

Universidade Federal do Amazonas
Programa de Pós-Graduação em Diversidade Biológica

*Seleção dos clones produtores de amilases e proteases presentes
na biblioteca Metagenômica de Terra Preta de Índio*

CAROLINIE BATISTA NOBRE DA CRUZ

Manaus
2010

Universidade Federal do Amazonas
Programa de Pós-Graduação em Diversidade Biológica

CAROLINIE BATISTA NOBRE DA CRUZ

*Seleção dos clones produtores de amilases e proteases presentes
na biblioteca Metagenômica de Terra Preta de Índio*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Diversidade Biológica da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Diversidade Biológica.

Orientadora

Dra. Luciana Leomil

Co-Orientadora

Dra. Leonor Alves de Oliveira da Silva

Manaus

2010

Ficha Catalográfica
(Catalogação realizada pela Biblioteca Central da UFAM)

Cruz, Carolinie Batista Nobre da

C957s Seleção dos clones produtores de amilases e proteases presentes na biblioteca Metagenômica de Terra Preta de Índio / Carolinie Batista Nobre da Cruz. - Manaus: UFAM, 2010.
89 f.; il. color.

Dissertação (Mestrado em Diversidade Biológica) —
Universidade Federal do Amazonas, 2010.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Luciana Leomil

Co-orientadora: Prof^ª. Dra. Leonor Alves de Oliveira da Silva

1. Solos - Análise 2. Biologia dos solos 3. Terra Preta de Índio I.
Leomil, Luciana II. Silva, Leonor Alves de Oliveira da III.
Universidade Federal do Amazonas IV. Título

CDU 631.44(043.3)

CAROLINIE BATISTA NOBRE DA CRUZ

*Seleção dos clones produtores de amilases e proteases presentes
na biblioteca Metagenômica de Terra Preta de Índio*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Diversidade Biológica da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Diversidade Biológica.

Aprovada em 09 de março de 2010.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a. Dra. Ormezinda Celeste Cristo Fernandes
Fundação Oswaldo Cruz - CPLM

Prof^a. Dra. Sônia Maria da Silva Carvalho
Universidade Federal do Amazonas

Prof^a. Dra. Flávia Regina Almeida Naief
Universidade Federal do Amazonas

DEDICO

*Aos meus pais, Gilberto Borges e
Eliana Nobre; e minha irmã, Fabiana Nobre,
que sempre me deram o apoio necessário
para cumprir a minha formação desde
o início de minha vida . O amor de
vocês me fortalece a cada dia.*

*“Minhas imperfeições e fracassos são como
uma bênção de Deus, assim como
meus sucessos e meus talentos,
eu coloco ambos a seus pés.”*

(Mahatma Gandhi)

FINANCIAMENTO

*Este trabalho foi financiado pelo
CNPq (Projetos: Casadinho e Procad).*

*A bolsa de estudos foi concedida
pela Fundação de Amparo à Pesquisa
do Estado do Amazonas - FAPEAM*

Agradecimentos

Agradeço a Deus por me proporcionar tudo em minha vida, pois o que somos representa o presente de Deus a nós e o que nos tornamos é nosso presente a Deus.

Aos meus pais Gilberto e Eliana, pelos incentivos e conselhos constantes, por todos os esforços, amor, carinho e dedicação que ambos proporcionaram em minha vida para construir a pessoa que sou além de orientaram e apoiaram durante toda esta jornada. Vocês são meus exemplos de vida, AMO VOCÊS!!!

A minha querida irmã Fabiana por todo o apoio, respeito e carinho, transmitido durante esta trajetória em minha vida.

A minha professora orientadora Dra. Luciana Leomil, por sua sabedoria e compreensão, principalmente por todo o seu incentivo e apoio para trabalhar com o metagenoma, isto contribuiu bastante para o meu crescimento científico.

Minha co-orientadora Dra. Leonor Alves, agradeço toda a atenção, disposição de ensinar e transmitir seu conhecimento sem esforços. Muito Obrigada!!!

A professora Dra. Maria Francisca Simas Teixeira pela oportunidade e o desafio proposto para isolar e caracterizar também as enzimas proteolíticas presentes na biblioteca metagenômica, agradeço também o financiamento do projeto PROCAD disponibilizado para caracterização das enzimas proteolíticas.

Agradeço a Valéria, Larissa e Rosângela orientandas da professora Dra. Francisca Simas, por todo o apoio e disponibilidade para ensinar a quantificação e caracterização das proteases, além de toda ajuda durante

todos os experimentos e na análise dos dados proteolíticos obtidos, muito obrigada!!!!

Ao todos os amigos integrantes do Cento de Apoio Multidisciplinar, e em especial as minhas amigas Mirna, Cecília, Juliana e Ely, pela ajuda, pelo respeito, carinho, apoio e companheirismo durante toda esta trajetória. Cada uma contribuiu de forma diferente, mas igualmente importante neste trabalho. Obrigada!!!

