificação do gene da CGTase.

Componentes	Mix 1 (µL)		Mix 2 (µL)		Mix 3 (µL)		Mix 4 (µL)	
	1x	3x	1x	3x	1x	3x	1x	3x
H ₂ O	15,7	47,1	14,7	44,1	15,2	45,6	14,2	42,6
Tampão	2,5	7,5	2,5	7,5	2,5	7,5	2,5	7,5
dNTP (10mM)	1,0	3,0	1,0	3,0	1,0	3,0	1,0	3,0
MgCl ₂ (50mM)	1,5	4,5	1,5	4,5	2,0	6,0	2,0	6,0
Primer Forward (10mM)	1,5	4,5	1,5	4,5	1,5	4,5	1,5	4,5
Primer Reverse (10mM)	1,5	4,5	1,5	4,5	1,5	4,5	1,5	4,5
Taq polimerase	0,3	0,9	0,3	0,9	0,3	0,9	0,3	0,9
Amostra de DNA	1,0	-	2,0	-	1,0	-	2,0	-
Total Mix	25 µL	24 µL	25 µL	23 µL	25 µL	24 µL	25 µL	23 µL

(-) sem adição de amostra de DNA.

V. RESULTADOS E DISCUSSÕES

V.1. Efeito das fontes de carbono na produção de amilases

Foram selecionadas 2 linhagens bacterianas, nomeadas A-1.2 e A-18, as quais apresentaram as maiores atividades enzimáticas nos estudos anteriores de isolamento. Tais linhagens foram submetidas a ensaios com diferentes fontes, sob fermentação submersa.

Os substratos farelo de mandioca, amido de mandioca, amido solúvel e amido de milho foram as fontes de carbono que resultaram nas melhores atividades enzimáticas para ambas as linhagens estudadas.

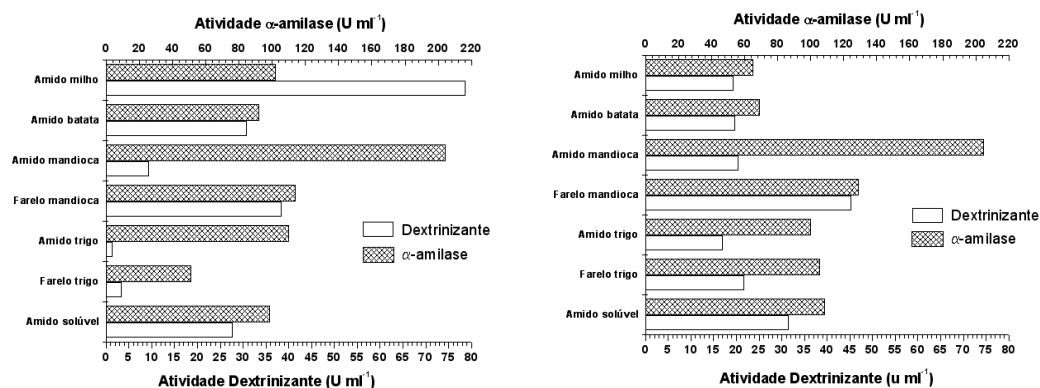
Os resultados quanto a atividade dextrinizantes e açúcar redutor para as linhagens A-1.2 e A-18, podem ser observadas nas Figuras V.1a e V.1b, respectivamente.

As maiores atividades dextrinizantes foram alcançadas com o substrato amido de milho e farelo de mandioca para a linhagem A-1.2 e farelo de mandioca e amido solúvel para a linhagem A-18.

Figura V. 1 – Efeito da fonte de carbono na produção enzimática das linhagens A-1.2 (a) e A-18 (b), cultivadas sob fermentação submersa, após 72 horas de fermentação.

a) linhagem A-1.2

b) linhagem A-1.8



V.2. Perfil de produção das enzimas ao longo do tempo

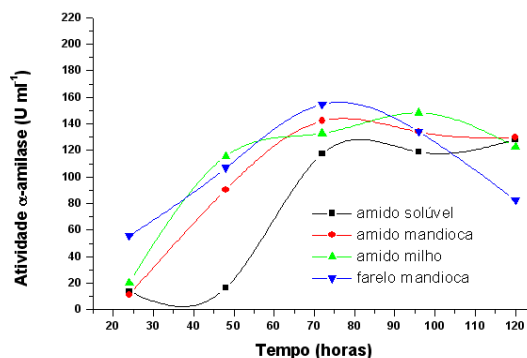
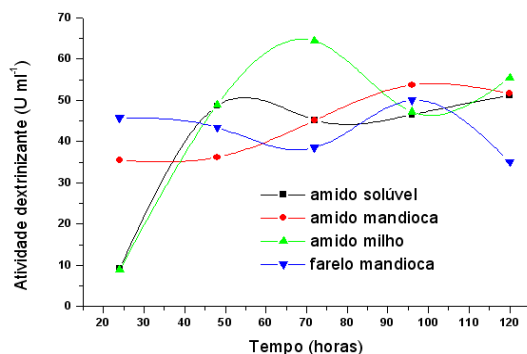
As linhagens microbianas, nomeadas como A-1.2 e A-18 foram então estudadas quanto à produção enzimática ao longo do tempo, nos substratos selecionados que proporcionaram maior atividade enzimática no ensaio anterior descrito no item V.1. Os dados desse ensaio estão ilustrados nas Figuras V. 2 (a,b) e V.2 (c,d), para as linhagens A-1.2 e A-18, respectivamente.

Para a linhagem A-1.2, amido de milho foi a fonte de carbono com maior atividade dextrinizante em 72 horas de cultivo. As demais fontes de carbono apresentaram atividade dextrinizante mais elevada com 96 horas de cultivo. Para a atividade de α -amilase o melhor resultado foi obtido em 72 horas de cultivo, sendo o farelo de mandioca a fonte de carbono com maior rendimento (Figuras V.2a e V.2b).

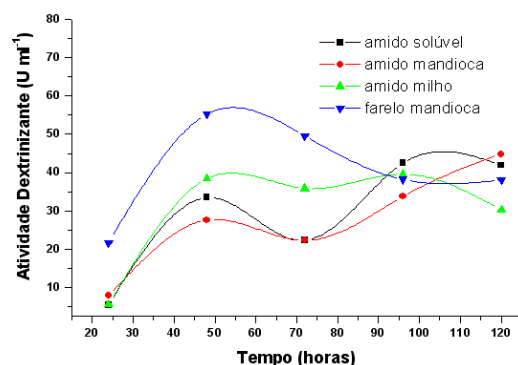
A linhagem A-18 mostrou a atividade dextrinizante mais elevada com o farelo de mandioca em 48 horas de cultivo, enquanto que para a atividade α -amilase foi em 72 horas de cultivo, com esse mesmo substrato. A atividade α -amilase também foi bastante significativa utilizando amido de mandioca em 72 horas de cultivo (Figuras. V.2c e V.II.c).

Figura V.2 – Perfil de produção enzimática das linhagens A-1.2 e A-18, sob fermentação submersa, em diferentes fontes de carbono.

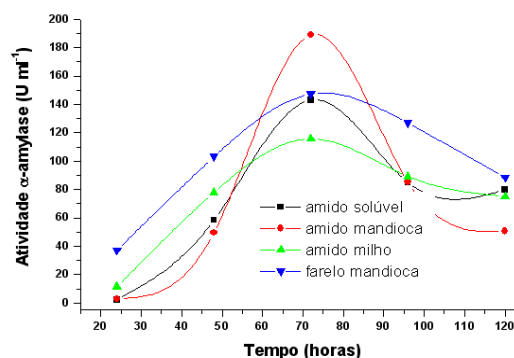
a) atividade dextrinizante da linhagem A-1.2 b) atividade α -amilase da linhagem a-1.2



c) atividade dextrinizante da linhagem A-18



d) atividade α -amilase da linhagem A-18



V.3. Efeito das fontes de carbono e perfil de produção de CGTase

A atividade enzimática de CGTase do extrato bruto enzimático de *P. campinasensis* H69-3 foi estudada sob fermentação submersa e avaliada ao longo do tempo, nos substratos selecionados: farinha de arroz comercial (Arrozina[®]), amido de milho comercial (Maizena[®]), amido de mandioca, farelo de trigo e amido solúvel.

O amido solúvel se mostrou a fonte de carbono que mais contribuiu para a produção enzimática de amilases totais, atingindo 350 U mL^{-1} de atividade amilásica e 25 U mL^{-1} de atividade CGTase. Contudo, as atividades do amido de mandioca e do amido de milho comercial (Maizena[®]) também foram bastante significativas, aproximadamente 300 U mL^{-1} e 250 U mL^{-1} , respectivamente de atividade amilásica e 20 U mL^{-1} de atividade CGTase alcançada. Exceto o farelo de

trigo, todos os substratos apresentaram um pico de produção enzimática em 72 horas de cultivo (Figura V.3).

Figura V.3– Perfil de produção enzimática de *Paenibacillus campinasensis* H69-3, sob fermentação submersa, em diferentes fontes de carbono. a) atividade dextrinizante, b) atividade CGTase.

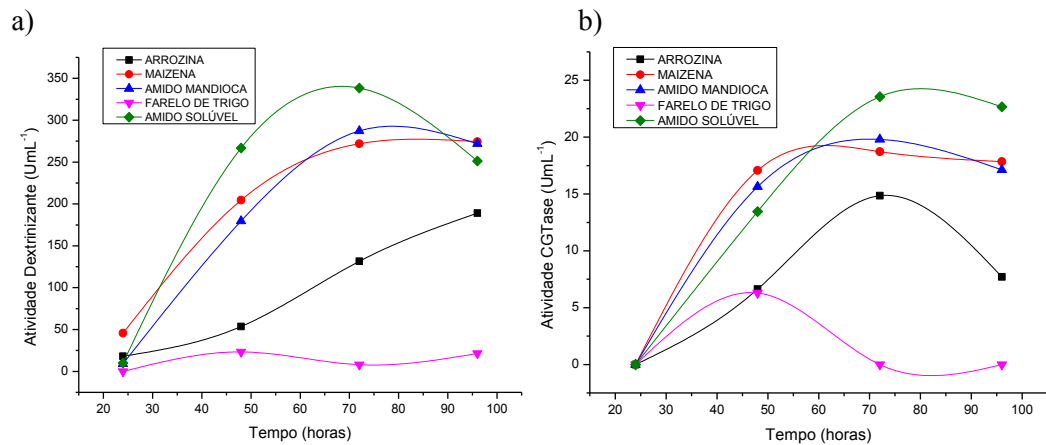
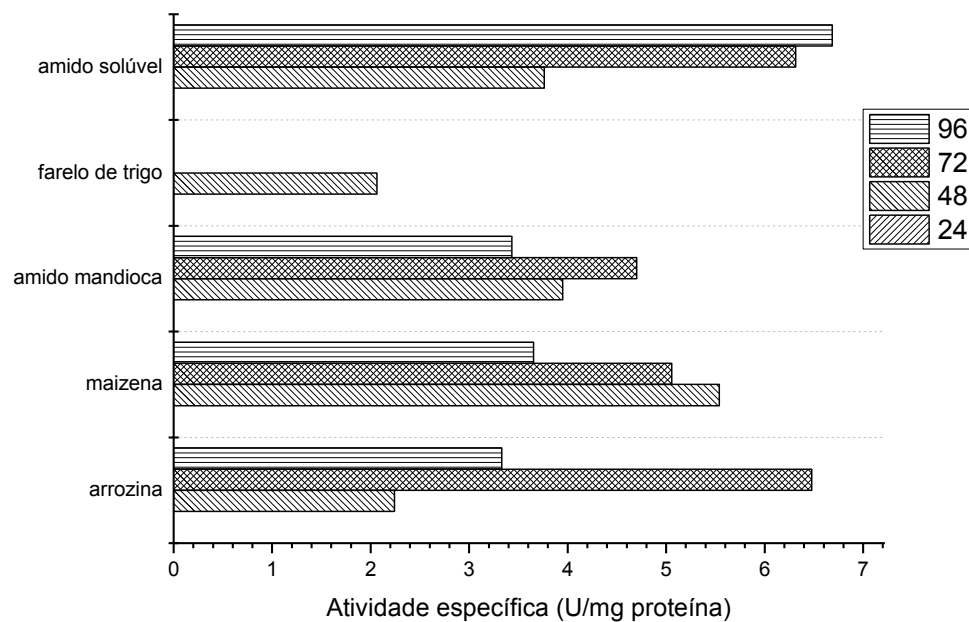


Figura V.4– Perfil de produção da atividade enzimática específica (U mg⁻¹ proteína) produzida pela linhagem *Paenibacillus campinasensis* H69-3 utilizando diferentes substratos.



Atividades específicas reativamente significantes foram alcançadas em todos os substratos fermentados, mas foram maiores em amido solúvel, Arrozina[®] e a Maizena[®], aproximadamente 7, 6, e 5 U mg⁻¹ de proteína, respectivamente (Figura V.4). Assim, pode-se observar que a variação na fonte de carbono pode alterar o nível de produção de enzimas com alta atividade e explorar a melhor condição é importante para o aproveitamento potencial da linhagem.

Alguns trabalhos reportaram a produção de diferentes tipos de amilases fúngicas termoestáveis com o intuito de viabilizar economicamente a hidrólise do amido. As atividades específicas atingidas por alguns autores foram dispostas na Tabela V.1.

Tabela V.1. Atividade específica obtidas com diferentes fontes de carbono na produção de amilases observadas na literatura.

Referência	Fonte de carbono	Atividade específica (Umg ⁻¹ proteína)
PEIXOTO et al. (2003).	Glicose	2,5
	Maltose	0,5
	Amido solúvel	26,0
	Farelo de trigo	2,2
	Bagaço de cana	3,4
MOREIRA et al. (1999).	Glicogênio	47,0
	Maltose	38,0
	Amido	42,0
	Amilose	32,0
	Amilopectina	40,0
SILVA (2009).	Milho moído	222,2
	Farinha de aveia	182,1
	Palha de arroz	114,2
	Maizena	152,6

Peixoto et al. (2003) avaliaram a produção de amilases por *R. microsporus* var. *rhizopodiformis* em fermentação submersa em várias fontes de carbono onde glicose, maltose, amido solúvel, farelo de trigo e bagaço de cana de açúcar demonstraram excelente capacidade para indução da síntese de amilase. A enzima apresentou pH e temperatura ótima de atividade 5,0 e 60°C, respectivamente.

Moreira et al. (1999) estudaram a produção e as características de α -amilase e glucoamilase de *A. tamari*. Neste trabalho foram avaliadas as melhores condições para a produção das enzimas, tais como fonte de carbono, pH inicial de meio de cultivo e temperatura, assim como também foram determinadas as características físico-químicas de cada enzima. Glicogênio, maltose, amido, amilose e amilopectina como fontes de carbono foram as que melhor induziram a síntese das enzimas. Valores de pH iniciais de meio de cultivo entre 4,0 e 10,0 foram considerados ideais tanto para crescimento quanto para produção das enzimas. E a temperatura mais adequada de crescimento e produção foi 30°C. Ambas as enzimas apresentaram atividade máxima em pH entre 4,5 e 6,0 e foram estáveis em pH entre 4,0 e 7,0. As enzimas exibiram ótima atividade em temperaturas entre 50 e 60°C e permaneceram estáveis por mais de 10 horas a 55°C.

Silva (2009) verificou que milho moído, farinha de aveia, palha de arroz e maizena foram as fontes de carbono que induziram maior a atividade amilolítica. Quando comparado ao cultivo com amido solúvel, as atividades enzimáticas foram superiores em 1,9; 1,6; 1,0 e 1,1 vezes nos cultivos com milho moído, farinha de aveia, palha de arroz e maizena, respectivamente.

Ainda de acordo com Silva (2009), seria de se esperar que milho moído, farinha de aveia e maizena fossem boas fontes indutoras, uma vez que são fontes complexas, com altos teores de íons e vitaminas, que por sua vez são importantes para o crescimento dos micro-organismos. A palha de arroz, mesmo sendo constituída de celulose e hemicelulose não são substratos específicos para a produção de amilase, mais atingiram bons índices. O farelo de trigo também apresentou excelente capacidade de indução de síntese de amilase.

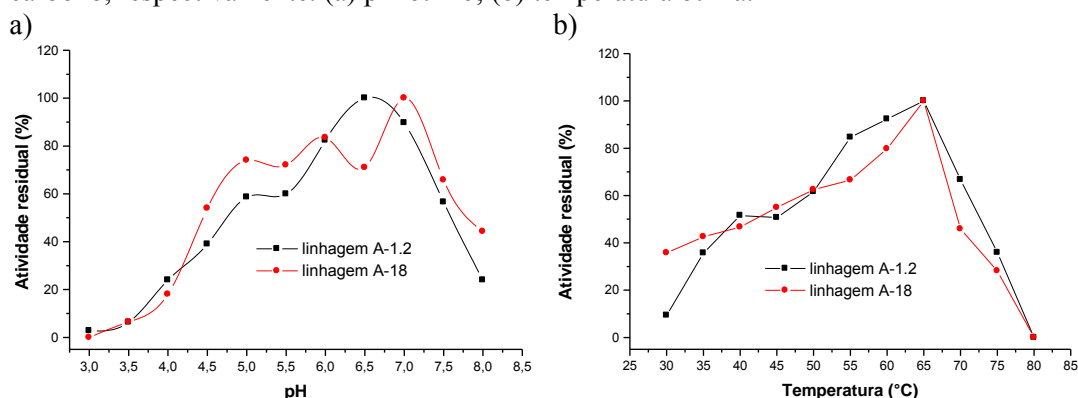
V.4. Caracterização físico - química das amilases

V.4.1. Efeito da temperatura e pH

Foi realizada a caracterização enzimática físico-química para temperatura e pH ótimos obtida com os substratos farelo de mandioca e amido de mandioca para a linhagem A-1.2 e farelo de mandioca para a linhagem A-18 com relação ao rendimento para as atividades enzimáticas, assim como o efeito da temperatura na

ação enzimática. A Figura V.5 aponta as atividades dextrinizante e para açúcar redutor obtidas.

Figura V.5 Caracterização físico-química da α -amilase produzida pelas linhagens A-1.2 (—■—) e A-18 (—●—) utilizando farelo de mandioca e amido de mandioca, como fontes de carbono, respectivamente. (a) pH ótimo; (b) temperatura ótima.

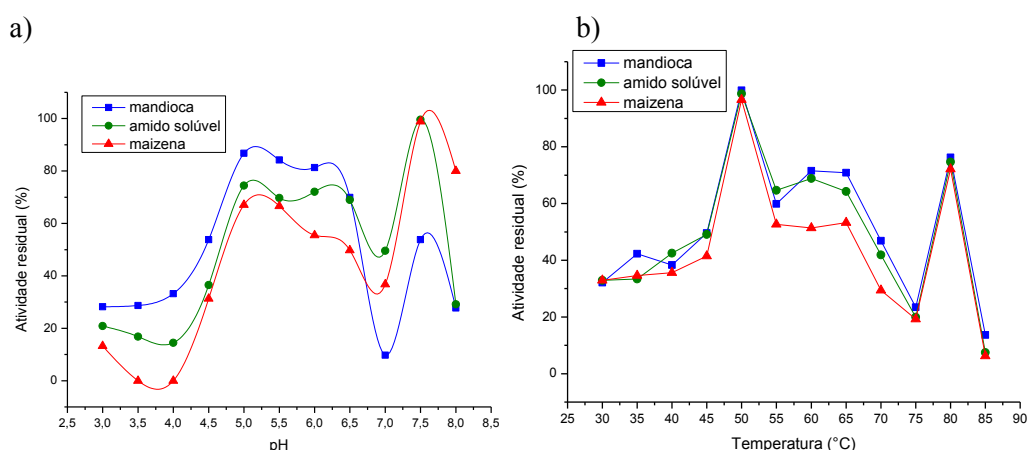


A α -amilase produzida pela bactéria A-18 apresentou pH ótimo em pH 7,0 e temperatura ótima a 65 °C, enquanto, a α -amilase produzida pela bactéria A-1.2 apresentou pH ótimo em pH 6,5 e a temperatura ótima foi a 65 °C. Dessa forma, a amilase produzida por esses micro-organismos tem potencial de aplicação nos processos de hidrólise do amido, como a sacarificação e liquefação, que necessitem de pH próximo à neutralidade e temperatura relativamente alta. A temperatura ótima observada em todos os diferentes substratos que proporcionou boa atividade foi de 55°C a 65°C, declinando os níveis de atividade em 70°C (Figura V.5).

Na caracterização da atividade enzimática bruta quanto pH ótimo e à temperatura ótima, a CGTase produzida pela bactéria *P. campinasensis* H69-3 apresentou as um intervalo de pH ótimo de 5 a 6,5 e um pico no pH 7,5. Conforme proposto por MAKELA (1988), o pH do tampão de reação deveria ser 5,5, o que induz as bons índices de atividade enzimática, entretanto, o pH 7,5 superou esses índices nas fonte amido solúvel e maisena. A temperatura de 80°C não desnaturou a enzima que obteve altos índices de atividade. Dessa forma, o mix enzimático compostos por diversas amilases produzidas por esse micro-organismo tem potencial de aplicação nos processos de hidrólise do amido, que

necessitem de pH próximo à neutralidade e temperatura relativamente alta (Figura V.6).

Figura V.6. Caracterização físico-química da CGTase produzida pela linhagem *Paenibacillus campinasensis* H69-3 utilizando diferentes substratos: Amido de mandioca (—■—), amido solúvel(—●—) e Maizena (—▲—). (a) pH ótimo; (b) temperatura ótima.



Soni et al. (2003) verificaram sob fermentação em estado sólido utilizando como fonte de carbono o amido de trigo as características físico-químicas de amilases produzidas por micro-organismos. Os resultados indicaram que o efeito da temperatura ótima de sacarificação foi de 50°C para glucoamilase produzida por *Aspergillus* sp. O pH ótimo da α -amilase produzida por *Rhizmucor pusillus* foi 4,5 e a estabilidade foi em pH 3,0 e 4,0 (SILVA et al., 2005), enquanto a α -amilase produzida por *Cryptococcus flavus* apresentou pH ótimo de 5,5 (WANDERLEY et al., 2004), Outros autores relatam o pH ótimo em 6,0 (TAYLOR et al., 1978; CARLSEN et al.,1996; MOREIRA et al., 1999), semelhante a faixa obtida neste estudo. Outras α -amilases apresentaram pH ótimo entre 4,0 e 6,5 com estabilidade entre os pH 5,0–9,0 (NAJAFI et al., 2005; NAJAFI; KEMHAVI, 2005; MITIDIERI et al., 2006).

A α -amilase obtida de *Thermomyces lanuginosus* TO-03 ambos os processos fermentativos realizados por Gonçalves (2006), FSm e FES com amido solúvel comercial, apresentou uma atividade ótima em pH 5,5 e estável em uma ampla faixa de pH, sendo que a estabilidade máxima foi obtida na faixa de 4,0 a 7,0 para

a α -amilase. A temperatura ótima de atividade da α -amilase obtida por FSm e FES foi de 60°C. A α -amilase, obtida por ambos os processos fermentativos, apresentou-se 100% estável a 50°C e perdeu 10% de sua atividade residual a 60°C. O autor mostra ainda que a α -amilase estudada pode ser considerada termoestável, uma vez que as temperaturas ótimas apresentadas são mais elevadas do que aquelas mostradas por amilases produzidas pelas linhagens mesofílicas (entre 50 e 60°C). Grande parte dos processos industriais ocorre em temperaturas elevadas e, portanto, o uso de enzimas termoestáveis é de grande interesse para aplicação industrial.

O gene que codifica uma α -amilase extracelular de *Bacillus subtilis* DR8806 foi clonado e expresso em *Escherichia coli* BL21 com o vetor pET28a (+) (DE3). A enzima recombinante com massa molecular de 76 kDa apresentou uma atividade ótima a pH 5,0 e 70 °C com alta estabilidade em amplas faixas de pH e temperatura de 4,0-9,0 e 45-75 °C. A enzima apresentou uma semi-vida de 125 minutos a 70 °C.

Por se tratar de um extrato enzimático bruto, a presença destas amilases e outras enzimas devem ser consideradas (GONÇALVES, 2006). Portanto, de acordo com os resultados obtidos, as linhagens isoladas de solos agrícolas podem ter sintetizado um mix de isoformas de amilases. As isoformas de enzimas são diferentes formas de uma proteína, mas que podem diferir em suas propriedades catalíticas, ou seja, no pH e temperatura ótimos de atuação, no tempo de síntese (perfil de produção) (KUJUR; PATEL, 2014). Portanto, esses resultados indicam uma soma de atividades de enzimas hidrolíticas diferentes ou de isoformas de uma mesma enzima essas isoformas poderão ser identificadas e detectadas por espectrometria de massa, que se baseia em uma tecnologia de determinação precisa da massa molar de proteínas. Além da checagem da pureza de proteínas e peptídeos, quando a análise espectrofotométrica indica dois picos ou mais, significa a presença de isoformas ou contaminantes.

V.5. Otimização da composição do meio de produção

V.5.1. Planejamento fatorial 2^{6-1} com três ensaios no ponto central

Os estudos de otimização das condições do meio de cultivo foram realizados para a linhagem A-1.2 e os resultados das análises do planejamento fatorial 2^{6-1} com três ensaios no ponto central estão apresentados na Tabela V.2 a V.8 e Figuras de V.7 a V.10. Cada um dos ensaios do planejamento fatorial foi executado em triplicata e dessa forma, consideraram-se as médias dos resultados obtidos dessas repetições. Nesta etapa, foi adotado como fonte de carbono o amido solúvel comercial, por ser o mais difundido na literatura possibilitando assim um estudo comparativo futuro de fontes alternativas de carbono.

Os resultados observados estão apresentados na Tabela V.2. É possível observar que os ensaios com os meios com maior concentração da fonte de carbono resultaram em maior atividade das enzimas produzidas (ensaios 5, 3, 1 e 9) para ambas as atividades amilásicas. No entanto, os demais ensaios, tanto com as concentrações „máximas“ como as „mínimas“ em nutrientes, apresentaram baixa atividade amilolítica, quando comparada aos ensaios acima. Isso pode indicar que não são todos os nutrientes até aqui estudados que possuem significância na atividade enzimática e alguns dos constituintes podem reprimir a ação da enzima. A atividade da α -amilase da enzima recombinante clonada de *Bacillus subtilis* DR8806 em *E. coli* por Emtenani et al. (2015) foi inibida na presença dos íons Zn^{2+} , Pb^{2+} , Hg^{2+} .

As análises dos efeitos e dos coeficientes de regressão foram realizadas para os fator principal a interação entre dois fatores, com base na atividade enzimática medida pelo método Somogyi-Nelson (Tabelas V.2 e V.3). Para decidir os efeitos foi empregado o teste t “Student” ao nível de significância de 5% ($p < 0,05$). No nível de 95% de confiança, o valor de t encontrado, para treze graus de liberdade, foi de 2,16. Foi considerado estatisticamente significativo o efeito cujo valor absoluto excedeu o valor do t tabelado ($t_{13, 0,95} = 2,16$). Todos os efeitos dos fatores principais amido solúvel, extrato de levedura e $MgSO_4$, e os efeitos das interações amido solúvel vs extrato de levedura e amido solúvel vs $MgSO_4$, foram significantes (Tabela V.3).

Tabela V.2 - Produção de amilase das fermentações, referente ao planejamento fatorial 2^{6-1} com três ensaios no ponto central.

	Fatores codificados						Fatores não codificados (%)						Atividade Dextrinizante(UmL ⁻¹)	Atividade α -amilase (UmL ⁻¹)
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	Amido Solúvel	Extrato de Levedura	Peptona	K ₂ HPO ₄	MgSO ₄	(NH ₄) ₂ SO ₄		
1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	2,00	0,50	0,50	0,50	0,05	0,15	136,94	300,32
2	+1	+1	+1	+1	-1	-1	2,00	0,50	0,50	0,50	0,00	0,05	54,89	98,47
3	+1	+1	+1	-1	+1	-1	2,00	0,50	0,50	0,10	0,05	0,05	147,54	357,53
4	+1	+1	+1	-1	-1	+1	2,00	0,50	0,50	0,10	0,00	0,15	37,5	110,56
5	+1	+1	-1	+1	+1	-1	2,00	0,50	0,10	0,50	0,05	0,05	163,14	409,16
6	+1	+1	-1	+1	-1	+1	2,00	0,50	0,10	0,50	0,00	0,15	45,14	108,82
7	+1	+1	-1	-1	+1	+1	2,00	0,50	0,10	0,10	0,05	0,15	91,3	163,58
8	+1	+1	-1	-1	-1	-1	2,00	0,50	0,10	0,10	0,00	0,05	45,65	64,98
9	+1	-1	+1	+1	+1	-1	2,00	0,10	0,50	0,50	0,05	0,05	87,35	213,35
10	+1	-1	+1	+1	-1	+1	2,00	0,10	0,50	0,50	0,00	0,15	42,86	102,65
11	+1	-1	+1	-1	+1	+1	2,00	0,10	0,50	0,10	0,05	0,15	93,16	102,49
12	+1	-1	+1	-1	-1	-1	2,00	0,10	0,50	0,10	0,00	0,05	38,89	75,67
13	+1	-1	-1	+1	+1	+1	2,00	0,10	0,10	0,50	0,05	0,15	38,16	163,19
14	+1	-1	-1	+1	-1	-1	2,00	0,10	0,10	0,50	0,00	0,05	47,18	79,23
15	+1	-1	-1	-1	+1	-1	2,00	0,10	0,10	0,10	0,05	0,05	35,52	96,67
16	+1	-1	-1	-1	-1	+1	2,00	0,10	0,10	0,10	0,00	0,15	24,35	94,28
17	-1	+1	+1	+1	+1	-1	0,50	0,50	0,50	0,50	0,05	0,05	33,45	36,91
18	-1	+1	+1	+1	-1	+1	0,50	0,50	0,50	0,50	0,00	0,15	32,98	63,42
19	-1	+1	+1	-1	+1	+1	0,50	0,50	0,50	0,10	0,05	0,15	34,57	83,65
20	-1	+1	+1	-1	-1	-1	0,50	0,50	0,50	0,10	0,00	0,05	23,49	54,8
21	-1	+1	-1	+1	+1	+	0,50	0,50	0,10	0,50	0,05	0,15	37,11	73,19
22	-1	+1	-1	+1	-1	-1	0,50	0,50	0,10	0,50	0,00	0,05	27,24	73,19
23	-1	+1	-1	-1	+1	-1	0,50	0,50	0,10	0,10	0,05	0,05	33,08	67,14
24	-1	+1	-1	-1	-1	+1	0,50	0,50	0,10	0,10	0,00	0,10	29,92	75,98
25	-1	-1	+1	+1	+1	+1	0,50	0,10	0,50	0,50	0,05	0,15	35,49	83,19
26	-1	-1	+1	+1	-1	-1	0,50	0,10	0,50	0,50	0,00	0,05	35,58	71,33
27	-1	-1	+1	-1	+1	-1	0,50	0,10	0,50	0,10	0,05	0,05	32,84	50,4
28	-1	-1	+1	-1	-1	+1	0,50	0,10	0,50	0,10	0,00	0,15	18,02	54,81
29	-1	-1	-1	+1	+1	-1	0,50	0,10	0,10	0,50	0,05	0,05	26,92	62,72
30	-1	-1	-1	+1	-1	+1	0,50	0,10	0,10	0,50	0,00	0,15	35,35	28,77
31	-1	-1	-1	-1	+1	+1	0,50	0,10	0,10	0,10	0,05	0,15	28,17	65,74
32	-1	-1	-1	-1	-1	-1	0,50	0,10	0,10	0,10	0,00	0,05	27,62	29,23
33	0	0	0	0	0	0	1,25	0,30	0,30	0,30	0,025	0,10	52,36	86,21
34	0	0	0	0	0	0	1,25	0,30	0,30	0,30	0,025	0,10	53,47	84,35
35	0	0	0	0	0	0	1,25	0,30	0,30	0,30	0,025	0,10	52,78	67,37

Tabela V.3 - Estimativa de efeitos e análise de regressão calculada para o planejamento fatorial 2^{6-1} com três pontos centrais.

	Efeito	Erro padrão.	t₍₁₃₎	p	Intervalo confiança -95,%	Intervalo confiança 95,%	Coefficiente regressão	Erro padrão do coeficiente	Intervalo confiança -95,%	Intervalo confiança 95,%
Fatores/Interações	107,24	9,27	11,57	*0,00	87,21	127,27	107,24	9,27	87,21	127,27
(X ₁)Amido solúvel*	97,90	19,39	19,39	*0,00	56,01	139,80	48,95	9,70	28,01	69,90
(X ₂)Extrato*	48,00	19,39	2,47	*0,03	6,11	89,89	24,00	9,70	3,05	44,95
(X ₃)Peptona	12,73	19,39	0,66	0,52	-29,16	54,62	6,37	9,70	-14,58	27,31
(X ₄)K ₂ HPO ₄	26,27	19,39	1,35	0,20	-15,62	68,17	13,14	9,70	-7,81	34,08
(X ₅)MgSO ₄ *	71,44	19,39	3,68	*0,00	29,55	113,33	35,72	9,70	14,77	56,67
(X ₆)(NH ₄) ₂ SO ₄	-10,38	19,39	-0,53	0,60	-52,28	31,51	-5,19	9,70	-26,14	15,75
X ₁ / X ₂ *	37,74	19,39	1,95	*0,07	-4,15	79,63	18,87	9,70	-2,08	39,81
X ₁ / X ₃	9,91	19,39	0,51	0,62	-31,98	51,80	4,96	9,70	-15,99	25,90
X ₁ / X ₄	24,90	19,39	1,28	0,22	-16,99	66,80	12,45	9,70	-8,49	33,40
X ₁ / X ₅ *	62,51	19,39	3,22	*0,01	20,62	104,41	31,26	9,70	10,31	52,20
X ₁ / X ₆	-20,76	19,39	-1,07	0,30	-62,65	21,13	-10,38	9,70	-31,33	10,56
X ₂ / X ₃	-4,03	19,39	-0,21	0,84	-45,92	37,86	-2,01	9,70	-22,96	18,93
X ₂ / X ₄	-3,12	19,39	-0,16	0,87	-45,01	38,77	-1,56	9,70	-22,50	19,39
X ₂ / X ₅	33,72	19,39	1,74	0,10	-8,17	75,61	16,86	9,70	-4,09	37,80
X ₂ / X ₆	-12,45	19,39	-0,64	0,53	-54,34	29,44	-6,22	9,70	-27,17	14,72
X ₃ / X ₄	-16,31	19,39	-0,84	0,41	-58,20	25,58	-8,15	9,70	-29,10	12,79
X ₃ / X ₅	3,08	19,39	0,16	0,88	-38,82	44,97	1,54	9,70	-19,41	22,48
X ₃ / X ₆	3,21	19,39	0,16	0,87	-38,68	45,10	1,61	9,70	-19,34	22,55
X ₄ / X ₅	18,08	19,39	0,93	0,37	-23,81	59,97	9,04	9,70	-11,91	29,99
X ₄ / X ₆	-4,72	19,39	-0,24	0,81	-46,61	37,17	-2,36	9,70	-23,30	18,59
X ₅ / X ₆	-21,93	19,39	-1,13	0,28	-63,82	19,96	-10,97	9,70	-31,91	9,98

*variáveis significantes; t₍₁₃₎ = teste t "Student"; p = grau de significância

O gráfico de Pareto (Fig. V.7) apresenta os valores de t , em ordem decrescente, para cada um dos efeitos analisados e confirma os resultados apresentados na Tabela V.3.

Os mesmos critérios foram adotados para verificar a significância dos efeitos dos fatores, para a análise de regressão. Aplicando-se os valores dos coeficientes estimados, obteve-se o seguinte modelo linear:

$$y = 107,24 + 48,95X_1 + 23,99X_2 + 6,36X_3 + 13,14X_4 + 35,72X_5 - 5,19X_6 + 18,86X_1X_2 + 31,26X_1X_3$$

Onde:

- y : produção estimada de α -amilase;
- X_1 : fator codificado para amido solúvel;
- X_2 : fator codificado para extrato de levedura;
- X_3 : fator codificado para peptona;
- X_4 : fator codificado para K_2HPO_4 ;
- X_5 : fator codificado para $MgSO_4 \cdot 7H_2O$;
- X_6 : fator codificado para $(NH_4)_2SO_4$;

Os gráficos de contorno indicam o direcionamento desse fatorial ao aumento nas concentrações de amido solúvel, extrato de levedura e $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, o qual foi significativo, com efeito positivo.

A Tabela V.4 apresenta os resultados da análise de variância para o modelo linear ajustado. A regressão, ajustada pelo modelo, foi considerada estatisticamente significativa por apresentar o valor de F igual a 2,45, maior que o valor tabelado de F , para 95% de confiança $F_{0,95;6;28} = 2,45$, podendo afirmar que a quantidade de variação devida ao modelo foi maior que a variação não explicada.

Figura V.7– Efeitos principais e de interações dos fatores estudados no planejamento fatorial 2^{6-1} com três ensaios no ponto central, baseado no teste t “student” $t_{(13; 0,95)} = 2,16$.

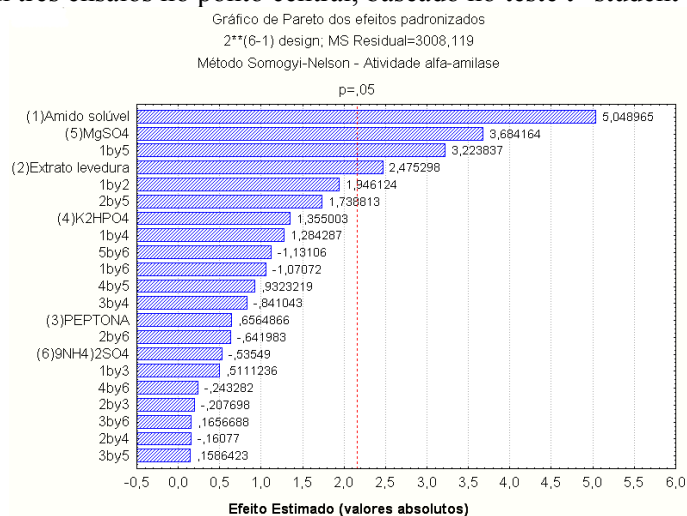


Tabela V.4 - Análise de variância, para o ajuste do modelo linear aos resultados do planejamento fatorial 2^{6-1} com três ensaios no ponto central.

Fontes de variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Valor de F
(X ₁)Amido solúvel*	76683,1	1	76683,11	25,49*
(X ₂)Extrato levedura*	18431,0	1	18431,04	6,13*
(X ₃)Peptona	1296,4	1	1296,42	0,43
(X ₄)K ₂ HPO ₄	5523,0	1	5523,01	1,84
(X ₅)MgSO ₄ ·7H ₂ O*	40829,4	1	40829,39	13,57*
(X ₆)(NH ₄) ₂ SO ₄	862,6	1	862,58	0,29
X ₁ / X ₂ *	11393,0	1	11392,95	3,79*
X ₁ / X ₃	785,9	1	785,86	0,26
X ₁ / X ₄	4961,6	1	4961,57	1,65
X ₁ / X ₅ *	31263,8	1	31263,75	10,39*
X ₁ / X ₆	3448,7	1	3448,65	1,15
X ₂ / X ₃	129,8	1	129,77	0,04
X ₂ / X ₄	77,8	1	77,75	0,02
X ₂ / X ₅ *	9095,0	1	9094,96	3,02*
X ₂ / X ₆	1239,8	1	1239,77	0,41
X ₃ / X ₄	2127,8	1	2127,80	0,71
X ₃ / X ₅	75,7	1	75,71	0,02
X ₃ / X ₆	82,6	1	82,56	0,03
X ₄ / X ₅	2614,7	1	2614,73	0,87
X ₄ / X ₆	178,0	1	178,04	0,06
X ₅ / X ₆	3848,3	1	3848,28	1,28
Erro	39105,5	13	3008,12	
Total	254053,2	34		

Coefficiente de determinação = 0,8461; Valor de F tabelado ($F_{0,95;6;28}$) = 2,45.

Conforme os dados experimentais obtidos na Tabela V.4, os fatores principais significantes foram amido solúvel (X₁), extrato de levedura (X₂) e MgSO₄·7H₂O (X₅), e as interações X₁/X₂, X₁/X₅ e X₂/X₅.

V.5.2. Deslocamento em direção à máxima inclinação ascendente “steepest ascent”

O deslocamento ocorre sempre ao longo do caminho de máxima inclinação de um determinado modelo, que é a trajetória na qual a resposta varia de forma mais pronunciada. O modelo linear, ajustado pelos resultados do planejamento fatorial 2^{6-1} com três ensaios no ponto central foi satisfatório. Como a região ótima de produção da enzima não foi alcançada, foi realizado um deslocamento na direção de máxima inclinação ascendente para estabelecer uma nova região de estudo e

um novo ponto central. Em termos algébricos, a trajetória de máxima inclinação ascendente (“steepest ascent”) pode ser determinada a partir dos coeficientes de regressão do modelo ajustado, partindo-se do ponto central. Em função das concentrações de peptona, K_2HPO_4 e $(NH_4)_2SO_4$, na fase anterior, serem as variáveis de menor influência nas respostas estudadas, manteve-se os seus valores respectivos aos pontos centrais do primeiro fatorial.

Os fatores estudados foram representados por X_1 (amido solúvel), X_2 (extrato de levedura), X_5 ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) e seus valores originais, para os pontos de máxima inclinação ascendente, foram determinados segundo as equações abaixo:

$$X_1 = (\text{amido solúvel} - 1,25) \div 0,75$$

$$X_2 = (\text{extrato de levedura} - 0,3) \div 0,2$$

$$X_5 = (MgSO_4 \cdot 7H_2O - 0,025) \div 0,025$$

Aplicando-se os valores codificados às equações acima, foram obtidos os valores originais para cada um dos fatores, os quais estão dispostos na Tabela V.5 junto com os valores para a atividade enzimática nesta fase. Foram realizados 5 ensaios na direção de máxima inclinação ascendente. Os valores mais altos alcançados foram nos ensaios 36, 37 e 38, cujo valor médio foi de $70,76 \text{ UmL}^{-1}$ e $124,9 \text{ UmL}^{-1}$ para as atividades dextrinizantes e α -amilase respectivamente. A partir desses dados passou-se a utilizar o ensaio 36 como ponto central, junto ao planejamento fatorial composto 2^3 , com pontos axiais.

V.5.3. Planejamento fatorial composto 2^3 completo com pontos axiais

Com base nas concentrações do experimento anterior, foi realizado um planejamento fatorial composto 2^3 completo, incluindo 6 pontos axiais e 3 repetições no ponto central, totalizando 17 ensaios. A Tabela V.6 representa os valores utilizados no planejamento e os resultados obtidos da atividade enzimática.