Ao Programa de Pós-graduação em Diversidade Biológica da Universidade Federal do Amazonas, representado pelos professores e funcionários agradeço todo o apoio e oportunidade para o bom andamento do curso.

À FAPEAM, pelo suporte financeiro concedido durante o período de mestrado.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1. Solo de Terra Preta de Índio (TPI)	5
2.2. Metagenoma	7
2.3. Enzimas	9
2.4. Amido	11
2.5. Amilases (EC 3.2.1.1)	13
2.5.1. α -Amilases (EC 3.2.1.1 - 1,4- α -D-glucano, 4-glucano-hidrolases)...	13
2.5.2. β -Amilases (EC 3.2.1.2 - 1,4- α -D-glucano malto hidrolase).....	14
2.5.3. Glucoamilase (EC 3.2.1.3 - α -1,4-glucano glucano hidrolase)	14
2.5.4. Pululanase (EC 3.2.1.41 - α -dextrinas 6-glucohidrolase).....	15
2.5.5. α -D-Glucosidase (EC 3.2.1.5 - α -1,4-glucano hidrolase)	15
2.5.6. Exo-glucanase (EC 3.2.1.6 - glucano malto hidrolase)	16
2.5.7. Isoamilase (EC 3.2.1.68 - glicogênio 6-glucanohidrolase)	16
2.5.8. Ciclodextrinases (EC 2.4.1.19 – ciclodextrina glicotransferase)	16
2.6. A importância das amilases	17
2.7. Proteases e sua importância.....	18
3. OBJETIVO.....	21
3.1. Objetivos Específicos	21
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	22
CAPÍTULO 01	27
1. INTRODUÇÃO	27
2. MATERIAL E MÉTODOS	30
2.1. Biblioteca metagenômica	30
2.2. Isolamentos de clones para seleção de amilases e proteases	30
2.3. Teste da ação amilolítica e proteolítica para seleção dos clones positivos	31
2.4. Produção das enzimas amilolíticas e proteolíticas.....	31

2.5. Ensaio enzimáticos	32
2.5.1. Ensaio Quantitativo da Atividade Dextrinizante da amilase	32
2.5.2. Ensaio Quantitativo da Atividade Sacarificante da amilase	33
2.5.3. Ensaio Quantitativo da Atividade Proteolítica da Protease	33
2.6. Caracterização parcial das enzimas produzidas pelos clones isolados .	34
2.6.1. Determinação do pH ótimo	34
- Proteases	35
2.6.2. Determinação da estabilidade ao pH	35
- Amilases	35
- Proteases	35
2.6.3. Determinação da Temperatura Ótima.....	36
- Amilases.....	36
- Proteases	36
2.6.3. Determinação da Termoestabilidade	36
- Amilases.....	36
- Proteases	36
2.7. Estatística Experimental.....	37
2.8. Extração do DNA plasmidial	37
2.9. Isolamento do gene amilolítico - PCR	37
3.1. Seleção dos clones com atividade amilolítica e proteolítica.....	39
3.2. Produção enzimática.....	42
3.3. Caracterização Parcial das Amilases.....	54
3.3.1. Atividade Enzimática em diferentes pHs.....	54
3.3.2. Atividade Enzimática em diferentes Temperaturas e Termoestabilidade	60
3.4. Caracterização Parcial das Proteases	70
3.4.1. Atividade Enzimática em diferentes pHs e sua estabilidade frente ao pH	70
3.4.2. Atividade Enzimática em diferentes Temperaturas e Termoestabilidade	74
3.5. Isolamento do gene amilolítico.....	78
4. CONCLUSÕES	84
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Atividades enzimática dos clones presentes da biblioteca metagenômica. A: Clones que formaram halos de hidrólise de amido após a revelação com o vapor de iodo; B: Clones que formaram o halo de proteólise.....	39
Figura 2 - Gráfico da atividade enzimática da amilase dos clones positivos em 24 horas de cultivo, determinada com e sem a indução de arabinose no meio de cultura, com agitação de 150 rpm	42
Figura 3 - Gráfico da atividade enzimática (cinética) da amilase por tempo de cultivo com arabinose dos clones positivos durante 24 horas induzido com arabinose, a 37°C, com agitação de 150 rpm	48
Figura 4 - Gráfico de cinética de produção da protease do clone P3A4 durante 24 horas à 37°C, com agitação de 150 rpm. Atividade enzimática da amilase por tempo de cultivo	52
Figura 5 - Gráfico do efeito do pH sobre as atividades das amilases produzidas pelos clones amilolíticos selecionados.....	57
Figura 6 - Gráfico do efeito da temperatura sob a atividade da amilase presente no extrato bruto dos clones amilolíticos	62
Figura 7 - Gráfico da termoestabilidade da amilase obtida do extrato bruto do clone P1C4.....	63
Figura 8 - Gráfico da termoestabilidade da amilase obtida do extrato bruto do clone P6F1	65
Figura 9 - Gráfico da termoestabilidade da amilase obtida do extrato bruto do clone P5C4.....	66
Figura 10 - Gráfico da termoestabilidade da amilase obtida do extrato bruto do clone P6C12.....	67
Figura 11 - Gráfico do efeito do pH sobre a atividade de proteólise produzida pelo extrato enzimático bruto do clone P3A4	72
Figura 12 - Gráfico da estabilidade enzimática ao pH da protease produzida pelo clone proteolítico selecionados.....	73
Figura 13 - Gráfico do efeito da temperatura sob a atividade de proteólise presente no extrato bruto do clone P3A3	75
Figura 14 - Gráfico do efeito da temperatura sob a atividade de proteólise presente no extrato bruto do clone P3A3	76
Figura 15 - Perfil eletroforético da extração de DNA plasmidial em gel de agarose a 1%. (1) Marcador de peso molecular 1 Kb Plus (Fermentas); (2) Clone P1C4; (3) Clone P6F1; (4) Clone P5C4; (5) Clone P6C12; (6) Clone P3A4	78

Figura 16 - Eletroforese dos produtos da PCR para amilase de *B. liqueniformis* (*amyIN*) em gel de agarose a 1%. (1) Marcador de peso molecular 1Kb (Fermentas); (2) controle negativo da reação; (3) controle positivo da reação; (4) Clone P1C4; (5) Clone P6F1; (6) Clone P5C4; (7) Clone P6C1279

Figura 17 - Eletroforese dos produtos de PCR para amilase de *B. subtilis* (*Pamy*) em gel de agarose a 1%. (1) Marcador de peso molecular 1Kb Plus (Fermentas); (2) controle positivo da reação; (3) controle negativo da reação; (4) Clone P1C4; (5) Clone P6F1; (6) Clone P5C4; (7) Clone P6C12480

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação e divisão das proteases.....	19
Tabela 2 - Classificação e uso de endopeptidases na indústria.....	20
Tabela 3 - Iniciadores utilizados para amplificar o gene <i>amy</i> IN e <i>amy</i> E dos clones isolados.....	38
Tabela 4 - Atividades enzimáticas estimadas semi-quantitativamente, utilizando o índice enzimático descrito [12].	40
Tabela 5 - Atividades enzimáticas dextrinizante e sacarificantes dos clones amilolíticos isolados, o extrato enzimático bruto incubado na temperatura de 40°C por 30 minutos.....	50

RESUMO

Na floresta Amazônica são encontrados solos agricultáveis denominado de solo de Terra Preta de Índio (TPI), um solo rico em matéria orgânica e em minerais. A biodiversidade da Amazônia constitui uma fonte de valor altíssimo de micro-organismos não-cultiváveis que podem ser isolados através das construções das bibliotecas metagenômicas, utilizando vetores de grandes fragmentos, com o objetivo de encontrar novas enzimas biocatalíticas. As enzimas de maior aplicação no mercado industrial são as amilases e proteases, aplicadas nas indústrias: química, farmacêutica, têxtil, de detergentes e alimentícia. As amilases são capazes de degradar o amido em unidades de sacarídeos menores, já as proteases catalisam a hidrólise de ligações peptídicas. O objetivo deste trabalho foi isolar e caracterizar parcialmente enzimas amilolíticas e proteolíticas de clones isolados a partir de uma seleção funcional da biblioteca metagenômica de TPI da região Amazônica construída com DNA total extraído dos micro-organismos presentes nas amostras de solos de TPI, inseridos no vetor fosmidial (pCC1Fos™) e clonado na célula hospedeira *Escherichia coli* (EPI300). De 1.344 clones pertencente a biblioteca metagenômica, apenas 4 clones foram produtores de halo de hidrólise de amido e 3 clones foram proteolíticos, além disso, todas as enzimas produzidas pelos 4 clones amilolíticos e 1 clone proteolítico foram caracterizadas parcialmente. Após o isolamento, os clones foram inoculados em meio de cultura Luria Bertani (LB) a 37°C, sob agitação de 150 rpm e submetidos aos ensaios enzimáticos nos pHs de 3 a 10 e temperatura variando de 25 a 100°C por até 90 minutos de incubação. As amilases tiveram sua maior produção em 24 horas (4,3 U/mL) e sua atividade ótima foi em pH neutro a levemente alcalino, o clone P1C4 demonstrou a maior produção a 70°C (6,93 U/mL), já os clones P5C4 e P6C12 demonstraram a maior termoestabilidade a 80°C, tais resultados indicam que o gene de alfa-amilase clonado deve ser codificador de uma enzima termoestável, como por exemplo, a enzima produzida por *Bacillus liqueniformis*. Já o clone P3A3 produziu 26,3 U/mL de proteases em 10 horas de produção, sua atividade ótima foi em pH neutro, sendo sua temperatura ótima em 30°C (56,0 U/mL) e sua termoestabilidade foi demonstrada em 50°C (22,0 U/mL). Estas características contribuem para a aplicação destas enzimas em setores industriais como na produção de alimentos, indústria química e produção de detergentes. As enzimas isoladas neste trabalho demonstraram características e atuações novas quando comparadas a enzimas descritas atualmente, a qual comprova a eficiência da construção de bibliotecas metagenômicas para o isolamento de novos bioprodutos.