Nota-se que os ensaios, com os meios que utilizaram os pontos centrais para as três variáveis apresentaram uma maior atividade α -amilase e dextrinizante (ensaios 56 e 57). Quando foi utilizado as concentrações mínimas de amido solúvel e $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ e o extrato de levedura em sua concentração máxima (ensaio 43) também obtiveram altas atividades (Tabela V.6). Quando se utilizaram

os pontos centrais de amido solúvel e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e o ponto axial de extrato de levedura (ensaio 52), também houve aumento das atividades, porém, visando uma diminuição da quantidade de reagentes este ensaio não foi considerado. A Figura V.8 mostra que a faixa ótima de amido solúvel e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ se encontra nos pontos centrais.

Tabela V.5 - Matriz com os pontos em direção a máxima inclinação ascendente “steepest ascent”.

Ensaio Nº	Fatores codificados			Fatores não codificados			Atividade Dextrinizante (U mL^{-1})	Atividade α -amilase (U mL^{-1})
	X ₁	X ₂	X ₅	Amido Solúvel (%)	Extrato Levedura (%)	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (%)		
36	2,04	1,00	1,49	2,78	0,50	0,06	82,44	133,82
37	3,06	1,50	2,24	3,55	0,60	0,80	61,15	132,89
38	4,08	2,00	2,98	4,31	0,70	0,10	68,69	108,00
39	5,10	2,50	3,73	5,08	0,80	0,12	53,47	64,05
40	6,12	3,00	4,47	5,84	0,90	0,14	45,24	58,24

Tabela V.6. Produção de amilase das fermentações, referente ao planejamento fatorial 2^3 com seis pontos axiais e com três ensaios no ponto central.

Nº	Ensaio						Atividade Dextrinizante (U mL^{-1})	Atividade α -amilase (U mL^{-1})
	Fatores codificados			Fatores não codificados(%)				
	X ₁	X ₂	X ₅	Amido Solúvel	Extrato de Levedura	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$		
41	-1	-1	-1	2,01	0,40	0,04	132,53	2133
42	-1	-1	+1	2,01	0,40	0,08	189,36	2020
43*	-1	+1	-1	2,01	0,60	0,04	209,03	3607
44	-1	+1	+1	2,01	0,60	0,08	191,19	2752
45	+1	-1	-1	3,55	0,40	0,04	185,45	1537
46	+1	-1	+1	3,55	0,40	0,08	169,62	2718
47	+1	+1	-1	3,55	0,60	0,04	216,76	2770
48	+1	+1	+1	3,55	0,60	0,08	183,65	2035
49	$-\alpha$	0	0	1,65	0,50	0,06	155,37	1967
50	$+\alpha$	0	0	3,91	0,50	0,06	128,12	2970
51	0	$-\alpha$	0	2,78	0,35	0,06	210,53	1493
52*	0	$+\alpha$	0	2,78	0,65	0,06	208,33	3318
53	0	0	$-\alpha$	2,78	0,50	0,031	197,65	2980
54	0	0	$+\alpha$	2,78	0,50	0,089	192,98	3112
55	0	0	0	2,78	0,50	0,06	220,45	2798
56*	0	0	0	2,78	0,50	0,06	216,95	3872
57*	0	0	0	2,78	0,50	0,06	218,18	3730

Tabela V.7 - Estimativa de efeitos e análise de regressão calculados para o planejamento fatorial composto 2^3 completo, com pontos axiais e centrais.

	Efeito	Erro padrão	$t_{(7)}$	p	Intervalo confiança -95, %	Intervalo confiança 95, %	Coefficiente regressão	Erro padrão do coeficiente	Intervalo confiança -95, %	Intervalo confiança 95, %
Fatores/Interações	3366,22	283,10	11,89	0,00	2696,79	4035,64	3366,22	283,10	2696,79	4035,64
(X ₁)Amido solúvel (L)	-16,26	319,45	-0,05	0,96	-771,63	739,11	-8,13	159,72	-385,82	369,56
(X ₁ ²)Amido solúvel (Q)	-839,81	421,30	-1,99	0,09	-1836,03	156,41	-419,91	210,65	-918,01	78,20
(X ₂)Extrato levedura(L)*	896,158	319,45	2,81	0,03	140,79	1651,53	448,08	159,72	70,39	825,77
(X ₂ ²)Extrato levedura(Q)	-908,63	421,30	-2,16	0,07	-1904,84	87,59	-454,31	210,65	-952,42	43,80
(X ₃)MgSO ₄ (L)	-58,89	319,45	-0,18	0,86	-814,26	696,48	-29,45	159,72	-407,13	348,24
(X ₃ ²)MgSO ₄ .7H ₂ O (Q)	-208,99	421,30	-0,50	0,64	-1205,21	787,23	-104,50	210,65	-602,60	393,61
X ₁ / X ₂	-414,00	385,69	-1,07	0,32	-1326,01	498,01	-207,00	192,85	-663,01	249,01
X ₁ / X ₃	353,50	385,69	0,92	0,39	-558,51	1265,51	176,75	192,85	-279,26	632,76
X ₂ / X ₃	-664,50	385,69	-1,72	0,13	-1576,51	247,51	-332,25	192,85	-788,26	123,76

*Variáveis significantes; $t_{(7)}$: teste t "Student" = 2,37; p: grau de significância.

Tabela V.8. Análise de variância, para o ajuste do modelo quadrático aos resultados do planejamento fatorial composto 2^3 completo com pontos axiais e centrais.

Fontes de variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Valor de F
(X ₁)Amido Solúvel (L)	771,0	1	771,0	0,002
(X ₁ ²)Amido Solúvel (Q)	1182184,0	1	1182184,0	3,97
(X ₂)Extrato (L)	2341418,0	1	2341418,0	7,87
(X ₂ ²)Extrato (Q)	1383866,0	1	1383866,0	4,65
(X ₃)MgSO ₄ (L)	10111,0	1	10111,0	0,03
(X ₃ ²)MgSO ₄ .7H ₂ O (Q)	73211,0	1	73211,0	0,25
X ₁ / X ₂	342792,0	1	342792,0	1,15
X ₁ / X ₃	249924,0	1	249924,0	0,84
X ₂ / X ₃	883121,0	1	883121,0	2,97
Error	2082601,0	7	297514,0	
Total SS	8549998,0	16		

L: linear; Q: quadrático, Coeficiente de determinação = 0,7564; Valor de F tabelado ($F_{0,95;6;10}$) = 3,22.

No nível de 95% de confiança, o fator linear de extrato levedura gerou alto efeito significativo, e o fator quadrático de extrato de levedura, os fatores amido solúvel linear e quadrático e extrato de levedura linear e quadrático apresentaram alto efeito negativo. Ou seja, o fator estatisticamente significativo na atividade da enzima foi o extrato de levedura. A interação dos fatores, amido solúvel e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, mantendo os demais componentes no ponto central apresentou um efeito foi positivo (Tabela V.7).

A regressão, ajustada pelo modelo quadrático, foi considerada estatisticamente significativa por apresentar o valor de F tabelado, para 95% de confiança, $F_{0,95;6;10} = 3,22$, pode-se afirmar que a quantidade de variação devida ao modelo foi maior que a variação não explicada (Tabela V.8).

O modelo quadrático ajustado, apresentado abaixo, explica 75,65% das variações das respostas encontradas. Conforme o apresentado por Barros Neto et al. (1996), esse valor é alto indicando que o modelo de regressão ajustado explica bem os dados experimentais obtidos.

$$\hat{y} = 3366,22 - 8,13X_1 - 419,91X_1^2 + 448,08X_2 - 454,31X_2^2 - 29,45X_5 - 104,50 X_5^2 - 207,00 X_1X_2 + 176,75 X_1X_5 - 332,25 X_2X_5$$

Onde: \hat{y} : produção estimada de α -amilase;

X_1 : fator codificado para amido solúvel;

X_2 : fator codificado para extrato de levedura;

X_5 : fator codificado para $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$;

A superfície de resposta gerada pelo modelo ajustado, confirma que a faixa ótima de amido solúvel e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ se encontra nos pontos centrais (Figura V.8).

Quando foi plotado a interação amido solúvel e extrato de levedura foi possível verificar, por meio da superfície de resposta que para extrato de levedura, a faixa ótima está um pouco acima do seu ponto central enquanto para o amido solúvel permanece no ponto central (Figura V.9).

Figura V.8 - Superfície de resposta, demonstrando a interação entre amido solúvel e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ para o planejamento fatorial 2^3 com 6 pontos axiais e 3 ensaios no ponto central.

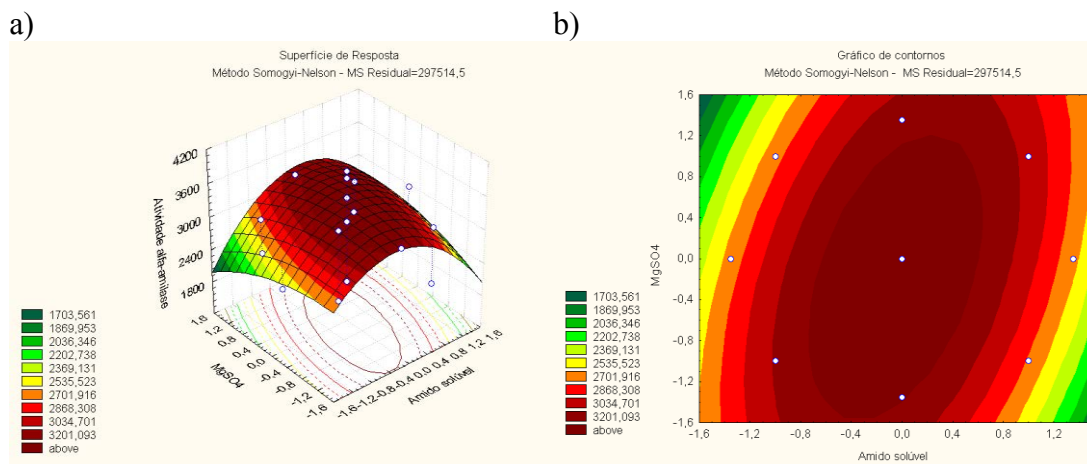
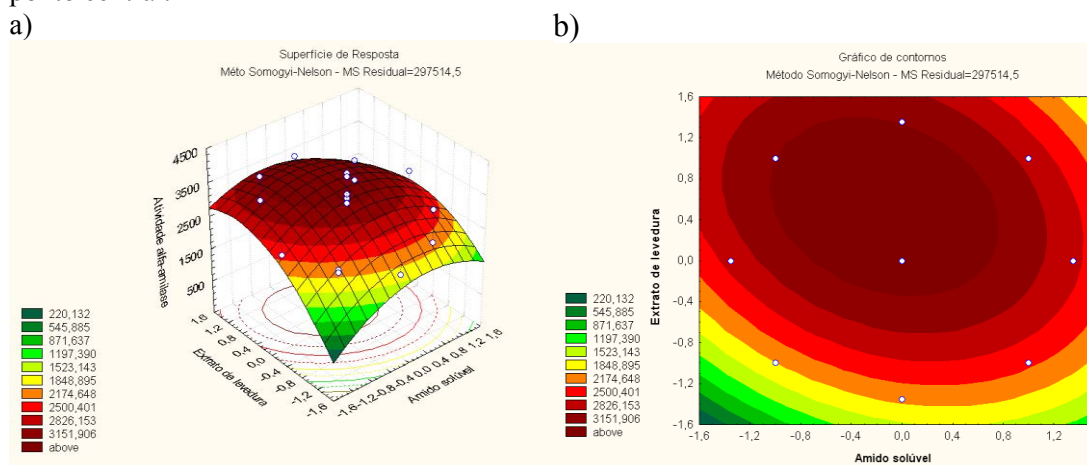
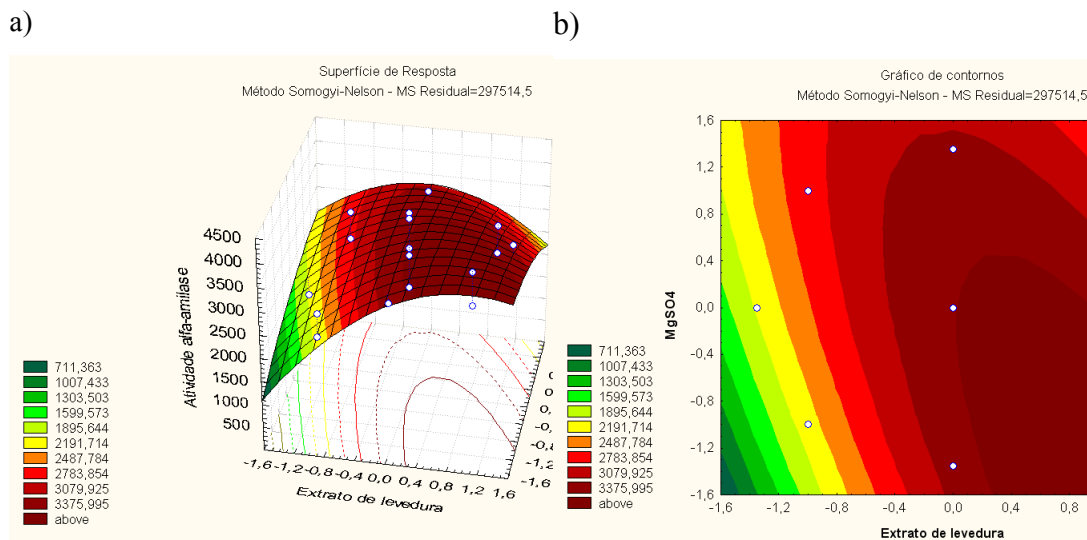


Figura V.9 - Superfície de resposta, demonstrando a interação entre amido solúvel e extrato de levedura para o planejamento fatorial 2^3 com 6 pontos axiais e 3 ensaios no ponto central.



A superfície de resposta gerada com a interação de extrato de levedura e MgSO_4 mostra que a faixa ótima para extrato de levedura se encontra deslocado para os pontos de máximo, enquanto para a concentração de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ está deslocada para os pontos de mínimo (Figura V.10).

Figura V.10 - Superfície de resposta, demonstrando a interação entre extrato de levedura e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ para o planejamento fatorial 2^3 com 6 pontos axiais e 3 ensaios no ponto central.



V.5.4. Confirmação experimental das condições otimizadas

Foram realizados ensaios em duplicata com o meio de cultivo nas concentrações otimizado (2,78% amido solúvel, 0,50% extrato de levedura, 0,30% peptona, 0,30% K_2HPO_4 , 0,06% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,05% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) e nas concentrações originais (1,00% amido solúvel, 0,20% extrato de levedura, 0,20% peptona, 0,20% K_2HPO_4 , 0,02% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,14% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) antes do processo de otimização. Os resultados demonstram uma melhora na produção de α -amilase de 3 vezes em relação a produção inicial, pelo método Somogyi-Nelson e de 1,5 vezes pelo método Dextrinizante. Os valores médios de atividade amilase foram de $575,15 \text{ UmL}^{-1}$ para o meio otimizado e de $196,0 \text{ UmL}^{-1}$ para a condição não otimizada. Tal valor foi inferior ao predito pela equação ajustada $3366,0 \text{ UmL}^{-1}$.

Ensaio futuros serão realizados, uma vez que pode ter ocorrido algum problema durante o processo fermentativo o qual não reproduziu os níveis de atividade anteriormente observados. Estudos da produção de α -amilase microbiana por fermentação em estado sólido e submersa realizados com atividades experimentais incluindo otimização do meio de cultivo e análises Plackett-Burman e superfície de resposta dos resultados estão listados na Tabela V.9.

Tabela V.9- Estudos de produção de α -amilase microbiana por fermentação em estado sólido (SSF) e submersa (SbF) realizados com atividades experimentais.

Ferm	Micro-organismo	Condições otimizadas	Atividade	Autores
	<i>Aspergillus oryzae</i>	Farelo de soja foi o melhor substituto para o extrato de levedura em comparação com os resíduos de pó de peixe e resíduos de glúten	22118,34 U g^{-1}	Sahnoun et al. (2015) [26]
	<i>Microbacterium foliorum</i> GA2	40% bagaço e 0.003 M lactose	6610 UmL $^{-1}$	Roohi e Kuddus (2014) [27]
SSF	<i>Bacillus megaterium</i> B69	Sementes oleaginosas como substrato em 20% a concentração do substrato e 45% de umidade	1666.6 U g^{-1}	Saxena e Singh, 2014 [28]
	<i>Brevibacterium linens</i>	14 g farelo de trigo e 0,4 g (NH $_4$) $_2$ SO $_4$	7600 U g^{-1} ,	Shabbiri et al. (2012) [29]
	<i>Bacillus</i> sp. KR-8104	Substrato fermentado seco foi obtido a partir de farelo de trigo humedecido com água, 1% de (NH $_4$) $_2$ NO $_3$ e 1% de lactose	140 U g^{-1}	Hashemi et al. (2010) [30]
	<i>Bacillus laterosporus</i>	0.58% extrato de levedura, 2.44% amido, 2.34% peptone e 0.11% NaCl	4.125 UmL $^{-1}$	Kumar et al. (2013) [31]
	<i>Streptomyces</i> sp	5.00 g% extrato levedura e 0.25 g% CaCl $_2$	23.96 UmL $^{-1}$	Cotârleț e Bahrim (2012) [32]
	<i>Streptomyces</i> sp. ML12	5.5 g100 mL $^{-1}$ farelo de arroz, 5.3 g 100 mL $^{-1}$ farelo de trigo , 2.8 g100 mL $^{-1}$ NaCl e 1.4 g100 mL $^{-1}$ Mg SO $_4$	42.412 UmL $^{-1}$	Sivakumar et al, (2012) [33]
	<i>Bacillus subtilis</i> IP 5832	2 % peptona e 0.5 % amido	1.55 Um $^{-1}$	Božić et al. (2011) [34]
SbF	<i>Bacillus acidicola</i> TSAS1	2,75% amido e 0,01% K $_2$ HPO $_4$	10,100 IUL $^{-1}$	Sharma e Satyanarayana (2011) [5]
	<i>Bacillus</i> sp.	1 % farelo de trigo , 1% farelo de soja e 0.3% CaCO $_3$	515.30 UmL $^{-1}$	Zambare (2011) [35]
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	12.5% substrato (farelo de trigo e óleo de amendoin 1:1) e 0.0275 M CaCl $_2$	949.88 UmL $^{-1}$	Gangadharan et al. (2008) [36]
	<i>Aspergillus oryzae</i> CBS	0,25% farelo de soja , 0,50% hidrolisado ácido de caseína, 0,25% glycerol, 0,50% uréia, 0,20% K $_2$ HPO $_4$, 0,10% (NH $_4$) $_2$ SO $_4$ e 0,10% SO $_4$.7H $_2$ O.	148 UmL $^{-1}$	Kammoun et al. (2008) [25]
	<i>Bacillus</i> sp. PS-7	Farelo de trigo com 1% de Tween-40 e 1 mM de MgSO $_4$.7H $_2$ O, 1,0%, glicerol, 1,0% farelo de soja	4,64,000 U g^{-1}	Sodhi et al. (2005) [37]

Kammoun et al. (2008) demonstraram que o uso de quantidades acrescidas de muitas fontes de nitrogênio conduz a um aumento de expressão de α -amilase, e seus resultados experimentais mostraram claramente que o fosfato e magnésio desempenham um papel importante na expressão da enzima. Esses minerais podem ser essenciais para a manutenção da cultura, da produção e estabilidade da enzima. Usando as condições otimizadas, os autores obtiveram atividade de α -amilase igual a 148UmL^{-1} ou 5920Ug^{-1} de substrato, usando as seguintes concentrações (0,25% hidrolisado de farinha de soja, 0,50% hidrolisado ácido de caseína, 0,25% glicerol, 0,50% uréia, 0,20% KH_2HPO_4 , 0,10% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 0,10% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$).

Sodhi et al. (2005) descreveram as condições de escalonamento em laboratório, para a produção de α -amilase termoestável produzida por *Bacillus* sp. PS-7. As condições otimizadas determinadas pelos autores foram farelo de trigo suplementado com 1,0%, glicerol, 1,0% farinha de soja, 0,1% L-proline, 0,01% vitamina do complexo B e umedecido com água contendo 1% de Tween-40 e 1 mM de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ na proporção de 1:1,5 após incubação por 48 h a 37°C . A atividade enzimática alcançada nesse ensaio foi de 464000Ug^{-1} de substrato seco.

O planejamento fatorial para otimizar a produção de α -amilase produzida por *Bacillus brevis* sob fermentação em estado sólido foi realizado utilizando bagaço de mandioca como fonte de carbono (RAY; KAR, 2009). As condições otimizadas resultaram em um período de incubação de 36 horas, umidade relativa do substrato de 60%, pH 7,0 e temperatura de 60°C resultando em uma produção de α -amilase de $4568,6 \text{UmL}^{-1}$.

As condições do meio de cultivo para a produção de α -amilase produzida por *Brevibacterium linens* foi estudada utilizando metodologia de superfície de resposta sob fermentação em estado sólido. As condições otimizadas significativas foram 14,2 farelo de trigo, 0,4 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 4,30% de inóculo, 82,5% de umidade relativa e temperatura de $33,5^\circ\text{C}$, resultando em uma atividade máxima de 7600Ug^{-1} , o qual representou um aumento de 2 vezes em relação a condição não otimizada (SHABBIRI et al., 2012)

Os resultados alcançados foram semelhantes aos descritos na literatura uma vez que o aumento de atividade enzimática ficou entre 2 a 3 vezes em relação ao meio não otimizado. Diferentemente, os autores citados acima utilizaram uma fonte de carbono alternativa.

Os resultados preliminares indicaram um direcionamento positivo para os fatores amido solúvel, extrato de levedura e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Mantendo os outros fatores nas condições mínimas e centrais, foi realizado um planejamento fatorial composto 2^3 completo com pontos axiais o qual resultou na seguinte composição do meio de cultivo: 2,78% amido solúvel, 0,50% extrato de levedura, 0,30% peptona, 0,30% K_2HPO_4 , 0,06% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 0,05% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ com atividade média de α -amilase de 3796 UmL^{-1} .

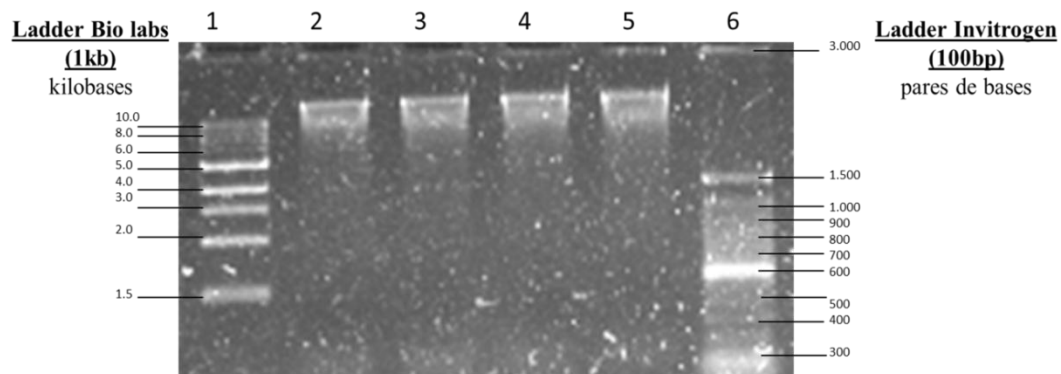
O presente estudo demonstra em seus resultados uma melhora na produção de α -amilase de até 3 vezes em relação a produção inicial, pelo método Somogyi-Nelson e de 1,5 vezes pelo método Dextrinizante. Os valores médios de atividade amilase foram de $575,15 \text{ UmL}^{-1}$ para o meio otimizado e de $196,0 \text{ UmL}^{-1}$ para a condição não otimizada. Tal valor foi inferior ao predito pela equação ajustada $3366,0 \text{ UmL}^{-1}$. Novos ensaios futuros serão realizados, uma vez que pode ter ocorrido algum problema durante o processo fermentativo o qual não reproduziu os níveis de atividade anteriormente observados. Além disso, estes resultados foram semelhantes aos descritos na literatura uma vez que o aumento de atividade enzimática ficou entre 2 a 3 vezes em relação ao meio não otimizado. Diferentemente, os autores citados acima utilizaram uma fonte de carbono alternativa. A concretização significativa do estudo encontra-se no fato de extrato de levedura, a fonte de nitrogênio que muitas vezes ser a mais cara, não serem significantes para o melhoramento da produção de amilase.

V.6. Estratégias para clonagem e expressão do gene para CGTase

V.6.1. Extração do DNA genômico

A extração de DNA genômico realizado que seguiu o protocolo do Kit GenElute™ Bacterial Genomic DNA (SIGMA®) foi confirmada por eletroforese em gel de agarose 2% corado com Nancy. A revelação do gel resultou em uma banda única e homogênea de 12kb correspondente ao DNA bacteriano de *P. campinasensis* H69-3 (Figura V.11).

Figura V.11- Gel de eletroforese mostrando a confirmação da extração do DNA de *Paenibacillus campinasensis* H69-3. 1. Ladder Bio Labs. 2,3,4 e 5. DNA de *P. campinasensis* H69-3 de 12kb. 6. Ladder Invitrogen.



V.6.2. Síntese dos primer's

Com base na sequência gênica de CGTases produzida por *Paenibacillus* ssp. e *Bacillus* ssp., disponíveis no banco de dados GenBank (BLAST/NCBI), foi realizado o desenho da sequência de primer's a ser utilizado para amplificação do gene de CGTase produzida por *P. campinasensis* H69-3. Foi feito também um alinhamento semi-global, pelos softwares ClustalW e BioEdit, afim de localizar trechos conservados e sintetizar manualmente os primer's específicos para a amplificação do gene *cgt* (Fig.V.12).

A CGTase correspondente da linhagem de *P. campinasensis* H69-3 não possui seu gene completo sequenciado depositado na base de dados, existindo apenas o gene 16S de seu RNA ribossômico. Por esta razão a linhagem selecionada como referência para a síntese dos primers foi a linhagem

P. macerans (>gi|2911477), que possui depositado no banco de dados um gene completo de CGTase.

O conjunto de primers foi definido como Forward CATGGAATTCATCACCCGATACGAGCGTGGACA e Reverse GATCGGATCCATTTTGCCAGTCCACC GTCACC com sítios para enzimas de restrição EcoRI e BamHI, e entre as posições 784-806 e 2827-2848, respectivamente. A temperatura de anelamento deverá ser entre 55-60°C, podendo variar.

O alinhamento das sequências de genes completos de CGTase no software BLAST mostrou que o gene da CGTase de *P. macerans* possui 99% de identidade com as CGTases de outras linhagens de *P. macerans* e *B. macerans*, e 71% e 72% com amilase de *B. circulans* e CGTase de *Bacillus* sp., respectivamente (Figura V.13).

As sequências de nucleotídeos do gene *cgt* foram determinadas por alguns pesquisadores, clonadas e expressas em um hospedeiro heterólogo como a *Escherichia coli*, considerada o micro-organismo hospedeiro mais comumente utilizado para a expressão da CGTase (CHENG et al., 2011), e entre outros gêneros de *Bacillus* sp, uma vez que as CGTases dos bacilos alcalofílicos são mais ativas e estáveis em amplas faixas de pH e temperatura do que outras CGTases bacterianas, além de terem potencial para uso industrial (HIRANO et al., 2006; PETROVA et al., 2012).

Lee et al. (2013) sequenciou, clonou o gene *cgt* de *Paenibacillus illinoisensis* ZY-08 e o expressou em *Escherichia coli*. A sequência de aminoácidos deduzida da CGTase de *P. illinoisensis* exibiu identidade mais elevada (99%) com a sequência de CGTase de *Bacillus licheniformis* (P14014). A CGTase foi purificada usando vetor de expressão frio, pCold I, e cromatografia de afinidade de His. O peso molecular da enzima purificada era de cerca de 74 kDa. A temperatura ótima de pH e da enzima era de 40 ° C e pH 7,4, respectivamente. A atividade enzimática foi aumentada pela adição de Ca^{2+} e inibida por Ba^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} e. Os valores de K_m e V_{max} calculados foram de 0,48 mg mL⁻¹ e 51,38 mg de β -ciclodextrina/mL/min. A linhagem recombinante facilmente converteu o amido solúvel em β -ciclodextrina.

Figura V.12- Localização dos primers desenhados a serem utilizados para a clonagem do gene *cgt* de *Paenibacillus campinasensis* H69-3 com base no gene completo de ciclodextrina de *P. macerans* (>gi|2911477). Os primers Forward e Reverse estão grifados em amarelo e alaranjado nas posições 784-806 e 2827-2848, respectivamente.



Fonte: BLAST/NCBI. (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Figura V.13. Alinhamento gerado pelo software online Blast da sequência de *Paenibacillus macerans* (>gi|2911477).

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Paenibacillus macerans alpha-cyclodextrin glucanotransferase (cgt) gene, complete cds	5587	5587	100%	0.0	100%	AF047363.1
<input type="checkbox"/> B.macerans cglM gene for cyclodextrin glucotransferase	4357	4357	80%	0.0	99%	X59045.1
<input type="checkbox"/> B.macerans cyclodextrin glucanotransferase (CD) gene, complete cds	4159	4159	75%	0.0	99%	M12777.1
<input type="checkbox"/> Paenibacillus macerans strain 602-1 alpha-cyclodextrin glucanotransferase gene, partial cds	3801	3801	68%	0.0	99%	KF384448.1
<input type="checkbox"/> Paenibacillus macerans strain YLW.alpha-cyclodextrin glucanotransferase (cgt) gene, partial cds	3770	3770	68%	0.0	99%	KF010775.1
<input type="checkbox"/> B.circulans amylase gene, complete cds	470	470	53%	7e-128	72%	M16657.1
<input type="checkbox"/> Bacillus.sp. cyclomaltohextrin glucanotransferase gene, complete cds	187	187	32%	8e-43	71%	M28053.1

Fonte: NCBI. (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Duan et al. (2013) melhoraram o rendimento de CD a partir de amido pela primeira utilização conjunta de isoamilase com α -CGTase relacionada. A isoamilase de *Thermobifida fusca* foi clonada e expressa em *E. coli* BL21 (DE3). A

caracterização bioquímica da enzima revelaram que a temperatura ótima e pH da enzima recombinante foi de 50 ° C e 5,5, respectivamente, e foi mantida a 60, 85 e 78% de atividade relativa, a 30, 40 e 60 ° C, respectivamente. Quando a isoamilase recombinante e α -CGTase foram usadas simultaneamente para converter o amido de batata (15%, w / v) em CD, as seguintes condições ótimas foram encontradas: 10 L de α -CGTase e 48 L de isoamilase por grama de substrato, com a temperatura de reação de 30°C e pH 5,6. Com a condição ótima, o rendimento total de CD atingiu 84,6% (w / w) após 24 h, que foi 31,2% superior à transformação com α -CGTase sozinha.

Petrova et al. (2012) conseguiram o isolamento de CGTase produzida por um alcalifílico halotolerante (possui taxa de crescimento tolerante até certa concentração de sal) *Bacillus pseudocaliphilus* 8SB. A enzima desta estirpe converteu amido em β e γ -cDs. Com o objetivo de uma produção otimizada da enzima, o gene *cgt* de *B. pseudocaliphilus* 8SB foi isolado e clonado num vetor pJET sob o controle do promotor de T7 e expressão extracelular em hospedeiro heterólogo *E. coli* BL21 (DE3) foi alcançada. O gene *cgt* do halotolerante alcalifílico *B. pseudocaliphilus* 8SB foi identificado e sequenciado. O gene *cgt* foi codificado em uma nova proteína com baixo nível de similaridade com as CGTases conhecidos. Ele foi clonado como um fragmento amplificado por PCR e, deste modo, a construção de uma biblioteca de genoma foi evitada. Esta é a primeira evidência do uso do vetor pJET em experiências de expressão e demonstra uma oportunidade de usar o seu promotor T7 para uma produção extracelular eficiente de proteínas heterólogas em hospedeiros *E. coli*. A estrutura do peptídeo sinal assegurou o transporte extracelular e uma bem-sucedida maturação da enzima. Pela abordagem de clonagem molecular entre outras estratégias de cultivo, 22,75 vezes de melhoramento para β e 4.52 vezes superior para γ de atividades de CGTases extracelulares foram alcançados (PETROVA et al., 2012).

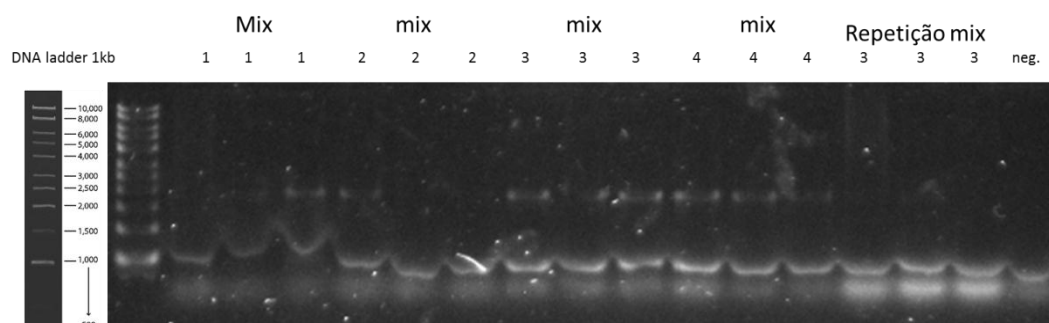
Cheng et al. (2011) estabeleceram uma estratégia de fermentação em batelada alimentada para o cultivo de alta densidade celular de *E. coli* e avaliaram a produção extracelular de α -CGTase recombinante de *Paenibacillus macerans* JFB

01/05. Uma estratégia baseada tanto na alimentação combinada com a taxa de crescimento específico antes da indução quanto na quantidade de resíduos após a indução de glicerol foi usada para controle do crescimento celular, da produção de etilo, e do consumo de glicerol. Quando induzida pela lactose, uma solução de alimentação com nitrogênio foi o complexo vantajoso encontrado para a produção de α -CGTase. Além disso, resultados de diferentes temperaturas e pontos de indução indicaram que estes fatores desempenharam um papel importante na produção de α -CGTase. Quando induzida a 25°C e a um peso seco celular de 30 g L, a atividade extracelular de α -CGTase pode chegar a 275,3 UmL⁻¹.

V.6.3. Reação de PCR

A amplificação do gene *cgt* foi realizada utilizando como molde a amostra 4 do DNA extraído e diluído 100 vezes, com concentração de aproximadamente 200 ngL⁻¹. Por meio da técnica de PCR, um fragmento correspondente da região codificante do gene *cgt* de *P. campinasensis* H69-3 foi amplificado, sendo possível a observação de uma única banda com aproximadamente 2500pb como visualizado na Figura V.14.

Figura V.14- Gel de eletroforese mostrando o produto de PCR do DNA genômico a partir de *Paenibacillus campinasensis* H69-3.



Obs. Bandas até faixa de 1,8kb não indicam a amplificação.

VI. CONCLUSÃO

As linhagens nomeadas de A-1.2 e A-18 tiveram as fontes de carbono amido solúvel, amido de mandioca, amido de milho e farelo de mandioca como os substratos que maximizaram a produção da enzima por ambas as linhagens, e o tempo de fermentação com maiores atividades foi entre 72 e 96 horas.

A CGTase microbiana estudada foi produzida por *Paenibacillus campinasensis* H69-3 em fermentação submersa. No estudo da atividade de amilase e CGTase de *P. campinasensis* em fontes de carbono alternativas, o perfil de produção ao longo do tempo indicou o amido solúvel, amido de mandioca e a Maizena como as fontes de carbono que propiciaram as e o tempo de 72 horas foi o mais apropriado, proporcionando 350 U mL^{-1} de atividade amilásica e 25 U mL^{-1} de atividade CGTase.

Na caracterização físico-química das enzimas, com relação à temperatura ótima, o valor ficou em $65 \text{ }^\circ\text{C}$ para ambas as linhagens e pH ótimo em pH 7,0 para a linhagem A-18 e em pH 6,5 para a linhagem A-1.2. Quanto à CGTase nativa de *P. campinasensis*, as atividades significativas foram em um intervalo de pH de 5 a 6,5 e um pico no pH 7,5 nas fonte amido solúvel e maizena. A temperatura ideal da enzima foi 50°C , mas a temperatura de 80°C não desnaturou a enzima.

A otimização dos constituintes nutricionais do meio de cultivo de A-1.2 resultou na seguinte composição do meio de cultivo: 2,78% amido solúvel, 0,50% extrato de levedura, 0,30% peptona, 0,30% K_2HPO_4 , 0,06% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,05%

(NH₄)₂SO₄ com atividade média de α -amilase de 3796 U/mL, o que resultou em um aumento de 3 vezes na atividade enzimática em relação ao meio não otimizado. Para a linhagem A-18, os resultados ainda não são conclusivos, uma vez que houve problemas durante a fermentação nos procedimentos posteriores ao planejamento fatorial 2⁶⁻¹. Tais dados continuam em análise para posterior publicação. A concretização significativa do estudo encontra-se no fato de extrato de levedura, a fonte de nitrogênio que muitas vezes ser a mais cara, não serem significantes para o melhoramento da produção de amilase.

As estratégias dos ensaios moleculares com a CGTase produzida por *P. campinasensis* apresentaram a confirmação da extração do DNA genômico de *P. campinasensis* por eletroforese em gel de agarose que resultou em uma banda única e homogênea de 12kb correspondente ao DNA pretendido. Após o alinhamento, os primer's Forward ATGGAATTCATCACCCGATAC e Reverse ATCTCTAGAATTTTGCCAGTC com sítios para enzimas de restrição EcoRI e BamHI foram desenhados para serem utilizados para amplificação do gene *cgt* e através da técnica de PCR, um fragmento correspondente da região codificante do gene *cgt* de *P. campinasensis* foi amplificado, sendo possível a observação de uma única banda com aproximadamente 2500pb.

Dessa forma, estudos de micro-organismos com boa atividade para CGTase, que visem a diminuição dos custos de produção, o aumento da disponibilidade de CD são interessantes para o setor industrial. O emprego de técnicas recentes de manipulação genética, que disponibilizem uma CGTase melhorada, são igualmente importantes

VII. LITERATURA CITADA

- AGUIAR, U.N.; LIMA, S.G.; ROCHA, M.S.; FREITAS, R.M.; OLIVEIRA, T.M.; SILVA, R.M.; MOURA, L.C.B.; ALMEIDA, L.T.G. PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO COMPLEXO DE INCLUSÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Croton zehntneri* COM b-CICLODEXTRINA. Teresina-PI: Química Nova.v.37, n.1, p.50-55, 2014.
- ALVES-PRADO, H.F.; GOMES, E.; DASILVA, R. Produção de ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase), microbiana e aplicação de ciclodextrinas em alimentos: Revisão. Boletim da Sociedade Brasileira de Ciências e Tecnologia de Alimentos. v. 36, n. 1, p. 43-54, 2002a.
- ALVES-PRADO, H. F.; GOMES, E.; DASILVA R. Seleção de microrganismos produtores de ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase), produção e caracterização da enzima. Brazilian Journal of Food Technology. v. 5, n. 98, p.189-196, 2002b.
- ALVES-PRADO, H. F.; GOMES, E.; DASILVA R. Evaluation of solid and submerged fermentations for the production of cyclodextrin glycosyltransferase by *Paenibacillus campinasensis* H69 3: characterization of crude enzyme. Applied Biochemistry and Biotechnology. v. 129, n. 1-3, p. 234-246, 2006.
- AMID, M.; MANAP, M.Y.A.; ZOHDI, N. Optimization of Processing Parameters for Extraction of Amylase Enzyme from Dragon (*Hylocereus polyrhizus*) Peel Using Response Surface Methodology. Serdang, Selangor: Hindawi Publishing Corporation The Scientific World Journal. p.1-12, 2014.

- ARA, K.Z.G.; LUNDEMO, P.; FRIDJONSSON, O.H.; HREGGVIDSSON, G.O.; ADLERCREUTZ, P.; KARLSSON, E.N. A CGTase with high coupling activity using γ -cyclodextrin isolated from a novel strain clustering under the genus *Carboxydocella*. Askja: Glycobiology, p.1-10, 2015.
- ASOODEH, A.; CHAMANI, J.; LAGZIAN, M. A novel thermostable, acidophilic α -amylase from a new thermophilic “*Bacillus* sp. Ferdowsicus” isolated from Ferdows hot mineral spring in Iran: Purification and biochemical characterization. Mashhad: International Journal of Biological Macromolecules, v.46, p. 289-297, 2010.
- ATANASOVA, N.; KITAYSKA, T.; BOJADJIEVA, I.; YANKOV, D.; TONKOVA, A. A novel cyclodextrin glucanotransferase from alkaliphilic *Bacillus pseudocaliphilus* 20RF: Purification and properties. Sofia: Process Biochemistry. v.46, p. 116-122, 2011.
- BAI, Y.; WANG, J.; ZHANG, Z.; SHI, P.; LUO, H.; HUANG, H.; LUO, C.; YAO, B. A novel family 9 β -1,3(4)-glucanase from thermoacidophilic *Alicyclobacillus* sp. A4 with potential applications in the brewing industry. Verlag: Applied Microbiology Biotechnology, v.87, p.251-259, 2010.
- BANEYX, F. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. Seattle: Current Opinion in Biotechnology, v.10, p.411-421, 1999.
- BARUAH, U.; GOGOI, N.; MAJUMDAR, G.; CHOWDHURY, D. β -Cyclodextrin and calix[4]arene-25,26,27,28-tetrol capped carbon dots for selective and sensitive detection of fluoride. Guwahati: Carbohydrate Polymers. v.117, p. 377-383, 2015.
- BERNARDES, A.V.; MARTINS, E.S.; MATA, J.F.; FERREIRA, O.E. Utilização de Subprodutos Agroindustriais para Produção de α -Amilase por *Rhizomucor Miehei*. Ponta Grossa: Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial, v.08, n.02, p. 1439-1451, 2014.
- BERTOLDO, C.; ANTRANIKIAN, G. Starch-hydrolyzing enzymes from thermophilic archaea and bacteria. Hamburg: Current Opinion in Chemical Biology. v.6, p.151–160, 2002.
- BLAST/NCBI. Basic Local Alignment Search Tool: Nucleotide Center Banking International. (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) Acesso em abril 2015.