Palavras-chaves: metagenoma, amilase, protease, enzimas, fosmídeo

ABSTRACT

In the Amazon agricultural soils are found in soil called Anthropogenic Dark Earths (ADE), a soil rich in organic matter and minerals. The biodiversity is a source of very high value of non-cultivable microorganisms that can be isolated through construction of metagenomic libraries, using vectors of large fragments, with the goal of finding new biocatalytic enzymes. Enzymes widely used in the industrial market are amylase and protease, are applied in industry: chemical, pharmaceutical, textile, detergent and food industries. Amylases degrade starch into smaller units of saccharides, as proteases catalyze the hydrolysis of peptide bonds. The aim of this study was to isolate and partially characterize enzymes amylase and protease of clones isolated from a selection of functional metagenomic library of TPI in the Amazon region. In this study were isolated 1.344 clones, only 4 producing halo of starch hydrolysis and 3 proteolytic clones belonging to metagenomic library constructed with total DNA extracted from microorganisms present in soil samples of the TPI, were partially characterized the enzymes produced by 4 clones amilolytic and 1 proteolytic clone. After isolation, the clones were inoculated in culture medium Luria Bertani (LB) at 37°C under agitation of 150 rpm and subjected to assays at pHs of 3 to 10 and temperatures ranging from 25 to 100°C for up to 90 of incubation. Amylases had its highest production in 24 h (4.3 U/mL) and its activity was optimal at neutral pH to slightly alkaline, the clone P1C4 showed the highest production at 70°C (6.93 U/mL), since the clones P5C4 and P6C12 reported higher thermostability at 80°C, these results indicate that the gene for alpha-amylase to be cloned encoding a thermostable enzyme, such as the enzyme produced by *Bacillus liqueniformis*. Since the clone P3A3 produced 26.3 U/mL protease in 10 hours of production, its activity was optimal at neutral pH, and its optimum temperature at 30°C (56.0 U/mL) and its thermostability was demonstrated in 50°C (22,0 U/mL). These features contribute to the implementation of these enzymes in industrial sectors as in food production, chemical industry and production of detergents. The enzymes isolated in this study demonstrated new features and performance when compared to enzymes described today, which proves the efficiency of the construction of metagenomic libraries for isolation of new bioproducts.

Keywords: metagenomic, amylase, protease enzymes, fosmid

1. INTRODUÇÃO GERAL

A floresta Amazônica é conhecida mundialmente como a maior floresta tropical e ocupa uma área de aproximadamente 5,5 milhões de km², correspondendo a 30% de todo o continente sul-americano (KALIF et al., 2000). Esta floresta é caracterizada por possuir uma elevada diversidade biológica de fauna e flora, sendo em torno de 15.000 espécies de animais documentados, além de mais de 5.000 espécies de árvores descritas (BORNEMAN e TRIPLET, 1997).

Na Amazônia encontram-se dois tipos de florestas: a de terra firme, que caracteriza-se por ser uma área não alagada durante o período de cheia dos rios e que apresentam elevadas quantidades de árvores podendo atingir mais de 40 metros de altura; e a floresta de várzea ou igapó que são áreas inundáveis e localizam-se em áreas próxima aos rios e apresentam árvores de médio-baixo porte (KALIF et al., 2000).

A floresta de terra firme na Amazônia apresenta solos ácidos, na sua maior parte, com baixa capacidade de troca catiônica e, conseqüentemente, baixa fertilidade (MOREIRA e MALAVOLTA, 2002). Contudo, existem grandes áreas potencialmente agricultáveis e com alta fertilidade, dentre elas destaca-se a Terra Preta de Índio (TPI), denominação dada aos solos de origem antropogênica existentes na Região Amazônica (SMITH, 1980; WOODS, 2003). É relatado que sua alta fertilidade está diretamente relacionada com a

capacidade de manter o alto teor de carbono orgânico, que pode relacioná-la a uma grande presença de micro-organismos (DROZDOWICZ, 1997).