- BRIJWANI, K.; OBEROI, H.S.; VADLANI, P.V. Production of a cellulolytic enzyme system in mixed-culture solid-state fermentation of soybean hulls supplemented with wheat bran. *Manhattan: Process Biochemistry*. v.45, p.120-128, 2010.
- CHENG, J.; WU, D.; CHEN, S.; CHEN, J.; WU, J. High-Level Extracellular Production of α -Cyclodextrin Glycosyltransferase with recombinant *Escherichia coli* BL21 (DE3). *Wuxi: Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v. 59, p. 3797-3802, 2011.
- CHRISTIANSEN, C.; HACHEM, M.A.; JANECEK, S.; VIKSØ-NIELSEN, A.; BLENNOW, A.; SVENSSON, B. The carbohydrate-binding module family 20 – diversity, structure, and function. *Frederiksberg: The FEBS Journal*. v. 276, p. 5006-5029, 2009.
- COSTA, H.; GASTÓN, J.R.; LARA, J.; MARTINEZ, C.O.; MORIWAKI, C.; MATIOLI, G.; FERRAROTTI, S.A. Cyclodextrin glycosyltransferase production by free cells of *Bacillus circulans* DF 9R in batch fermentation and by immobilized cells in a semi-continuous process. *Berlin: Bioprocess Biosyst. Eng.*, 2015.
- COWAN, D.A.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Enhancing the functional properties of thermophilic enzymes by chemical modification and immobilization. *Cape Town: Enzyme and Microbial Technology*. v. 49, p. 326-346, 2011.
- DAVIDOV-PARDO, G.; AROZARENA, I.; MARIN-ARROYO, M.R. Optimization of a Wall Material Formulation to Microencapsulate a Grape Seed Extract Using a Mixture Design of Experiments. *Spain: Food Bioprocess Technol.* v. 6, p. 941–951, 2013.
- DEMAIN, A.; VAISHNAV, P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Madison: Biotechnology Advances*, v. 27, p.297-306, 2009.
- DOU. Diário Oficial da União. Ministério da Saúde. Portaria 518, de 25 de março de 2004. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativas ao controle e vigilância da qualidade da água para o consumo humano e seu padrão de potabilidade. Seção 1:266-70, 2004.

- DUAN, X.; CHEN, S.; CHEN, J.; WU, J. Enhancing the cyclodextrin production by synchronous utilization of isoamylase and α -CGTase. Verlag: Applied Microbiology Biotechnology. v. 97, p. 3467-3474, 2013
- EINSFELDT, K. Seleção, clonagem e expressão de uma proteína associada à virulência de *Streptococcus pneumoniae*. Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE. Dissertação, 2010.
- ELBAZ, A.F.; SOBHI, A.; ELMEKAWY, A. Purification and characterization of cyclodextrin β -glucanotransferase from novel *Alkalophilic bacilli*. Berlin: Bioprocess Biosyst. Eng., 2014.
- EMTENANI, S.; ASOODEHA, A.; EMTENANI, S. Gene cloning and characterization of a thermostable organic-tolerant α -amylase from *Bacillus subtilis*. Mashhad: International Journal of Biological Macromolecules. v.72, p.290–298, 2015.
- ERENO, D. Dueto poderoso: Enzima de mosca produzida em levedura combate bactérias danosas à fabricação de álcool combustível. Pesquisa FAPESP, n. 140, p. 66-69, 2007.
- EZHILARASI, P.N.; KARTHIK, P.; CHHANWAL, N.; ANANDHARAMAKRISHNAN, C. Nanoencapsulation Techniques for Food Bioactive Components: A Review. Mysore: Food Bioprocess Technol., v. 6, p. 628-647, 2013.
- FREITAS, T. L.; MONTI, R.; CONTIERO, J. Production of CGTase by a *Bacillus alkalophilic* CGII strain isolated from wastewater of a manioc flour industry. Brazilian Journal of Microbiology. v. 35, p. 255-260, 2004.
- GARBEVA, P. VAN VEEN, J.A.; VAN ELSAS, J.D. Predominant Ispp. in Agricultural Soil under Different Management Regimes Detected via PCR-DGGE. New York: Microbial Ecology, v.45, p. 302-316, 2003.
- GARCÍA, J.; SANTANA, Z.; ZUMALACÁRREGUI, L.; QUINTANA, M.; GONZÁLEZ, D.; FURRAZOLA, G.; CRUZ, O. Estrategias de obtención de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*. La Habana: Vacci Monitor, v. 22, n.2, p.30-39, 2013.

- GAWANDE, B. N.; GOEL, A.; PATKAR, A.; NENE, S. N. Purification and properties of a novel raw starch degrading cyclomaltodextrin glucoamylase from *Bacillus firmus*. Pune: Applied Microbiology Biotechnology. v.51, p. 504-509, 1998.
- GHASEMI, Y.; RASOUL-AMINI, S.; EBRAHIMINEZHAD, A.; ZARNINI, G. Halotolerant Amylase Production by a Novel Bacterial Strain, *Rheinheimera aquimaris*. Shiraz: Research Journal of Microbiology, v.05, n.02, p.144-149, 2010.
- GHORBEL, R.E.; Maktouf, S.; Massoud, E.B.; Bejar, S.. New thermostable amylase from *Bacillus cohnii* US147 with a broad pH applicability. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 157, p.50-60, 2009.
- GUPTA, R.; GIGRAS, P.; MOHAPATRA, H.; GOSWAMI, V. K.; CHAUHAN, B. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. New Delhi: Process Biochemistry. v.38, p. 1599-1616, 2003.
- HAN, R.; LI, J.; SHIN, H.; CHEN, R.; DU, G.; LIU, L.; CHEN, J. Carbohydrate-Binding Module–Cyclodextrin Glycosyltransferase Fusion Enables Efficient Synthesis of 2-O-D-Glucopyranosyl-L-Ascorbic Acid with Soluble Starch as the Glycosyl Donor. Applied and Environmental Microbiology, v.79, n.10, p. 3234–3240, 2013.
- HANCI, V.; VURAL, A.; HANCI, S.Y.; KIRAZ, A.A.; ÖMÜR, D.; ÜNVER, A. In vitro evaluation of antimicrobial features of sugammadex. Revista Brasileira de Anestesiologia. v.64, n.2, p.105-108, 2014.
- HARTREE, E. F. Determination of protein: A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. Analytical Biochemistry, v. 48, p. 422-427, 1972.
- HIRANO, K.; ISHIHARA, T.; OGASAWARA, S.; MAEDA, H.; ABE, K.; NAKAJIMA, T.; YAMAGATA, Y. Molecular cloning and characterization of a novel γ -CGTase from alkalophilic *Bacillus* sp. Verlag: Applied Microbiology Biotechnology. v.70, p.193-201, 2006.
- HOWARD, L.R.; BROWMILLER, C.; PRIOR, R.L.; MOUROMOUSTAKOS, A. Improved Stability of Chokeberry Juice Anthocyanins by β -Cyclodextrin

- Addition and Refrigeration. Arkansas: Journal of Agricultural and Food Chemistry. v, 61, p. 693-699, 2003.
- HUANG, M.; LI, C.; GU, A.; CHENG, L.; HONG, Y.; LI, Z. Mutations in Cyclodextrin Glycosyltransferase from *Bacillus circulans* Enhance β -Cyclization Activity and β -Cyclodextrin Production. Journal of Agricultural and Food Chemistry. v. 62, p. 11209-11214, 2014.
- IBRAHIM, A.S.S.; AL-SALAMAH, A.A.; EL-TAYEB, M.A.; EL-BADAWI, Y.B.; ANTRANIKIAN, G. A Novel Cyclodextrin Glycosyltransferase from Alkaliphilic *Amphibacillus* sp. NPST-10: Purification and Properties. International Journal of Molecular Sciences. v. 13, p. 10505-10522, 2012.
- IBRAHIM, A.S.S.; AL-SALAMAH, A.A.; EL-TONI, A.M.; EL-TAYEB, M.A.; ELBADAWI, Y.B. Immobilization of cyclodextrin glucanotransferase on aminopropyl-functionalized silica-coated superparamagnetic nanoparticles. Valparaíso: Electronic Journal of Biotechnology, p.1-16, 2013.
- IBRAHIM, A.S.S.; AL-SALAMAH, A.A.; EL-TONI, A.M.; EL-TAYEB, M.A.; ELBADAWI, Y.B. Cyclodextrin glucanotransferase immobilization onto functionalized magnetic double mesoporous core-shell silica nanospheres. Valparaíso: Electronic Journal of Biotechnology. v. 17, p.55-64, 2014.
- JAMUNA, R. et al. Synthesis of cyclodextrin glucosyl transferase by *Bacillus cereus* for the production of cyclodextrins. Appl Biochem Biotechnol. v 43, p163-176, 1993.
- JANECEK, S.; SVENSSONB, B.; MACGREGOR, A. Structural and evolutionary aspects of two families of non-catalytic domains present in starch and glycogen binding proteins from microbes, plants and animals. Enzyme and Microbial Technology. v. 49, p. 429– 440, 2011.
- JORGENSEN, S.T.; TANGNEY, M.; STARNES, R. L.; AMEMIYA E JORGENSEN, P. L. Cloning and nucleotide sequence of a thermostable cyclodextrin glycosyltransferase gene from *Thermoanaerobacter* sp ATCC53627 and its expression in *Escherichia coli*. Biotechnology Letters. v.19, n.10, p.1027-1031, 1997.

- KANEKO, T.; SONG, K-B.; HAMAMOTO, T.; KUDO, T. AND HORIKOSHI, K. Molecular cloning and nucleotide sequence of the cyclomaltodextrin glucanotransferases gene from the alkalophilic *Bacillus* sp strain n° 38-2. *Journal of General Microbiology*. v. 1354, p. 97-105, 1988.
- KANEKO, T.; SONG, K-B.; HAMAMOTO, T.; KUDO, T. AND HORIKOSHI, K. Construction of a chimeric series of *Bacillus* cyclomaltodextrin glucanotransferases and analysis of the thermal stabilities and pH optima of the enzymes. *Journal of General Microbiology*. v.135, p. 3447-3457, 1989.
- KELES, G.T.; KURUTEPE, S.; TOK, D.; GAZI, H.; DINECCEDIL, G. Comparison of antimicrobial effects of dexmedetomidine and etomidateligipuro with those of propofol and midazolam. *European Journal of Anaesthesiology*, p. 1037-1040, 2006.
- KELES, G.T.; TOPÇU, I.; EKICI, YENTÜR, A. Evaluation of piroxicam- β -cyclodextrin as a preemptive analgesic in functional endoscopic sinus surgery. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v.43, p.806-811, 2010.
- KIM, M.H.; SOHN, C.B. E OH, T.K. Cloning and sequencing of a cyclodextrin glycosyltransferase gene from *Brevibacillus brevis* CD162 and its expression in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters*. v.164, p. 411-418, 1998.
- KITAMOTO, N.; KIMURA, T.; KITO, Y. AND OHMIYA, K. Cloning and sequencing of the gene encoding cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus* sp KC201. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. v.74, n.6,p. 345-351, 1992.
- KO, W.C.; CHANG, C.K.; WANG, H.J.; WANG, S.J.; HSIEH, C.W. Process optimization of microencapsulation of curcumin in γ -polyglutamic acid using response surface methodology. *Food Chemistry*. v. 172, p.497-503, 2015.
- KUJUR, M.; PATEL, A.K. Kinetics of soil enzyme activities under different ecosystems: An index of soil quality. *Chilean Journal of Agricultural Research*, v.74, n.1, p.96-104, 2014.
- LARRAÑETA, E.; ISASI, J.R. Non-covalent hydrogels of cyclodextrins and poloxamines for the controlled release of proteins. *Carbohydrate Polymers*, v. 102, p.674-681, 2014.

- LEE, K.C.P. E TAO, B.Y. High-level expression of cyclodextrin glycosyltransferase in *E. coli* using a T7 promoter expression system. *Starch/Stärke*. v.46, n.2, p. 67-74, 1994.
- LEE, Y.S.; ZHOU, Y.; PARK, D.J.; CHANG, J.; CHOI, Y.L. β -cyclodextrin production by the cyclodextrin glucanotransferase from *Paenibacillus illinoisensis* ZY-08: cloning, purification, and properties. *World J Microbiol Biotechnol*, v.29, p.865–873, 2013.
- LEEMHUIS, H.; DIJKSTRA, D.W. E DIJKHUIZEN, L. *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* cyclodextrin glycosyltransferase: mechanism and kinetics of inhibition by acarbose and cyclodextrins. *European Journal of Biochemistry*. v. 270, p. 155-162, 2003.
- LEITE, R. S. R.; BOCCHINI, D. A.; MARTINS, E. S.; SILVA, D.; GOMES, E.; DA SILVA, R. Production of cellulolytic and hemicellulolytic enzymes from *Aureobasidium pullulans* on solid state fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. v.136, p.251 - 258, 2007.
- LI, C.; LI, W.; HOLLER, T.P.; GU, Z.; LI, Z. Polyethylene glycols enhance the thermostability of β -cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans*. *Jiangsu: Food Chemistry*. v.164, p.17-22, 2014.
- LI, Z., CHEN, S.; GU, Z.; CHEN, J.; WU, J. Alpha-cyclodextrin: Enzymatic production and food applications. *Trends in Food Science & Technology*, v.35, p.151-160, 2014a.
- LI, Z.; BAN, X.; GU, Z.; LI, C.; HUANG, M.; HONG, Y.; CHENG, L. Mutations enhance β -cyclodextrin specificity of cyclodextringlycosyltransferase from *Bacillus circulans*. *Carbohydrate Polymers*. v. 108, p. 112–117, 2014b.
- MACIEL, G.M.; VANDENBERGHE, L.P.S.; HAMINIUK, C.W.I.; FENDRICH, R.C.; BIANCA, B.E.D.; BRANDALIZE, T.Q.S.; PANDEY, A.; SOCCOL, C.R. Xylanase Production by *Aspergillus niger* LPB 326 in Solid-State Fermentation Using Statistical Experimental Designs. *Curitiba: Food Technol. Biotechnol*. v.46, n.02, p. 183–189, 2008.
- MÄKELÄ, M.J.; KORPELA, T.K.; PUISTO, J. E LAAKSO, S.V. Nonchromatographic cyclodextrin assays: evaluation of sensitivity, and

- conversion mixture applications. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v.36, p. 83-88, 1988.
- MARSH, Z.; YANG, T.; NOPO-OLAZABAL, L.; WU, S.; INGLE, T.; JOSHEE, N.; MEDINA-BOLIVAR, F. Effect of light, methyl jasmonate and cyclodextrin on production of phenolic compounds in hairy root cultures of *Scutellaria lateriflora*. *Phytochemistry*. v. 107, p. 50-60, 2014.
- MARTINS, R. An alkaline active cyclodextrin glycosyltransferase from an alkaliphilic *Bacillus agaradhaerens*. Doctoral thesis. Lund University, Lund, Sweden, 2003.
- MENEZES, C.C.; PECEGUINI, L.A.M.; SILVA, A.D.; SIMÕES, C.M. Uso de Sugamadex após Reversão Incompleta com Neostigmine do Bloqueio Neuromuscular Induzido por Rocurônio. *Revista Brasileira de Anestesiologia*. v. 62, n. 4, p.545-547, 2012.
- MENEZES, C. R.; SILVA, I. S.; DURRANT, L. R. Bagaço de cana: fonte para produção de enzimas ligninocelulolíticas. *Estudos Tecnológicos*, v. 5, n. 1, p. 68-78, 2009. <http://dx.doi.org/10.4013/ete.2009.51.05>
- MILAGRES, A.M.F.; SANTOS, E.; PIOVAN, T.; ROBERTO, I.C. Production of xylanase by *Thermoascus aurantiacus* from sugar cane bagasse in an aerated growth fermentor. *Process Biochemistry*. v.39, p.1387–1391, 2004.
- MITIDIERI, S.; MARTINELLI, A.H.S.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M.H. Enzymatic detergent formulation containing amylase from *Aspergillus niger*: A comparative study with commercial detergent formulations. *Bioresource Technology*. v. 97, p. 1217–1224, 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 tamarii*. *Revista de Microbiologia: Maringá, PR, Departamento de Bioquímica, Universidade Estadual de Maringá*, p. 157-162, 1999.
- NAJAFI M.F.; DEOBAGKAR D. Purification and characterization of an extracellular alpha-amylase from *Bacillus subtilis* AX20. *Protein Expr Purif*. v.41, p.349-54, 2005.

- NAKAMURA, N. E HORIKOSHI, K. Purification and properties of neutral-cyclodextrin glycosyltransferase of an alkalophilic *Bacillus* sp. Agricultural and Biological Chemistry. v. 40, n. 9, p. 1785-1791, 1976.
- NELSON, N. A photometric adaptation of Somogyi method for determination of glucose. Journal of Biologic Chemistry, Bethesda, Md, v. 153, n. 2, p. 375-380. 1960.
- NILSEN, J.E; BORCHET, T.V. Protein engineering of bacterial α -amylase. Biochimica et Biophysica Acta.v.p.1543,p.253-274, 2000.
- NITSCHKE, L.; HEEGER, K.; BENDER, H. AND SCHULZ, G. E. Molecular cloning, nucleotide sequence and expression in *Escherichia coli* oh the β -cyclodextrin glycosyltransferase gene from *Bacillus circulans* strain n°8. Applied Microbiology and Biotechnology. v.33, p.542-546, 1990.
- NIZAMUTDINOVA, I.T.; KIM, Y.M.; CHUNG, J.I.; SHIN, S.C.; JEONG, Y.K.; SEO, H.G.; LEE, J.H.; CHANG, K.C.; KIM, H.J. Anthocyanins from Black Soybean Seed Coats Preferentially Inhibit TNF-r-Mediated Induction of VCAM-1 over ICAM-1 through the Regulation of GATAs and IRF-1. Journal of Agricultural and Food Chemistry. v.57, p.7324-7330, 2009.
- NOVOZYMES, 2013. The Novozymes Report 2013. <http://www.novozymes.com/en/investor/financial-reports/Documents/The-Novozymes-Report-2013.pdf>. Accessed 12 maio 2015.
- NWAGU, T.N.; OKOLO, B.N. Extracellular Amylase Production of a Thermotolerant *Fusarium* sp. Isolated from Eastern Nigerian soil. Nsukka: Brazilian Archives of Biology and Technology, v.54, n.4, p.649-658, 2011.
- OHDAN, K.; KURIKI, H.; TAKATA, S. E OKADA, S. Cloning of the cyclodextrin glucanotransferase gene from alkalophilic *Bacillus* sp A2-5a and analysis of the raw starch-binding domain. Applied Microbiology and Biotechnology. v.53, p.430-434, 2000.
- OLIVEIRA, A. N.; OLIVEIRA, L.A.; ANDRADE, J.S.; CHAGAS-JÚNIOR, A.F. *Rhizobia* Amylase Production Using Various Starchy Substances As Carbon Substrates. Manaus: Brazilian Journal of Microbiology , v. 38, p.208-216, 2007.

- PANDEY, A.; WEBB, C.; SOCCOL, C. R.; LARROCHE, C. Enzyme Technology. 1st ed. New Delhi: Asiatech Publishers. 760 p. 2005.
- PARK, C. S.; PARK, K. H. AND KIM, S. H. A rapid screening method for alkaline α -cyclodextrin glucanotransferase using phenolphthalein, methyl orange containing solid medium. *Agricultural and Biological Chemistry*. v.53, n.4, p. 1167-1169, 1989.
- PEIXOTO, S. C.; JORGE, J. A.; TERENCEZI, H. F.; POLIZELI, M. L. T. M.; *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis* : a thermotolerant fungus with potential for production of thermostable amylases. *International Microbiology*, v.6, 269-273, 2003.
- PETROVA, P.; TONKOVA, A.; PETROV, K. Sequence analysis, cloning and extracellular expression of cyclodextrin glucanotransferase gene from the alkaliphilic *Bacillus pseudocaliphilus* 8SB in *Escherichia coli*. *Process Biochemistry*, v. 47, p. 2139-2145, 2012.
- PONGSAWASDI, P. E YAGISAWA, M. Screening and identification of a cyclomaltodextrin glucanotransferase-producing bacteria. *Journal Fermentation Technology*. v.65, n.4, p. 463-467, 1987.
- POÓR, M.; KUNSÁGI-MÁTÉ, S.; SZENTE, L.; MATISZ, G.; SECENJI, G.; CZIBULYA, Z.; KÖSZEGI. Interaction of ochratoxin A with quaternary ammonium beta-cyclodextrin. *Food Chemistry*, v. 17, p. 143-149, 2015.
- PÓSCI, I; NÓGRADY, N.; LIPTÁK, A.; SZENTIRMAI, A. Cyclodextrins are likely to induce cyclodextrin glycosyltransferase production in *Bacillus macerans*. *Folia Microbiologica*. v.43, n.1, p.71-74, 1998.
- PROMEGA CORPORATION. Life Science Catalog, p.364, 2014.
- RAHMAN, K.; ILLIAS, R.M.; HASSAN, O.; MAHMOOD, N.A.N.; RASHID, N.A.A. Molecular cloning of a cyclodextrin glucanotransferase gene from alkalophilic *Bacillus* sp. TS1-1 and characterization of the recombinant enzyme. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 39, p. 74–84, 2006.
- RAMAKRISHNA, S.V.; SASWATHI, N.; SHEELA, R.; JAMUNA, R. Evaluation of solid, slurry, and submerged fermentations for the production of cyclodextrin

- glycosyltransferas by *Bacillus cereus*. *Enzyme and Microbial Technology*.v.16, n.5, p.441-111, 1994.
- REIS, A. A. ; AlvesPrado, H.F. . Amylase production from different carbon sources. In: 34th Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals, 2012, New OrleansLA. Proceeding of 34th Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals, 2012a. p. 116116.
- REIS, A. A. ; AlvesPrado, H.F. . Perfil de produção de α amilase produzida por bactérias isoladas de áreas de Cerrado. In: X Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2012, 2012, BlumenauSC. Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática Livro de resumos do X ENZITEC 2012. Blumenau, SC: Biblioteca Universitária da FURB, 2012b.
- REIS, A. A. ; AlvesPrado, H.F. ; GOMES, A. C. S. ; MAINARDI, P. H. ; RODRIGUES, L. C. B. . Caracterização físicoquímica de α amilase produzida por bactérias isoladas de áreas de Cerrado. In: XXIV Congresso de Iniciação Científica da Unesp 1ª fase, 2012, Ilha SolteiraSP. XXIV Congresso de Iniciação Científica da Unesp Sustentabilidade: Um sonho de futuro, 2012.
- RODRIGUES, M.I.; IEMMA, A.F. Planejamento de experimentos e Otimização de processos. Campinas: Casa do Espírito Amigo Fraternidade Fé e Amor, 2ed., p.1-6, 2009.
- ROY, J.K.; BORAH,A.; MAHANTA, C.L.; MUKHERJEE, A.K. Cloning and overexpression of raw starch digesting α -amylase gene from *Bacillus subtilis* strain AS01a in *Escherichia coli* and application of the purified recombinant α -amylase (AmyBS-I) in raw starch digestion and baking industry. Assam: Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v.97, p.118– 129, 2013.
- SAGU, S.T.; NSO, E.J.; HOMANN, T.; KAPSEU, C.; RAWEL, H.M. Extraction and purification of beta-amylase from stems of *Abrus precatorius* by three phase partitioning. *Food Chemistry*. v. 183, p. 144-153, 2015.
- SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. Agarose gel electrophoresis in *Molecular Cloning: a laboratory manual*. New York: CSHL PRESS, p.5-8, 2001.
- SCHMID, G. Cyclodextrin glycosyltransferase production: yield enhancement by overexpression of cloned genes. *Trends in Biotechnology*. n.7, p. 244-248, 1989.

- SHARMA, A.; SATYANARAYANA, T. Microbial acid-stable α -amylases: Characteristics, genetic engineering and applications. New Delhi: Process Biochemistry, v.48, p. 201–211, 2013.
- SHEN, J.; XIN, X.; ZHANG, Y.; SONG, L.; WANG, L.; TANG, W.; REN, Y. Manipulation the behavior of supramolecular hydrogels of α -cyclodextrin/star-like block copolymer/carbon-based nanomaterials. Carbohydrate Polymers, v. 117, p.592-599, 2015.
- SILVA, T.M.; ATTILI-ANGELIS, D.; CARVALHO, F.A.; SILVA, R.; BOSCOLO, M.; GOMES, E. Production of Saccharogenic and Dextrinogenic Amylases by *Rhizomucor pusillus* A 13.36. The Journal of Microbiology, v. 43, n.06, p.561-568, 2005.
- SILVA E M; MACHUCA A; MILAGRES A. M. F. Effect of cereal brans on *Lentinula edodes* growth and enzyme activities during cultivation on forestry waste. Lett. Appl. Microbiol., v. 40, p.283-288, 2009.
- SILVA, C.A.A.; LACERDA, M.P.F.; LEITE, R.S.R.; FONSECA, G.G. Production of enzymes from *Lichtheimia ramosa* using Brazilian savannah fruit wastes as substrate on solid state bioprocesses. Valparaíso: Electronic Journal of Biotechnology .p.1-9, 2013.
- SIN, K.; NAKAMURA, A.; KOBAYASHI, K.; MASAKI, H.; UOZUMI, T. Cloning and sequencing of a cyclodextrin glucanotransferase gene from *Bacillus ohbensis* and its expression in *Escherichia coli*. Appl Microbiol Biotechnol, Springer-Verlag.v.35, p.600-605, 1991.
- SONI, S. K.; KAUR, A.; GUPTA, J. K. A solid state fermentation based bacterial α -amylase and fungal glucoamylase system and its suitability for the hydrolysis of wheat starch. Process Biochemistry, v.39, p.185-192, 2003.
- SPOHNER, S.C.; MÜLLER, H.; QUITMANN, H.; CZERMAK, P. Expression of enzymes for the usage in food and feed industry with *Pichia pastoris*. Journal of Biotechnology, v. 202, p. 118–134, 2015.
- STERGIOU, P.Y.; FOUKIS, A.; THEODOROU, L.; PAPAGIANNI, M.; PAPAMICHAEL, E. Optimization of the Production of Extracellular α -Amylase

- by *Kluyveromyces marxianus* IF0 0288 by Response Surface Methodology. Brazilian Archives of Biology and Technology. v.57, n.3, p. 421-426, 2014.
- SYNOWWIECKI, J. Industrial Enzymes: The use of starch processing enzymes in the food industry. Gdansk: Springer. p. 19-33, 2007.
- SZEJTLI, J. Cyclodextrin in food, cosmetic and toiletries. Starch/Stärke. v. 34, n. 11, p. 379-385, 1982.
- TAKAMINE, J. Enzyme of *Aspergillus oryzae* and the Application of its Amylolytic Enzyme to the Fermentation Industry. The journal of industrial and engineering chemistry, v.6, p. 824-828, 1914.
- TILDEN, E.B.; HUDSON, C.S. Preparation and Properties of the Amylases Produced by *Bacillus macerans* and *Bacillus polymyxa*. J Bacteriol. Apr.v. 43, n.4, p. 527-544, 1942.
- VAN DER MAAREL, M.J.E.C.; VAN DER VEEN, B.; UITDEHAAG, J.C.M.; LEEMHUIS, H.; DIJKHUIZEN, I. Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. Journal of Biotechnology, v.94, p. 137-155, 2002.
- VAN DER MAAREL, M.J.E.C., LEEMHUIS, H. Starch modification with microbial alpha-glucanotransferase enzymes. Veendam: Carbohydrate Polymers. v. 93, p. 116-121, 2013.
- VAN DER VEEN, B.A.; UITDEHAAG, J.C.M.; DIJKSTRA, B.W.; DIJKHUIZEN, L. Engineering of cyclodextrin glycosyltransferase reaction and product specificity. Biochimica et Biophysica Acta.v.1543,p.336-360, 2000.
- VIHINEN M.; MÄNTSÄLÄ, P. Microbial amylolytic enzymes. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology, v. 24, p. 329-418, 1989.
- VILLAGRÁN, C.; DEETLEFS, M.; PITNER, W.R.; HARDACRE, C. Quantification of Halide in Ionic Liquids Using Ion Chromatography. Analytical Chemistry, v. 76, n. 7, p. 2118-2123, 2004.
- WANDERLEY, K. J.; TORRES, F. A. G.; MORAES, L. M. P.; ULHOA, C. J. Biochemical characterization of α -amylase from the yeast *Cryptococcus flavus*. FEMS Microbiology Letters, v. 231, p. 165-169, 2004.

- WANG, L. WU, D.; CHEN, J.; WU, J. Enhanced production of γ -cyclodextrin by optimization of reaction of γ -cyclodextrin glycosyltransferase as well as synchronous use of isoamylase. *Food Chemistry*, v. 141, p. 3072-3076, 2013.
- WATSON, J. D.; MYERS, R.M.; CAUDY, A.A.; WITKOWSKI, J.A. DNA Recombinante – Genes e Genomas. Artmed, 3^aed., 2009.
- WENZ, G.; HAN, B.H.; MÜLLER, A. Cyclodextrin Rotaxanes and Polyrotaxanes. *Chemical Reviews*, v. 106, n. 3, p.782-817, 2006.
- WU, J.; GUAN, Y.; ZHONG, Q. Yeast mannoproteins improve thermal stability of anthocyanins at pH 7.0. Knoxville: *Food Chemistry*, v.172, p. 121–128, 2015.
- XIAO, J.; MUZASHVILI, GEORGIEV, M.I. Advances in the biotechnological glycosylation of valuable flavonoids. *Biotechnology Advances*, v.32, p. 1145–1156, 2014.
- XIE, F.; QUAN, S.; LIU, D.; MA, H.; LI, F.; ZHOU, F.; CHEN, G. Purification and characterization of a novel α -amylase from a newly isolated *Bacillus methylotrophicus* strain P11-2. China: *Process Biochemistry*, v. 49,p.47-53, 2014.
- YAN, Q.; ZHANG, L.; ZHANG, X.; LIU, X.; YUAN, F.; HOU, Z.; GAO, Y. Stabilization of grape skin anthocyanins by copigmentation with enzymatically modified isoquercitrin (EMIQ) as a copigment. *Food Research International*, v. 50, p.603–609, 2013.
- YIM, D.G.; SATO, H.H.; PARK, Y.H. Production of cyclodextrin from starch by cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus firmus* and characterization of purified enzyme. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*.v.18, p.402-405, 1997
- ZAR, M.S.; ALI, S.; HAQ, I.U. Optimization of the alpha amylase production from *Bacillus amyloliquefaciens* IIB-14 via parameter significance analysis and response surface methodology. *African Journal of Microbiology Research*, v.6, n.17, p. 3845-3855, 2012.
- ZEEMAN, S.C.; KOSSMANN, J.; SMITH, A.M. Starch: Its Metabolism, Evolution, and Biotechnological Modification in Plants. Zurich: *Annu. Rev. Plant Biol.*, v. 61, p.. 209-234, 2010.

ZHOU, Y.; LEE, Y.S.; PARK, I.H.; SUN, Z.X.; YANG, T.X.; YANG, P.; CHOI, Y.L.; SUN, M. Cyclodextrin glycosyltransferase encoded by a gene of *Paenibacillus azotofixans* YUPP-5 exhibited a new function to hydrolyze polysaccharides with β -1,4 linkage. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 50, p. 151–157, 2012.

ZIMBARDI, A.L.R.L. Produção e caracterização bioquímica de enzimas lignocelulolíticas fúngicas e sua aplicação na sacificação de biomassa lignocelulósica. Ribeirão Preto: USP. Tese, 2014.

VIII. ANEXO I

ENHANCED AMYLASE PRODUCTION WITH OPTIMIZATION OF NUTRITIONAL COMPONENTS BY USING RESPONSE SURFACE METHODOLOGY

Abstract

The industrial starch degradation is usually initiated by α - amylase (α - 1,4-glucan hydrolases) a common enzyme in microorganisms, which can also be extracted from plants. Together with other enzymes that degrade starch (Ex. Pullulanases), α - amylases are included in the family 13 glycosylhydrolases characterized by a conformation (α / β) 8 - barrel. Amylases are important group of industrial enzymes, accounting for approximately 25% of the world enzyme market. Preliminary results indicated a positive direction for the factors soluble starch, yeast extract and $MgSO_4 \cdot 7H_2O$. Keeping other factors the minimum and central conditions, we performed a factorial design compound 2^3 complete with axial points which resulted in the following composition of the culture medium: 2.78% soluble starch, 0,50% yeast extract; 0,30 % peptone; 0,30% K_2HPO_4 ; 0,06% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ and 0,05% $(NH_4)_2SO_4$ with mean α amylase activity of 3796 UmL^{-1} , which resulted in a 3 fold increase in enzyme activity relation to the not optimized. The significant of this study labor embodiment lies on the that fact yeast extract, the source of nitrogen that often is the most expensive is not significant for the improvement of amylase production.

VIII.1. INTRODUCTION

Starch is one of the most abundant storage polymer in nature and is a feature at several industrial processes including the production of biological materials for foods, due to an the functionality as thickening, emulsion stabilizing agent oil substitute [1], textile industry, detergents and biofuels [2,3]. Considered the largest component of many agricultural products, for example corn, potato, rice and wheat, this material is deposited in cells reserve on plants by organisms in the form of granules which are insoluble in cold water and crumble when heated [3]. Usually, starch consists of about 20% amylose, a linear polymer of glucose

residues in α -1,4 bonds, and 80% amylopectin, a branched polymer of glucose residues linked by α -1,4 bond and 5% α -1,6-glycosidic linkages [3,4,5].

The industrial starch degradation is usually initiated by α -amylase (α -1,4-glucan hydrolases) a common enzyme in microorganisms, which can also be extracted from plants [6]. Together with other enzymes that degrade starch (Ex. Pullulanases), α -amylases are included in the family 13 glycosylhydrolases characterized by a conformation $(\alpha/\beta)_8$ -barrel [1,7]. Amylases are important group of industrial enzymes, accounting for approximately 25% of the world enzyme market [8].

Applications are found amylases find in industries textile, pulp and paper, leather, detergents, beers, spirits, bakery, cereal for babies, liquefaction and scarification of starch, animal feed, fermentation industry (vitamins, amino acids antibiotics), chemical and pharmaceutical industry [7,9,10,11], and then classified with the pioneer in terms of commercial utilization [7].

In the early twentieth century began the production of amylase due to the industrial interests of glucose production from amylolytic materials. Takamine was credited with to have developed in the 19th century the first method of microbiological production in large-scale enzyme - the α -amylase fungal Takadiastase [10,12].

The production of α -amylase by submerged fermentation (SmF) and solid state fermentation (SSF) has been thoroughly investigated and is affected by a variety of physicochemical factors including a medium composition growth, medium pH, phosphate concentration, age of inoculum, temperature, aeration, source of carbon and nitrogen sources [9, 13, 14, 15]. Among those one of the most nitrogen sources used include soy flour, yeast extract, peptone and meat extract [15,16].

In recent years enzymes use has increased significantly in recent years and the high price is still a major concern to industrial applications [17,18]. The latest research done in 2009 indicated that the total enzymes market was 5.1 billion dollars [5,19]. Thus, reducing cost and time of enzyme production and maximizing through optimizing the medium fermentation and process with the

primary goal of economy in industrial applications. Statistical models for optimization have been successfully used in enzymes production in the global survey [17]. The advantages of the experimental design include reducing the number of experiments or replicates and improving the quality of information obtained through the results. This means that a considerable reduction of labor and consequently, time and final cost [20].

Considering these facts, it is proposed in this study to improve amylase by A-1.2 isolated microorganism from the Brazilian Cerrado, by optimizing nutritional components of the medium using the response surface methodology.

VIII.2. MATERIAL AND METHODS

VIII.2.1. Microorganism

The bacterium A-1.2 were selected from Brazilian Cerrado areas and stored in Potato Dextrose Agar (PDA) at 35 ° C.

VIII.2.2. Production Medium Condition of enzymes

Submerged fermentation was used for the production of amylases A-1.2 microbial strain and gave in 125 mL Erlenmeyer flasks at 30 ° C, 120 rpm with 20 mL of the nutrient medium for 72h. The enzymatic production profile was analyzed over time, up to 120 hours with sampling every 24 hours. The enzyme assay was performed on crude enzyme solution, which was obtained by centrifugation at 10,000 g for 10 min, then stored under refrigeration.

VIII.2.3. Enzymatic assays

Amylase activity (1,4- α -D-glucan hydrolase, EC 3.2.1.1) was analyzed using the methods described by Dextrinizing Fuwa (1954) [21] and Ponsawasdi e Yagisawa (1987) [22] with some modifications and by determination of reducing sugar Somogyi-Nelson method.

On the method Dextrinizing the reaction mixture consisted of 0.1 mL of a diluted enzyme solution, which was added to 0,3 mL of soluble starch at 0,5% solution in acetate buffer at 0,1M, pH 5,5 incubated at 50 ° C for 10 minutes. The reaction was stopped by adding 4,0 mL of 0.2 M HCl solution then the reaction

received 0,5 mL of iodine reagent (0,30% 0,03% KI and I₂), and 10 mL of distilled water. The absorbance was determined at 700 nm in a spectrophotometer. One unit of activity was defined as the amount of enzyme required to reduce by 10% the intensity of the blue color of starch-iodine complex per minute. For Somogyi-Nelson method the reaction mixture consisted of 0,1 mL of the enzyme solution diluted, to which was added 0,4 mL of soluble starch at 0,5% solution in acetate buffer at pH 5,0 (0,1M) incubated at 50 ° C for 10 minutes. The reaction was stopped with 0,5 mL of reagent I and incubated on ice followed by incubation in a boiling water bath at 100 ° C for 10 minutes cooled on an ice bath for 5 minutes. Therefore was added 0,5 mL of reagent II and mixed until homogenization. Thereafter was added 3,5 mL of water and after homogenization was determined by spectrophotometer read at 540 nm. One unit of amylase activity was defined as the amount of enzyme capable of releasing 1 mmol or (1 µg glucose) glucose per minute under the reaction conditions, using standard glucose curve.

VIII.2.4. Experimental design and optimization of nutrient content

This process was chosen for this study of optimizing production, applying an experimental design. The concentrations was examined in medium production proposed by Gomes et al. (2005) [23], which is widely used in the literature for the cultivation of various microorganisms. The experimental design adopted to verify the influence of the components of the means of production, was 2⁶⁻¹ factorial design with three trials at the center point. The medium components (factors) to be analyzed were substrate, peptone, yeast extract, K₂HPO₄, MgSO₄.7H₂O, (NH₄)₂SO₄ concentration. Fermentations were carried out using production medium in the composition proposed by Gomes et al. (2005) [23], in order to establish a reliable comparison with other media tested. Table VIII.1 shows the levels -1, 0 and +1 correspond to the minimum values, and maximum central to each of the factors studied.

Table VIII.1 - Factors and values of levels analyzed in factorial design 2^{6-1} with three trials at the center point.

Factors	Minimum (-1)	Center (0)	Maximum (+1)
X ₁ - Substrate (%)	0,50	1,25	2,00
X ₂ - Yeast extract (%)	0,10	0,30	0,50
X ₃ - Peptone (%)	0,10	0,30	0,50
X ₄ - K ₂ HPO ₄ (%)	0,10	0,30	0,50
X ₅ - MgSO ₄ .7H ₂ O (%)	0	0,025	0,05
X ₆ - (NH ₄) ₂ SO ₄ (%)	0,05	0,10	0,15

The factorial design 2^{6-1} with three trials at the midpoint aimed to determine, quantitatively which factors had the greatest effect on enzyme amylase production, and possible interactions between them. The experimental data were statistically analyzed according to pre-established schedules, to check the level of the effects of the factors and their interactions. Statistical data analyzes were performed by the software "STATISTICA® for Windows" version 5.0, using "Experimental Design".

VIII.3. RESULTS AND DISCUSSION

VIII.3.1. The 2^{6-1} factorial design with three trials at the midpoint

The results analysis of the factorial design with three trials 2^{6-1} at the midpoint of the line A-1.2 are presented on Table VIII.2 to VIII.9 and Figures VIII.1 to VIII.4. Were obtained on replicates from each factorial design.

Table VIII.2 - Production of amylase Brews, referring to the 2^{6-1} factorial design with three trials at the midpoint.

N°	Encoded Factors						Assays						Activity Dextrinizing(UmL ⁻¹)	Activity α -amylase (Uml ⁻¹)
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	Soluble Starch	Yeast Extract	Pepton	Uncoded Factors(%)				
										K ₂ HPO ₄	MgSO ₄	(NH ₄) ₂ SO ₄ (%)		
1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	2,00	0,50	0,50	0,50	0,05	0,15	136,94	300,32
2	+1	+1	+1	+1	-1	-1	2,00	0,50	0,50	0,50	0,00	0,05	54,89	98,47
3	+1	+1	+1	-1	+1	-1	2,00	0,50	0,50	0,10	0,05	0,05	147,54	357,53
4	+1	+1	+1	-1	-1	+1	2,00	0,50	0,50	0,10	0,00	0,15	37,5	110,56
5	+1	+1	-1	+1	+1	-1	2,00	0,50	0,10	0,50	0,05	0,05	163,14	409,16
6	+1	+1	-1	+1	-1	+1	2,00	0,50	0,10	0,50	0,00	0,15	45,14	108,82
7	+1	+1	-1	-1	+1	+1	2,00	0,50	0,10	0,10	0,05	0,15	91,3	163,58
8	+1	+1	-1	-1	-1	-1	2,00	0,50	0,10	0,10	0,00	0,05	45,65	64,98
9	+1	-1	+1	+1	+1	-1	2,00	0,10	0,50	0,50	0,05	0,05	87,35	213,35
10	+1	-1	+1	+1	-1	+1	2,00	0,10	0,50	0,50	0,00	0,15	42,86	102,65
11	+1	-1	+1	-1	+1	+1	2,00	0,10	0,50	0,10	0,05	0,15	93,16	102,49
12	+1	-1	+1	-1	-1	-1	2,00	0,10	0,50	0,10	0,00	0,05	38,89	75,67
13	+1	-1	-1	+1	+1	+1	2,00	0,10	0,10	+1	0,05	0,15	38,16	163,19
14	+1	-1	-1	+1	-1	-1	2,00	0,10	0,10	0,50	0,00	0,05	47,18	79,23
15	+1	-1	-1	-1	+1	-1	2,00	0,10	0,10	0,10	0,05	0,05	35,52	96,67
16	+1	-1	-1	-1	-1	+1	2,00	0,10	0,10	0,10	0,00	0,15	24,35	94,28
17	-1	+1	+1	+1	+1	-1	0,50	0,50	0,50	0,50	0,05	0,05	33,45	36,91
18	-1	+1	+1	+1	-1	+1	0,50	0,50	0,50	0,50	0,00	0,15	32,98	63,42
19	-1	+1	+1	-1	+1	+1	0,50	0,50	0,50	0,10	0,05	0,15	34,57	83,65
20	-1	+1	+1	-1	-1	-1	0,50	0,50	0,50	0,10	0,00	0,05	23,49	54,8
21	-1	+1	-1	+1	+1	+	0,50	0,50	0,10	0,50	0,05	0,15	37,11	73,19
22	-1	+1	-1	+1	-1	-1	0,50	0,50	0,10	0,50	0,00	0,05	27,24	73,19
23	-1	+1	-1	-1	+1	-1	0,50	0,50	0,10	0,10	0,05	0,05	33,08	67,14
24	-1	+1	-1	-1	-1	+1	0,50	0,50	0,10	0,10	0,00	0,10	29,92	75,98
25	-1	-1	+1	+1	+1	+1	0,50	0,10	0,50	0,50	0,05	0,15	35,49	83,19
26	-1	-1	+1	+1	-1	-1	0,50	0,10	0,50	0,50	0,00	0,05	35,58	71,33
27	-1	-1	+1	-1	+1	-1	0,50	0,10	0,50	0,10	0,05	0,05	32,84	50,4
28	-1	-1	+1	-1	-1	+1	0,50	0,10	0,50	0,10	0,00	0,15	18,02	54,81
29	-1	-1	-1	+1	+1	-1	0,50	0,10	0,10	0,50	0,05	0,05	26,92	62,72
30	-1	-1	-1	+1	-1	+1	0,50	0,10	0,10	0,50	0,00	0,15	35,35	28,77
31	-1	-1	-1	-1	+1	+1	0,50	0,10	0,10	0,10	0,05	0,15	28,17	65,74
32	-1	-1	-1	-1	-1	-1	0,50	0,10	0,10	0,10	0,00	0,05	27,62	29,23
33	0	0	0	0	0	0	1,25	0,30	0,30	0,30	0,025	0,10	52,36	86,21
34	0	0	0	0	0	0	1,25	0,30	0,30	0,30	0,025	0,10	53,47	84,35
35	0	0	0	0	0	0	1,25	0,30	0,30	0,30	0,025	0,10	52,78	67,37

The matrix of 2^{6-1} factorial design with center point in the three tests is presented on Table VIII.2 along with the results where that the tests with media at a higher concentration of the carbon source resulted on higher enzyme production, such as assays 5, 3, 1 and 9, for both amylolytic activities. However, other tests with both the 'maximum' concentration as 'minimum' nutrients concentration, showed low amylolytic activity, compared to the tests above. This may indicate that not all nutrients studied have high significance in the enzymatic activity.