Os solos de TPI encontrados na região Amazônica possuem vestígios de ocupação humana desde a Antiguidade, mostrando ser um solo rico em minerais, e grandes quantidades de matéria orgânica (GLASER et al., 2001). Essa abundância de materiais possibilita o surgimento de bactérias residentes facultativas e também de subprodutos que possam estar vinculados a elas (DROZDOWICZ, 1997).

A estrutura da comunidade microbiana nestes solos é altamente complexa e diversa, tornando este ambiente um grande reservatório biológico e genético, pelo qual, pode-se explorar a descoberta de novos genes, vias metabólicas inteiras assim como seus produtos (RONDON et al., 2000).

Desde 1950, diversos produtos derivados do metabolismo microbiano têm sido utilizados para fins industriais, médicos e agrícolas, tais como: inibidores enzimáticos, antibióticos, drogas anticancerígenas, antifúngicos, imunossupressores, antiparasitários, herbicidas, inseticidas, entre outros, sendo que a maioria destes compostos naturais foi obtida de micro-organismos que habitam o solo (DROZDOWICZ, 1997).

Entretanto, os métodos tradicionais para o isolamento de micro-organismos são insuficientes para representar a diversidade microbiana existente na natureza, sendo que somente a 1% dos micro-organismos presente no solo são cultiváveis pelas técnicas tradicionais. Essas descobertas proporcionaram uma necessidade do desenvolvimento de novas metodologias para o acesso ao potencial microbiano do solo cultivo-independente (RONDON et al., 2000).

A metagenômica é a nova ferramenta de análise genômica da comunidade microbiana de um determinado ambiente através de técnicas independentes de cultivo, o que a consolida como uma estratégia de grande interesse, pois permite o acesso ao potencial genético e bioquímico desses micro-organismos, e possibilita a descoberta de novos compostos bioativos. Essa técnica consiste na extração de DNA total de um determinado ambiente, seguida da construção de uma biblioteca metagenômica, clonagem e expressão de genes de interesse industrial (KNIGHT et al., 2003).

Aproximadamente 90% das enzimas aplicadas industrialmente são de origem microbiana (GODFREY e WEST, 1996), e a mais empregada industrialmente são as enzimas extracelulares hidrolases (proteases, amilases, celulases, xilanases e lipases, entre outras).

Amilases são hidrolases capazes de degradar o amido em unidades menores de açúcares. Estão entre as enzimas de maior importância empregadas na indústria, devido à grande aplicação do amido e de seus derivados em processos industriais (GUPTA et al., 2003).

As proteases são enzimas que catalisam a hidrólise das ligações peptídicas entre os aminoácidos (BERG et al., 2004), sendo classificadas segundo sua atividade máxima em pH: proteases ácidas, neutras ou alcalinas. Estas possuem uma grande importância comercial e são utilizadas na produção de detergentes, indústria de alimentos, entre outros (RAO et al., 1998).

A descoberta e produção destas enzimas são de grande importância, por apresentarem uma ampla utilidade comercial e industrial, pois as mesmas alcançam elevados valores no mercado internacional.

Entretanto, o Brasil importa cerca de 95% do total de enzimas utilizadas nas indústrias brasileiras, participando com menos de 2% no desenvolvimento de tecnologia enzimática. Logo, existe a necessidade da produção de enzimas, como as amilases e proteases utilizando tecnologia nacional, diminuindo assim, a dependência brasileira em relação a empresas multinacionais de biotecnologia neste setor (RAO et al., 1998).

Desta forma, a proposta geral deste trabalho foi selecionar micro-organismos produtores de amilases e proteases, utilizando a Biblioteca Metagenômica de Terra Preta de Índio, já construída por Leomil et al. (2007), que permite uma abordagem alternativa para acessar e explorar o imenso conjunto de genes de organismos presentes neste ambiente, ainda não descritos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Solo de Terra Preta de Índio (TPI)

Apesar da existência de grandes áreas agricultáveis, a maioria dos solos Amazônicos caracterizam-se como solos de baixa fertilidade, por serem solos ácidos e com baixa capacidade de troca catiônica (MOREIRA e MALAVOLTA, 2002). Dos poucos solos com alta fertilidade, incluem-se a “Terra Preta do Índio” (TPI), denominação dada aos solos de origem antropogênica, existentes na Região Amazônica (SMITH, 1980; WOODS, 2003).

O solo de TPI é caracterizada por apresentar altos teores de CaO (1.810 mg.kg⁻¹), P₂O₅ (4.900 mg.kg⁻¹) e elevados teores de matéria orgânica, possuindo uma atividade biológica mais intensa do que os solos adjacentes. A matéria orgânica presente no solo de TPI é proveniente de restos de ossos humanos e de animais. São solos com pH em torno de 5,2 a 6,4; a quantidade de fósforo disponível, em geral, é em torno de 250 mg.kg⁻¹; Zinco e Manganês são na faixa de 200 e 450 mg.kg⁻¹, respectivamente (FALCÃO et al., 2001).