In Table VIII.3, the effects and the regression coefficients are presented. These analyzes were performed for the main factors, the interaction between two factors, based on the enzymatic activity measured by the Somogyi - Nelson method (Table VIII.2).

To decide whether these effects were significantly different from zero, was used the "Student" t test at a significance level of 5 % ($p < 0.05$). At 95 % confidence, the t value was 2.16 found to thirteen degrees of freedom. Were considered statistically significant effect whose absolute value exceeded the tabulated t value ($t_{13, 0.95} = 2.16$). In Table VIII.3, the effects of the main factors soluble starch, yeast extract and $MgSO_4$, and the interaction effects of soluble starch vs. yeast extract and soluble starch vs. $MgSO_4$, were significant.

The Pareto chart (Figure VIII.1) shows the t values in descending order for each of the analyzed effects, and confirms the results presented in Table VIII.3.

The same touchstones were adopted to assess the significance of the effects of the factors for the regression analysis. Applying the values of estimated coefficients, gave the following linear model:

$$y = 107,24 + 48,95X_1 + 23,99X_2 + 6,36X_3 + 13,14X_4 + 35,72 X_5 - 5,19X_6 + 18,86 X_1X_2 + 31,26 X_1X_5$$

Where:

y: estimated production of α -amylase;

X_1 : encoded factor for soluble starch;

X_2 : encoded factor for yeast extract;

X_3 : encoded factor for peptone;

X_4 : encoded factor for K_2HPO_4 ;

X_5 : encoded factor for $MgSO_4 \cdot 7H_2O$;

X_6 : encoded factor for $(NH_4)_2SO_4$;

Table VIII.3 - Estimated effects and regression analysis calculated for the 2^{6-1} factorial design with three central points.

	Effect	Standard Error	$t_{(13)}$	p	Confidence Interval -95,%	Confidence Interval 95,%	Coefficient Regression	Coefficient Standard Error	Confidence Interval -95,%	Confidence Interval 95,%
Factors/Interactions	107,24	9,27	11,57	*0,00	87,21	127,27	107,24	9,27	87,21	127,27
(X ₁)Soluble starch*	97,90	19,39	19,39	*0,00	56,01	139,80	48,95	9,70	28,01	69,90
(X ₂)Yeast Extract*	48,00	19,39	2,47	*0,03	6,11	89,89	24,00	9,70	3,05	44,95
(X ₃)Peptone	12,73	19,39	0,66	0,52	-29,16	54,62	6,37	9,70	-14,58	27,31
(X ₄)K ₂ HPO ₄	26,27	19,39	1,35	0,20	-15,62	68,17	13,14	9,70	-7,81	34,08
(X ₅)MgSO ₄ *	71,44	19,39	3,68	*0,00	29,55	113,33	35,72	9,70	14,77	56,67
(X ₆)(NH ₄) ₂ SO ₄	-10,38	19,39	-0,53	0,60	-52,28	31,51	-5,19	9,70	-26,14	15,75
X ₁ / X ₂ *	37,74	19,39	1,95	*0,07	-4,15	79,63	18,87	9,70	-2,08	39,81
X ₁ / X ₃	9,91	19,39	0,51	0,62	-31,98	51,80	4,96	9,70	-15,99	25,90
X ₁ / X ₄	24,90	19,39	1,28	0,22	-16,99	66,80	12,45	9,70	-8,49	33,40
X ₁ / X ₅ *	62,51	19,39	3,22	*0,01	20,62	104,41	31,26	9,70	10,31	52,20
X ₁ / X ₆	-20,76	19,39	-1,07	0,30	-62,65	21,13	-10,38	9,70	-31,33	10,56
X ₂ / X ₃	-4,03	19,39	-0,21	0,84	-45,92	37,86	-2,01	9,70	-22,96	18,93
X ₂ / X ₄	-3,12	19,39	-0,16	0,87	-45,01	38,77	-1,56	9,70	-22,50	19,39
X ₂ / X ₅	33,72	19,39	1,74	0,10	-8,17	75,61	16,86	9,70	-4,09	37,80
X ₂ / X ₆	-12,45	19,39	-0,64	0,53	-54,34	29,44	-6,22	9,70	-27,17	14,72
X ₃ / X ₄	-16,31	19,39	-0,84	0,41	-58,20	25,58	-8,15	9,70	-29,10	12,79
X ₃ / X ₅	3,08	19,39	0,16	0,88	-38,82	44,97	1,54	9,70	-19,41	22,48
X ₃ / X ₆	3,21	19,39	0,16	0,87	-38,68	45,10	1,61	9,70	-19,34	22,55
X ₄ / X ₅	18,08	19,39	0,93	0,37	-23,81	59,97	9,04	9,70	-11,91	29,99
X ₄ / X ₆	-4,72	19,39	-0,24	0,81	-46,61	37,17	-2,36	9,70	-23,30	18,59
X ₅ / X ₆	-21,93	19,39	-1,13	0,28	-63,82	19,96	-10,97	9,70	-31,91	9,98

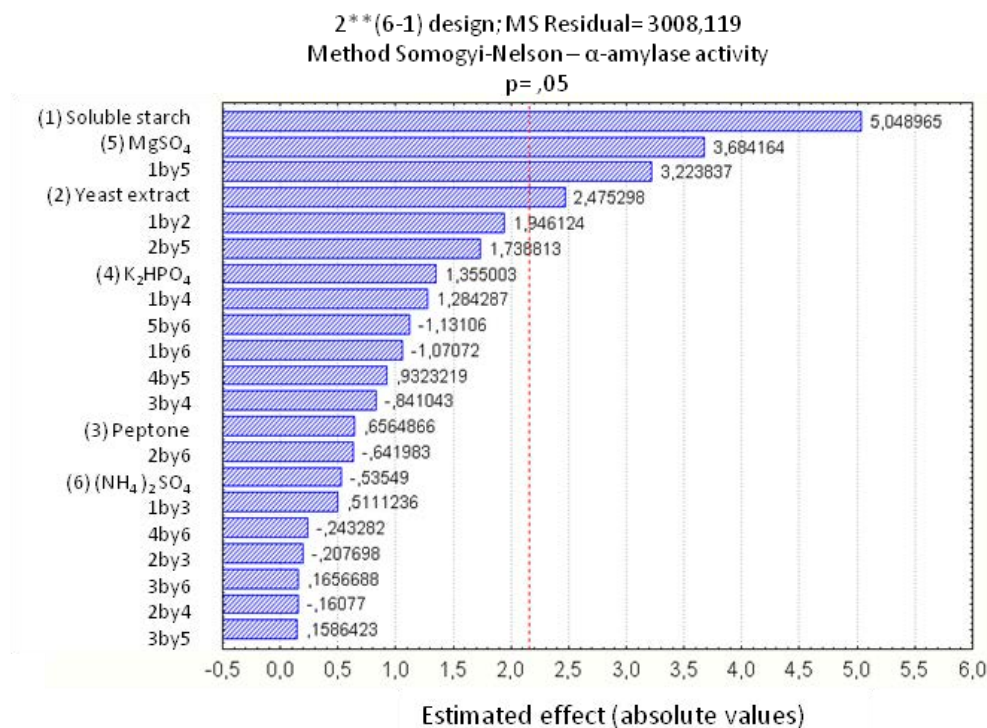
* Significant variables; $t_{(13)}$ = test t "Student"; p = level for significance

In the contour plots, generated by the program indicate the direction of this factor to the increase in the concentrations of soluble starch, yeast extract and $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, which was significant, with a positive effect.

Table VIII.4 shows the results from the variance analysis of the linear fit model. The regression model adjusted was considered statistically significant by the present F value equal to 2.45, greater than the tabulated F value of 95 % confidence $F_{0, 95, 6, 28} = 2.45$, can be stated that the amount of variation due to the model was greater than the unexplained variation.

Thus, one can say that the fitted model explains 84.61 % of the variations of answers found. As the experimental data in Table VII.4, the main factors were significant soluble starch (X_1), yeast extract (X_2) and $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (X_5), and interactions X_1/X_2 , X_1/X_5 e X_2/X_5 .

Figure VIII.1 - Main interactions between factors in the factorial design 2^{6-1} with three trials at the midpoint effects, based on the t test “student” $t_{(13; 0, 95)} = 2, 16$. Pareto chart of the standardized effects.



Source: Authors own.

Table VIII.4 - Analysis of variance for the linear fit to the results of the factorial design 2^{6-1} with three trials at the midpoint model.

Sources of variation	Sum Quadratic	Dereess os Freedom	Mean Quadratic	F Value
(X ₁) Solubel starch*	76683,1	1	76683,11	25,49*
(X ₂)Yeast Extract*	18431,0	1	18431,04	6,13*
(X ₃)Peptone	1296,4	1	1296,42	0,43
(X ₄)K ₂ HPO ₄	5523,0	1	5523,01	1,84
(X ₅)MgSO ₄ *7H ₂ O*	40829,4	1	40829,39	13,57*
(X ₆)(NH ₄) ₂ SO ₄	862,6	1	862,58	0,29
X ₁ / X ₂ *	11393,0	1	11392,95	3,79*
X ₁ / X ₃	785,9	1	785,86	0,26
X ₁ / X ₄	4961,6	1	4961,57	1,65
X ₁ / X ₅ *	31263,8	1	31263,75	10,39*
X ₁ / X ₆	3448,7	1	3448,65	1,15
X ₂ / X ₃	129,8	1	129,77	0,04
X ₂ / X ₄	77,8	1	77,75	0,02
X ₂ / X ₅ *	9095,0	1	9094,96	3,02*
X ₂ / X ₆	1239,8	1	1239,77	0,41
X ₃ / X ₄	2127,8	1	2127,80	0,71
X ₃ / X ₅	75,7	1	75,71	0,02
X ₃ / X ₆	82,6	1	82,56	0,03
X ₄ / X ₅	2614,7	1	2614,73	0,87
X ₄ / X ₆	178,0	1	178,04	0,06
X ₅ / X ₆	3848,3	1	3848,28	1,28
Error	39105,5	13	3008,12	
Total	254053,2	34		

VIII.3.2. Shift toward the maximum upslope “steepest ascent”

The displacement always occurs along the path of maximum slope of a particular model, which is the path where the response varies more markedly. It follows that the linear model, adjusted by the results of the 2^{6-1} factorial design with three trials at midpoint, was significant. However, the region of optimal enzyme production was not achieved. Then, a shift was made towards maximum ascending to establish a new area of study and a new central point slope. In algebraic terms, the trajectory of maximum upslope (“steepest ascent”) can be determined from the regression coefficients of the fitted model, starting from the center point. To their respective midpoints of the first factor values against the

concentrations of peptone, K_2HPO_4 and $(NH_4)_2SO_4$ in the previous phase, are less influential variables studied the responses remained.

The factors studied were represented by X_1 (soluble starch), X_2 (yeast extract), X_5 ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) and their original values to the points of maximum slope upward, were determined according to the equations:

$$X_1 = (\text{soluble starch} - 1,25) \div 0,75$$

$$X_2 = (\text{extract} - 0,3) \div 0,2$$

$$X_5 = (MgSO_4 \cdot 7H_2O - 0,025) \div 0,025$$

When applying the above equations the values encoded afforded the original values for each of the factors, which are shown on Table VIII.5 together with obtained for the enzymatic activity at this stage.

Table VIII.5 - Mother with points toward the maximum upslope "steepest ascent".

Assays N°	Encoded Factors			Uncoded Factors(%)			Activity Dextrinizing (U/mL ⁻¹)	Activity α -amylase (U/mL ⁻¹)
	X_1	X_2	X_5	Soluble Starch	Yeast Extract	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$		
36	2,04	1,00	1,49	2,78	0,50	0,06	82,44	133,82
37	3,06	1,50	2,24	3,55	0,60	0,80	61,15	132,89
38	4,08	2,00	2,98	4,31	0,70	0,10	68,69	108,00
39	5,10	2,50	3,73	5,08	0,80	0,12	53,47	64,05
40	6,12	3,00	4,47	5,84	0,90	0,14	45,24	58,24

Five trials were performed in the direction of maximum slope upward. It is noted in this table that the highest values were achieved in the tests 36, 37 and 38, with mean value of 70,76 U/mL and 124,9 U/mL for α -amylase and dextrinizing activities respectively. From these results obtained on Table VIII.5 it was determined assay 36 as the central point.

VIII.3.3. Factorial design comprised 2^3 complete with axial points

Based on the concentrations of the previous experiment, were performed a full factorial design compound 2^3 , including 6 axial points and three replicates at the center point, totaling 17 trials. Table VIII.6 shows the values used in the planning and results of enzymatic activity.

Table VIII.6. Amylase production of fermentation, referring to the 2^3 factorial designs with six axial points and three tests at the midpoint.

N°	Ensaio							
	Encoded Factor			Uncoded Factors(%)			Activity Dextrinizing (UmL ⁻¹)	Activity α -amylase (UmL ⁻¹)
	X ₁	X ₂	X ₅	Soluble Starch	Yeast Extract	MgSO ₄ .7 H ₂ O		
41	-1	-1	-1	2,01	0,40	0,04	132,53	2133
42	-1	-1	+1	2,01	0,40	0,08	189,36	2020
43*	-1	+1	-1	2,01	0,60	0,04	209,03	3607
44	-1	+1	+1	2,01	0,60	0,08	191,19	2752
45	+1	-1	-1	3,55	0,40	0,04	185,45	1537
46	+1	-1	+1	3,55	0,40	0,08	169,62	2718
47	+1	+1	-1	3,55	0,60	0,04	216,76	2770
48	+1	+1	+1	3,55	0,60	0,08	183,65	2035
49	$-\alpha$	0	0	1,65	0,50	0,06	155,37	1967
50	$+\alpha$	0	0	3,91	0,50	0,06	128,12	2970
51	0	$-\alpha$	0	2,78	0,35	0,06	210,53	1493
52*	0	$+\alpha$	0	2,78	0,65	0,06	208,33	3318
53	0	0	$-\alpha$	2,78	0,50	0,031	197,65	2980
54	0	0	$+\alpha$	2,78	0,50	0,089	192,98	3112
55	0	0	0	2,78	0,50	0,06	220,45	2798
56*	0	0	0	2,78	0,50	0,06	216,95	3872
57*	0	0	0	2,78	0,50	0,06	218,18	3730

Observing the results presented in Table VIII.7, it was noted that the tests with the media which used the center points for the three variables, showed a higher α - amylase activity and dextrinizing (tests 56 and 57). When the minimum concentrations of starch and soluble and MgSO₄.7H₂O extract was used at its maximum concentration (test 43) also provided higher activities. Whereas when using the central points of soluble starch and MgSO₄.7H₂O and axial point yeast extract (test 52), there was also an increased on enzyme activity, however, aiming at reducing the amount of reagents this test will be disregarded. Figure VIII.2 confirms that the optimum range of soluble starch and MgSO₄.7H₂O lies at the focal points.

Table VIII.7 - Estimated effects and regression analysis calculated for compound 2³ full factorial designs, with axial and central points.

	Effect	Standard Error	t ₍₇₎	p	Confiance Interval 95,%	Confiance Interval 95,%	Regression Coefficient	Coefficient Standard Error	Confiance Interval 95,%	Confiance Interval 95,%
Factors/Interacions	3366,22	283,10	11,89	0,00	2696,79	4035,64	3366,22	283,10	2696,79	4035,64
(X ₁) Soluble starch (L)	-16,26	319,45	-0,05	0,96	-771,63	739,11	-8,13	159,72	-385,82	369,56
(X ₁ ²) Soluble starch (Q)	-839,81	421,30	-1,99	0,09	-1836,03	156,41	-419,91	210,65	-918,01	78,20
(X ₂)Yeast Extract(L)*	896,158	319,45	2,81	0,03	140,79	1651,53	448,08	159,72	70,39	825,77
(X ₂ ²) Yeast Extract (Q)	-908,63	421,30	-2,16	0,07	-1904,84	87,59	-454,31	210,65	-952,42	43,80
(X ₅)MgSO ₄ (L)	-58,89	319,45	-0,18	0,86	-814,26	696,48	-29,45	159,72	-407,13	348,24
(X ₅ ²)MgSO ₄ .7H ₂ O (Q)	-208,99	421,30	-0,50	0,64	-1205,21	787,23	-104,50	210,65	-602,60	393,61
X ₁ / X ₂	-414,00	385,69	-1,07	0,32	-1326,01	498,01	-207,00	192,85	-663,01	249,01
X ₁ / X ₅	353,50	385,69	0,92	0,39	-558,51	1265,51	176,75	192,85	-279,26	632,76
X ₂ / X ₅	-664,50	385,69	-1,72	0,13	-1576,51	247,51	-332,25	192,85	-788,26	123,76

*Significant Variables; t₍₇₎: test t "Student" = 2, 37; p: degrees of significance.

Table VIII.8- Analysis of variance for the adjustment of the quadratic model to the results of the factorial design comprised 23 complete with axial and central points.

Sources of variation	Sum Quadratic	Degrees of Freedom	Mean Quadratic	F Value
(X ₁) Soluble starch (L)	771,0	1	771,0	0,002
(X ₁ ²) Soluble starch (Q)	1182184,0	1	1182184,0	3,97
(X ₂)Yeast Extract (L)	2341418,0	1	2341418,0	7,87
(X ₂ ²) Yeast Extract (Q)	1383866,0	1	1383866,0	4,65
(X ₃)MgSO ₄ (L)	10111,0	1	10111,0	0,03
(X ₃ ²)MgSO ₄ .7H ₂ O (Q)	73211,0	1	73211,0	0,25
X ₁ / X ₂	342792,0	1	342792,0	1,15
X ₁ / X ₃	249924,0	1	249924,0	0,84
X ₂ / X ₃	883121,0	1	883121,0	2,97
Error	2082601,0	7	297514,0	
Total SS	8549998,0	16		

L: linear; Q: quadratic, Coefficient of determination = 0, 7564; Tabulated F Value (F_{0,95;6;10}) = 3,22.

At 95 % confidence, the linear factor of yeast extract generated high significant effect, and the quadratic factor of yeast extract, the factors starch soluble linear and quadratic and linear and quadratic extract of yeast showed high negative effect. In other words, the statistically significant factor in enzyme activity was yeast extract. The interaction of soluble starch and $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, keeping the other components at the midpoint was presented a positive effect (Table VIII.7).

The regression adjusted for the quadratic model was considered statistically significant presenting the tabulated F value of 95 % confidence, $F_{0,95,6,10} = 3.22$, it can be stated that the amount of variation due to the model was higher than the unexplained variation (Table VIII.8).