Geralmente estão localizados próximo dos rios e na sua maioria são distribuídos em áreas de dois a cinco hectares (TEIXEIRA e MARTINS, 2003). Apresentam um horizonte A antrópico, de cor escura e fragmentos de artefatos e cerâmicas indígenas nos horizontes superficiais do solo, o que deu origem a terminologia Terra Preta Arqueológica, utilizada por alguns autores (KERN e COSTA, 1997).

A formação do solo de TPI contém ainda muitos aspectos ainda não elucidados, provavelmente teve seu início de formação através do homem pré-

colombiano e foi abandonado devido às invasões européias (KERN e KÄMPF, 1989). Porém, muitas dúvidas se fazem pertinentes, entre elas, destaca-se a alta capacidade de manutenção e fertilidade com o uso contínuo da terra, mesmo nas condições edafoclimáticas locais.

Esta capacidade de manter o alto teor de carbono orgânico, possivelmente, devido às características químicas e da resistência do material, é devido à decomposição microbiana da matéria orgânica ali depositada (GLASER et al., 2001). A matéria orgânica do solo de TPI é constituída, em sua maior parte, por substâncias húmicas mais estáveis, de difícil degradação, sendo essas substâncias formadas a partir de transformação dos resíduos orgânicos processados até a síntese de macromoléculas resistentes à degradação biológica (CAMARGO et al., 1998).

Devido a suas características, este solo constitui-se, indubitavelmente, de um grande reservatório de carbono orgânico da Terra e em um dos mais importantes habitats para os micro-organismos. Batista-Silva et al. (2009) utilizando técnicas moleculares e análises filogenéticas, baseada na seqüência gênica de 16SrRNA, demonstrou que o solo de TPI possui micro-organismos filogeneticamente diversos e uma elevada quantidade de micro-organismos não-cultiváveis pela análises utilizando bancos de dados internacionais de genomas. Contudo, estas descobertas proporcionaram uma base científica para o desenvolvimento de novos projetos que visam explorar e possibilitar a análise da comunidade microbiana presente no solo de TPI e possibilita a descoberta de novas vias metabólicas e produtos bioativos, oriundo da vasta quantidade de micro-organismos não-cultiváveis presentes neste solo.

2.2. Metagenoma

A metagenômica combina vários conhecimentos tecnológicos. pela via molecular, adquiridos no último século, dando subsídios para a investigação e capacitando cientistas para estudar a ecologia microbiana e, desvendar o vasto potencial biotecnológico que há dentro das populações de micro-organismos. Como consequência da descoberta de uma ampla diversidade da população microbiana, a metagenômica torna-se um recurso significativo para as aplicações biotecnológicas destes novos micro-organismos (HANDELSMAN, 2004).

As condições abióticas, bem como as diferentes concentrações de substratos disponíveis, determinam a colonização de populações de micro-organismos em diferentes habitats (BARBOSA; TORRES, 1998). A variação das condições abióticas num determinado ambiente pode submeter populações microbianas a estresse ambiental, levando a supor que as freqüências mutacionais poderão ser aumentadas nessas situações, promovendo evolução episódica rápida ou macroevolução (SCHLOTTER et al., 2000). Essas freqüências mutacionais estão diretamente relacionadas à capacidade de adaptação e processos de competição entre micro-organismos no ambiente, que então passam a produzir substâncias como metabólitos secundários, toxinas, produtos ácidos de fermentação e enzimas. A produção dessas substâncias tende a dificultar o estabelecimento e propagação de populações antagônicas, determinando a distribuição espacial de populações microbianas nos ambientes naturais como solos e ambientes aquáticos (rios, lagos, estuários e zonas costeiras) (HANDELSMAN, 2004).

A construção de bibliotecas genômicas é resultante da clonagem de fragmentos de DNA de alto peso molecular em vetores apropriados. A clonagem de DNA metagenômico foi descrito pela primeira vez na metade da década de 90, com a construção de uma biblioteca de metagenômica de micro-organismos marinhos (STEIN et al., 1996).

Observa-se que houve um progresso significativo na metagenômica nos últimos seis anos, o que começa a proporcionar um melhor entendimento substancial das funções da comunidade microbiana presentes em diferentes ambientes naturais do planeta (COWAN et al., 2005).

Apenas 1% dos micro-organismos são descritos atualmente, pois estima-se que 1 grama de solo pode conter cerca de 10.000 genomas diferentes, isto é bem representado quando utilizam-se ferramentas moleculares que através das análises de seqüências genômicas, comprovam esta ampla diversidade microbiana presente no solo, sendo que as técnicas que utilizam o cultivo-dependente deixam de descrever cerca de 99% dos micro-organismos devido suas limitações. Com isso surgiu a necessidade de uma ferramenta que vise descrever esta a ampla diversidade microbiana e também contribuir para a descrição dos processos ecológicos dos micro-organismos em determinados ambientes, com isto aumentarão as possibilidades de encontrar novos produtos bioativos.

Com o crescimento de novas técnicas que visam estudar os micro-organismos desconhecidos, surge então a metagenômica que visa construir bibliotecas metagenômicas, utilizando o DNA total presente em um determinado ambiente, sendo esta informação inserida na maioria das vezes em vetores de

grandes fragmentos, como por exemplo, os fosmídeos e cosmídeos, com o objetivo de encontrar novas enzimas biocatalíticas (DANIEL, 2004, 2005; COWAN et al., 2005).

A metagenômica é uma ferramenta que possibilita acessar genes de bactérias não-cultiváveis atualmente, devido o fato da técnica ser baseada na análise genômica direta de uma comunidade de micro-organismos sem haver a necessidade de cultivo prévio em laboratório. A metodologia consiste na extração de DNA total de um determinado ambiente para a construção de uma biblioteca com este genoma, para posterior clonagem e expressão de genes de interesse biotecnológico em vetores de expressão (KNIGHT et al., 2003).

Em uma biblioteca de genes amplificados da 16S rRNA limita-se em apenas determinar a taxonomia e filogenia do micro-organismo, porém a biblioteca metagenômica oferece a oportunidade de recuperação de genes desconhecidos que estão diretamente envolvidos na biossíntese de antibióticos, enzimas, drogas anticancerígenas, antifúngicos, imunossupressores, antiparasitários, herbicidas, inseticidas, dentre outros. Contudo, a metagenômica, é uma técnica consiste em extrair o DNA diretamente das amostras ambientais para a construção de bibliotecas metagenômicas (RONDON et al., 2000), não havendo a necessidade conhecer previamente a informação da seqüência para a clonagem.

2.3. Enzimas

As enzimas em sua maioria são proteínas notáveis e especializadas, que desempenham o papel de catalisadores nas diversas reações bioquímicas.

Agindo em seqüências organizadas, elas catalisam as centenas de reações sucessivas pelas quais as moléculas nutrientes são degradadas, aumentando a velocidade das reações sem afetar seu equilíbrio. São altamente coordenadas de forma a produzir uma atuação harmoniosa das muitas diferentes atividades necessárias, sendo de fundamental importância para a vida, pois sem a catálise essas reações não ocorreriam em uma escala de tempo útil (BERG et al., 2004; NELSON e COX, 2004).

Possuem um papel fundamental no ciclo de nutrientes presente no solo e esse resultado é devido a elevada quantidade oriundo de proliferação de inúmeros grupos microbianos e do acúmulo de suas enzimas (KISS et al., 1975).

Cada enzima isolada possui uma característica específica de ação para um determinado substrato, catalisando assim a reação. Esta propriedade serve como modelo para aplicação em inúmeros processos industriais.

A enzimologia industrial é um importante ramo da biotecnologia que está em grande expansão, pois as enzimas permitem que as indústrias optem por processos mais econômicos, nos quais são reduzidos o consumo de energia, além do fato de que os produtos orgânicos são mais confiáveis e de mínima agressão ao meio ambiente, na qual a maioria dos processos industriais utilizam como catalisadores da reação química, solventes químicos altamente agressivos ao meio ambiente. (BERG et al., 2004).

A característica distintiva de uma reação catalisada enzimaticamente é que a mesma possui um ajuste induzido, com domínios catalíticos e ocorre na estrutura molecular da enzima chamado de sítio catalítico, permitindo que as enzimas atuem na ruptura de uma determinada ligação química. O sítio ativo

liga-se ao substrato, formando o complexo enzimático (enzima/substrato) que será convertido a enzima e produto (NELSON e COX, 2004).

Um dos fatores de maior influência na manutenção e função das biomoléculas das estruturas biológicas é a temperatura, pois esta pode levar a desnaturação da proteína. Quando a temperatura aumenta, a velocidade de reação inicialmente aumenta em virtude da energia cinética aumentada das moléculas com o substrato (GOMES et al., 2007). As enzimas termoestáveis já têm sido usadas como ferramentas na biologia molecular, no setor de diagnóstico, no tratamento de resíduos e na produção de ração animal (HAKI e RAKSHIT, 2003; COLOMBATTO et al., 2004).

Outro fator que afeta na atividade enzimática é a concentração de íons H^+ , pois assim como na temperatura, extremos pH podem levar a desnaturação da proteína. Existe o pH ótimo, no qual ocorre a distribuição de cargas elétricas da molécula da enzima e, em especial do sítio catalítico, é este que se torna ideal para a catalise, logo o pH ótimo varia para as diferentes enzimas (VIHINEN e MANTSALA, 1989).