Adjusted quadratic model, shown below, explains 75.65% of the variation of responses found. As presented by Barros Neto et al. (1996) [24], this value is high indicating that the regression model adjusted explains well the experimental data obtained.

$$\hat{y} = 3366,22 - 8,13X_1 - 419,91X_1^2 + 448,08X_2 - 454,31X_2^2 - 29,45X_5 - 104,50 X_5^2 - 207,00 X_1X_2 + 176,75 X_1X_5 - 332,25 X_2X_5$$

Where: \hat{y} : estimated production of α -amylase;

X_1 : encoded factor of soluble starch;

X_2 : encoded factor of yeast extract;

X_5 : encoded factor of $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$;

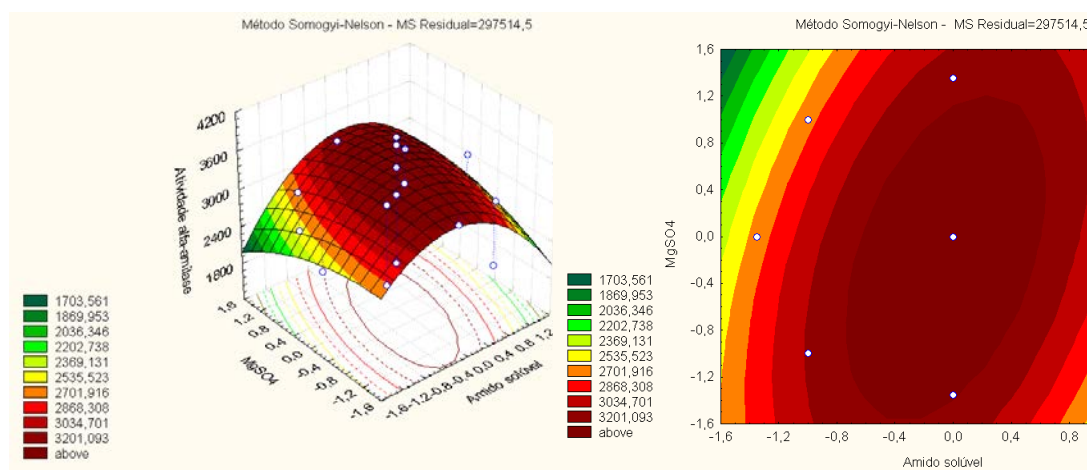
The response surface rendered by the adjusted model confirms that the optimum range of $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ and soluble starch is at the central points (Figure VIII.2).

When the interaction between soluble starch and yeast extract was plotted it was possible to verify through surface response, that to yeast extract the optimal range is slightly above its center while for soluble starch it remains at the center point (Figure VIII.3).

Figure VIII.2 - Response surface demonstrating the interaction between soluble starch and $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ for the 2^3 factorial designs with six axial points and 3 trials at the midpoint.

a) Response surface

b) Contour Chart

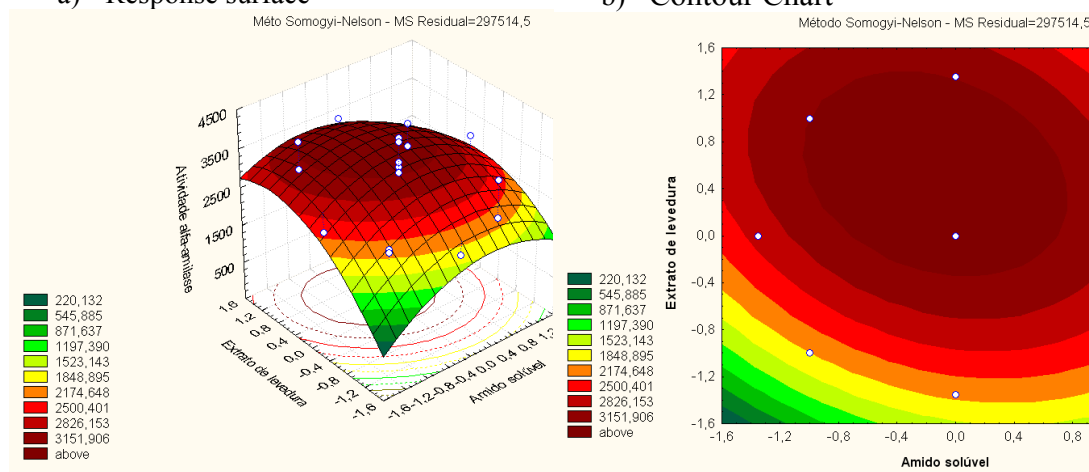


Source: Authors own. Amido solúvel= soluble starch.

Figure VIII.3 - Response surface demonstrating the interaction between soluble starch and yeast extract for 2^3 factorial designs with six axial points and 3 trials at the midpoint.

a) Response surface

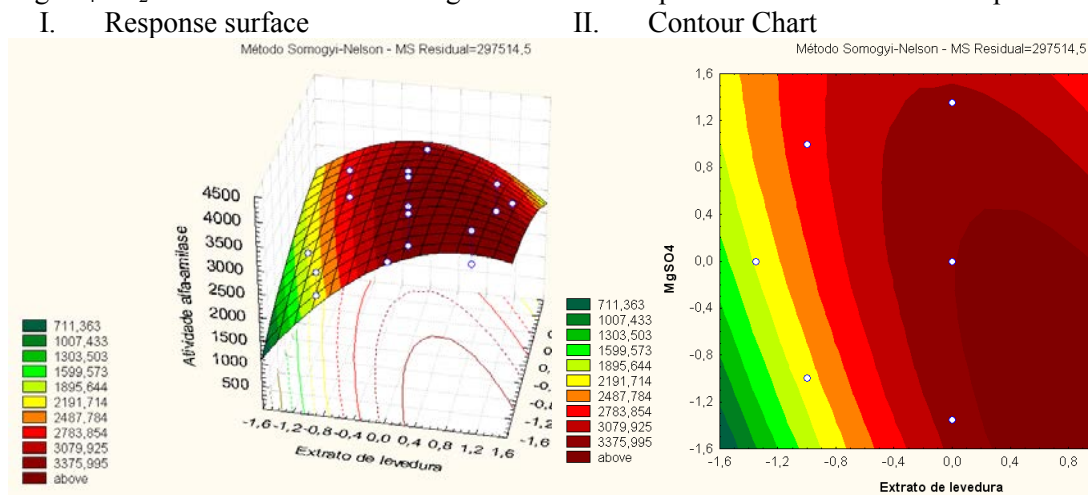
b) Contour Chart



Source: Authors own. Amido solúvel= soluble starch.

The response surface generated by the interaction of yeast extract and $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ shows that the optimal range for yeast extract is shifted to the maximum points, while for the concentration of $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ is moved to the minimum points (Figure VIII.4).

Figure VIII.4 - Response surface demonstrating the interaction between yeast extract and $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ for the 2^3 factorial designs with six axial points and 3 trials at the midpoint.



Source: Authors own. Extrato de levedura= yeast extract.

VIII.3.4. Experimental confirmation of the optimized conditions

Assays were performed in duplicate with the culture medium in optimized concentrations (2.78 % soluble starch , 0.50 % yeast extract , 0.30 % peptone, 0.30 % K_2HPO_4 , 0.06 % $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.05 % (NH_4) $_2\text{SO}_4$) and the original concentrations (1.00 % soluble starch , 0.20 % yeast extract, 0.20% peptone, 0.20% K_2HPO_4 , 0.02 % $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 14 % (NH_4) $_2\text{SO}_4$) before the optimization process.

In one study, the use of increased amounts of many nitrogen sources in the culture medium led to an increase of α amylase expression, and its experimental results clearly show that phosphate and magnesium played an important role in enzyme expression, implying that these minerals may be essential for maintain a continued cultivation, production and enzyme stability [25].

Studies of microbial α -amylase production by fermentation in solid state and submerged performed with experimental activities including optimization of the medium and Plackett-Burman response surface analysis and the results are listed in Table VIII.9.

Table VIII.9- Studies of microbial α -amylase production by fermentation in solid state and submerged performed with experimental activities.

Ferm	Microrganism	Condition optimum	Activity	Authors
	<i>Aspergillus oryzae</i>	Soyabean meal was the best substitute to yeast extract compared to fish powder waste and wheat gluten waste	22118,34 U g^{-1}	Sahnoun et al. (2015) [26]
	<i>Microbacterium foliorum</i> GA2	40% bagasse and 0.003 M lactose	6610 UmL $^{-1}$	Roohi e Kuddus (2014) [27]
SSF	<i>Bacillus megaterium</i> B69	By best utilizing mustard oil seed cake as the substrate at 20% substrate concentration and 45% moisture	1666.6 U g^{-1}	Saxena e Singh, 2014 [28]
	<i>Brevibacterium linens</i>	14,2g wheat bran and 0,4 g (NH ₄) ₂ SO ₄	7600 U g^{-1}	Shabbiri et al. (2012) [29]
	<i>Bacillus</i> sp. KR-8104	Dry fermented substrate was obtained from wheat bran moistened with tap, 1%(NH ₄) ₂ NO ₃ and 1% lactose	140 U g^{-1}	Hashemi et al. (2010) [30]
	<i>Bacillus laterosporus</i>	0.58% yeast extract, 2.44% starch, 2.34% peptone and 0.11% NaCl	4.125 UmL $^{-1}$	Kumar et al. (2013) [31]
	<i>Streptomyces</i> sp	5.00 g% Yeast extract and 0.25 g% CaCl ₂	23.96 UmL $^{-1}$	Cotârleț e Bahrim (2012) [32]
	<i>Streptomyces</i> sp. ML12	5.5 g/100 mL rice bran, 5.3 g/100 mL wheat bran , 2.8 g/100 mL NaCl and 1.4 g/100 mL Mg SO ₄	42.412 UmL $^{-1}$	Sivakumar et al. (2012) [33]
	<i>Bacillus subtilis</i> IP 5832	2 % peptone and 0.5 % starch	1.55 UmL $^{-1}$	Božić et al. (2011) [34]
SbF	<i>Bacillus acidicola</i> TSAS1	2,75%), starch and 0,01% K ₂ HPO ₄	10,100 IU/l	Sharma e Satyanarayana (2011) [5]
	<i>Bacillus</i> sp.	1 % wheat bran , 1% soybean meal and 0.3% CaCO ₃	515.30 UmL $^{-1}$	Zambare (2011) [35]
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	12.5% substrate concentration (wheat bran and groundnut oil cake-1:1) and 0.0275 M CaCl ₂	949.88 UmL $^{-1}$	Gangadharan et al. (2008) [36]
	<i>Aspergillus oryzae</i> CBS	0,25% Soyabean meal , 0,50% casein acid, 0,25% glycerol, 0,50% uréia, 0,20% K ₂ HPO ₄ , 0,10% (NH ₄) ₂ SO ₄ and 0,10% SO ₄ .7H ₂ O.	148 UmL $^{-1}$	Kammoun et al. (2008) [25]
	<i>Bacillus</i> sp. PS-7	Wheat bran with 1% Tween-40 and 1 mM MgSO ₄ .7H ₂ O, 1,0%, glicerol, 1,0% Soyabean meal	4,64,000 U g^{-1}	Sodhi et al. (2005) [37]

Solid State Fermentation (SSF). Sumerged Fermentation (SbF).

Preliminary results indicated a positive direction for the factors soluble starch, yeast extract and $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Keeping other factors the minimum and central conditions, we performed a factorial design compound 2^3 complete with axial points which resulted in the following composition of the culture medium: 2.78% soluble starch, 0,50% yeast extract; 0,30 % peptone; 0,30% K_2HPO_4 ; 0,06% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,05% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ with mean α amylase activity of 3796 UmL^{-1} , which resulted in a 3 fold increase in enzyme activity relation to the not optimized.

The result obtained on this study shows an significant improvement in the production of α amylase to as much as 3 times comparing to for initial production by the Somogyi-Nelson method and 1.5 times the Dextrinizing method. The average values of amylase activity was 575.15 UmL^{-1} for optimal medium and 196, 0 UmL^{-1} for non-optimized conditions. This value was lower than predicted by the model adjusted 3366.0 UmL^{-1} . New tests will be carried out oncei may have been a problem during the fermentation process which did not reproduce the previously observed activity levels. Furthermore, these results were similar to those described in the literature since the increase in enzyme activity was between 2 to 3 times whan compared to a non-optimized. Unlike the aforementioned authors it was used an alternative carbon souce was used an alternative carbon source. The significant of this study labor embodiment lies on the that fact yeast extract, the source of nitrogen that often is the most expensive is not significant for the improvement of amylase production.

VIII.4. ACKNOWLEDGEMENTS

This study was financially supported by FAPESP and CAPES.

VIII.5. REFERENCES

- [1] Synowwiecki, J. Industrial Enzymes: The use os starch processing enzymes in the food industry. Gdansk: Springer; 2007. p. 19-33.
- [2] Roy, J.K.; Borah,A.; Mahanta, C.L.; Mukherjee, A.K. Cloning and overexpression of raw starch digesting α -amylase gene from *Bacillus subtilis*

- strain AS01a in *Escherichia coli* and application of the purified recombinant α -amylase (AmyBS-I) in raw starch digestion and baking industry. Assam: Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic; 2013. p.118– 129.
- [3] van der Maarel, M.J.E.C., Leemhuis, H. Starch modification with microbial alpha-glucanotransferase enzymes. Veendam:Carbohydrate Polymers; 2013 p. 116– 121.
- [4] Zeeman, S.C.; Kossmann, J.; Smith, A.M. Starch: Its Metabolism, Evolution, and Biotechnological Modification in Plants. Zurich: Annu. Rev. Plant Biol., 2010. P. 209-234.
- [5] Sharma, A.; Satyanarayana, T. Microbial acid-stable α -amylases: Characteristics, genetic engineering and applications. New Delhi: Process Biochemistry, 2013. P. 201–211.
- [6] Amid, M.; Manap, M.Y.A.; Zohdi, N. Optimization of Processing Parameters for Extraction of Amylase Enzyme from Dragon (*Hylocereus polyrhizus*) Peel Using Response Surface Methodology. Serdang, Selangor: Hindawi Publishing Corporation The Scientific World Journal, 2014. p.1-12.
- [7] Emtenani, S.; Asoodeha, A.; Emtenani, S. Gene cloning and characterization of a thermostable organic-tolerant α -amylase from *Bacillus subtilis*. Mashhad, :International Journal of Biological Macromolecules, 2015.p.290–298.
- [8] Wu, J.; Guan, Y.; Zhong, Q. Yeast mannoproteins improve thermal stability of anthocyanins at pH 7.0. Knoxville: Food Chemistry, 2015. p. 121–128.
- [9] Gupta, R.; Gigras, P.; Mohapatra, H.; Goswami, V. K.; Chauhan, B. Microbial a-amylases: a biotechnological perspective. New Delhi: Process Biochemistry, 2003. p. 1599-1616.
- [10] Pandey, A.; Webb, C.; Soccol, C. R.; Larroche, C. Enzyme Technology. New Delhi: Asiatech Publishers, 2005.p. 760.
- [11] Xie, F.; Quan, S.; Liu, D.; Ma, H.; Li, F.; Zhou, F.; Chen, G. Purification and characterization of a novel α -amylase from a newly isolated *Bacillus methylotrophicus* strain P11-2. China: Process Biochemistry, 2014.p.47-53.

- [12] Takamine, J. Enzyme of *Aspergillus oryzae* and the Application of its Amylolytic Enzyme to the Fermentation Industry. New York: The Journal of Industrial and Engineering Chemistry, 1914.p. 824-828.
- [13] Vihinen M.; Mäntsälä, P. Microbial amylolytic enzymes. Turku: Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology, 1989.p. 329-418.
- [14] Ghasemi, Y.; Rasoul-Amini, S.; Ebrahimezhad, A.; Zarnini, G. Halotolerant Amylase Production by a Novel Bacterial Strain, *Rheinheimera aquimaris*. Shiraz: Research Journal of Microbiology. 2010, p.144-149.
- [15] Nwagu, T.N.; Okolo, B.N. Extracellular Amylase Production of a Thermotolerant *Fusarium* sp. Isolated from Eastern Nigerian soil. Nsukka: Brazilian Archives of Biology and Technology, 2011.p.649-658.
- [16] Oliveira, A. N.; Oliveira, L.A.; Andrade, J.S.; Chagas-Júnior, A.F. *Rhizobia* Amylase Production Using Various Starchy Substances As Carbon Substrates. Manaus: Brazilian Journal of Microbiology , 2007.p.208-216.
- [17] Maciel, G.M.; Vandenberghe, L.P.S.; Haminiuk, C.W.I.; Fendrich, R.C.; Bianca, B.E.D.; Brandalize, T.Q.S.; Pandey, A.; Soccol, C.R. Xylanase Production by *Aspergillus niger* LPB 326 in Solid-State Fermentation Using Statistical Experimental Designs. Curitiba: Food Technol. Biotechnol, 2008.p. 183–189.
- [18] Silva, C.A.A.; Lacerda, M.P.F.; Leite, R.S.R.; Fonseca, G.G. Production of enzymes from *Lichtheimia ramosa* using Brazilian savannah fruit wastes as substrate on solid state bioprocesses. Valparaíso: Electronic Journal of Biotechnology, 2013.p.1-9.
- [19] Sanchez, S.; Demain, A.L. Enzymes and Bioconversions of Industrial, Pharmaceutical, and Biotechnological Significance. New Jersey: Organic Process Research & Development, 2011.p. 224–230.
- [20] Rodrigues, M.I.; Iemma, A.F. Planejamento de experimentos e Otimização de processos. Campinas: Casa do Espírito Amigo Fraternidade Fé e Amor, 2009.p.1-6.
- [21] Fuwa, H. A new method for microdetermination of amylase activity by the use of amylase as the substrate. Osaka: Journal of Biochemistry, 1954.p. 583-603.

- [22] Pongsawasdi, P.; Yagisawa, M. Screening and indentification of a cyclomaltodextrin glucanotransferase-producing bacteria. Ibaraki: Journal Fermentation Technology, 1987, p. 463-467.
- [23] Gomes, E; Souza, S.R.; Grandi, R.P.; Silva, R. Production of thermostable glucoamylase by newly isolated *Aspergillus flavus* A1.1 and *Thermomyces lanuginosus* A13.37. São José do Rio Preto: Brazilian Journal of Microbiology, 2005.p. 75-82.
- [24] Barros Neto, B.; Scarminio, I. S; Bruns, R. E. Planejamento e Otimização de Experimentos. Campinas: Editora da UNICAMP, 1996.
- [25] Kammoun, R., Naili, B.; Bejar, S. Application of a statistical design to the optimization of parameters and culture medium for α -amylase production by *Aspergillus oryzae* CBS 819.72 grown on gruel (wheat grinding by-product). Sfax: Bioresource Technology, 2008.p. 5602–5609.
- [26] Sahnoun, M.; Kriaa, M.; Eigharbi, F.; Ayadi, D.Z.; Bejar, S. *Aspergillus oryzae* S2 alpha-amylase production under solid state fermentation: Optimization of culture conditions. Sfax: International Journal of Biological Macromolecules, 2015.p.1-8.
- [27] Roohi; Kuddus, M. Bio-statistical approach for optimization of cold-active α -amylase production by novel psychrotolerant *M. foliorum* GA2 in solid state fermentation. Lucknow: Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2014.p.175–181.
- [28] Saxena. R.; Singh, R. Contemporaneous Production of Amylase and Protease through CCD Response Surface Methodology by Newly Isolated *Bacillus megaterium* Strain B69. India: Hindawi Publishing Corporation-Enzyme Research, 2014.p. 1-12.
- [29] Shabbiri, K.; Adnan,A.; Noor,B.; Jamil,S.; Optimized production, purification and characterization of alpha-amylase by *Brevibacterium linens* DSM 20158 using bio-statistical approach. Annals of Microbiology, 2012.p.523–532.
- [30] Hashemi, M.; Razavi, S.H.; Shojaosadati, S.A.; Mousavi, S.M.; Khajeh, K.; Safari, M. Development of a solid-state fermentation process for production of an

- alpha amylase with potentially interesting properties. Karaj: Journal of Bioscience and Bioengineering, 2010.p. 333–337.
- [31] Kumar, N.M.; Karthikeyan, S.; Jayaraman, G. Thermostable alpha-amylase enzyme production from *Bacillus laterosporus*: Statistical optimization, purification and characterization. Vellore: Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2013.p. 38–44.
- [32] Cotârlet, M.; Bahrim, G.E. Application of Plackett-Burman experimental design to optimize the cold-active alpha amylase biosynthesis by Psychrotrophic *Streptomyces* 4 alga. Galati: Food Technology, 2012.p.9-19.
- [33] Sivakumar, K.; Karuppiah, V.; Sethubathi, G.V.; Thangaradjou, T.; Kannan, L. Response surface methodology for the optimization of α -amylase production by *Streptomyces* sp. ML12 using agricultural byproducts. Tamil Nadu: Versita Biologia, 2012.p.32-40.
- [34] Bozic, N.; Ruiz, J.; López-Santín, J.; Vujcic Z. Optimization of the growth and α -amylase production of *Bacillus subtilis* IP 5832 in shake flask and laboratory fermenter batch cultures. Belgrade: Journal of Serbian Chemical Society, 2011.p.965-972.
- [35] Zambare, V.P. Optimization of amylase production from *Bacillus* sp. using statistics based experimental design. Usa: Emir. J. Food Agric., 2011.p.37-47.
- [36] Gangadharan, D.; Sivaramakrishnan, S.; Nampoothiri, K.M.; Sukumaran, R.K.; Pandey, A. Response surface methodology for the optimization of alpha amylase production by *Bacillus amyloliquefaciens*. Trivandrum: Bioresource Technology, 2008.p. 4597–4602.
- [37] Sodhi, H.K.; Sharma, K.; Gupta, J.K.; Soni, S.K. Production of a thermostable α -amylase from *Bacillus* sp. PS-7 by solid state fermentation and its synergistic use in the hydrolysis of malt starch for alcohol production. Chandigarh: Process Biochemistry, 2005.p. 525–534.