2.4. Amido

O amido é um polímero de glicose de alta massa molecular, sendo juntamente com a celulose, um dos polímeros de origem vegetal mais amplamente disponível na natureza (BECK ZIEGLER, 1989). Ele pode ser armazenado em diferentes órgãos e tecidos vegetais, como em plastídeos de folhas, frutos e no endosperma de cereais em uma estrutura bastante complexa, formando grânulos que podem variar de 0,1 a 50 μm (BALL e MORELL, 2003).

O grânulo do amido é composto basicamente de dois tipos de macromoléculas: amilose e amilopectina. A maioria dos amidos contém 20 – 30% de amilose e de 70 – 80% de amilopectina. Juntas amilose e amilopectina formam estruturas semicristalinas que são depositadas nos plastídeos. Com diversos tipos polimórficos o grão do amido dependem do tipo da cristalinidade, principalmente, das características estruturais da amilopectina, sendo esta, o principal componente de amido, embora a retro-degradação da amilose, possa produzir um tipo específico de estrutura cristalina (ZHANG et al., 2005).

A amilopectina é uma molécula complexa e ramificada, de alto peso molecular, com grau de polimerização de 10^5 e 10^6 unidades de glicose (BALL e MORELL, 2003). A estrutura da amilose é composta por unidades de glicose em arranjo linear, com grau de polimerização de 1.000 e 5.000 unidades, onde os monômeros de glicose são ligados por ligações de α -1,4-glicosídicas, podendo conter ainda, 0,1% de ligações de α -1,6-glicosídicas (KOSSMANN e LLOYD, 2000).

Ao ser hidrolisado, o amido produz carboidratos de cadeia curta, tais como dextrinas, maltopentose, maltotritose, maltose e finalmente glicose (CRUEGER e CRUEGER, 1984). Estes produtos derivados da hidrólise do amido podem ter diversas aplicações industriais, como: xarope de glicose; xarope de maltose oriundo da isomerização ou processos de liquefação e/ou sacarificação (BHAT, 1998; SAID et al., 2006); na indústria de panificação para atrasar o envelhecimento do pão, melhorar textura, volume e sabor (SAHA, 1992); nas indústrias de bebidas alcoólicas; na produção do álcool combustível, com os seus açúcares fermentáveis; entre outras aplicações.

2.5. Amilases (EC 3.2.1.1)

Amilases são enzimas da família das hidrolases capazes de degradar o amido até sacarídeos de baixo peso molecular. São amplamente distribuídas na natureza, e podem ser produzidas por bactérias, fungos, plantas e animais. Estas enzimas que destacam-se na família das hidrolases, pelo fato de serem amplamente aplicadas no setor industrial, devido à grande aplicação do amido e de seus derivados em processos industriais. Sua aplicação depende de características como: modo de ação, especificidade com o substrato, produtos gerados, temperatura e pH ótimo (GUPTA et al., 2003).

Estas enzimas podem ser classificadas quanto ao seu mecanismo de ação ou quanto ao tipo de ligação que hidrolisam. Quanto ao mecanismo de ação podem ser classificadas como endoamilases (clivam ligações glicosídicas ao acaso no interior do polímero), ou exoamilase (hidrolisam, sucessivamente, ligações glicosídicas a partir da extremidade não-redutora da molécula) (CASTRO et al, 1992; GUPTA et al., 2003).

As amilases, quanto às ligações hidrolisadas, podem ser agrupadas em: α -amilases, β -amilases, glucoamilase, pululanases, α -D-glicosidase, exo-glucanase, isoamilase, ciclodextrinases glicotransferase e isomaltase.

2.5.1. α -Amilases (EC 3.2.1.1 - 1,4- α -D-glucano, 4-glucano-hidrolases)

As α -amilases são endoenzimas que hidrolizam de forma aleatória as ligações glicosídicas do tipo α -1,4 do amido, gerando produtos finais os oligossacarídeos menores como glicose, maltotriose, maltose e dextrinas de alta massa molecular (CHANG et al., 1988; SAHA e ZEIKUS, 1992).

A maioria das α -amilases descritas atualmente, são cálcio-dependente, segundo Bruchmann (1980) tem-se demonstrado que estas enzimas quando privadas do íon Ca^{+2} possuem uma queda na sua atividade enzimática, pois o cálcio aumenta a estabilidade enzimática principalmente frente a mudanças de temperatura e pH.

Estas enzimas são produzidas por uma variedade de organismos, incluindo bactérias, actinomicetes, fungos e leveduras, entretanto as enzimas derivadas de fungos e bactérias são as dominantes, e dentre estes os principais produtores de α -amilases incluem o gênero *Aspergillus* e *Bacillus*, respectivamente (PANDEY et al., 2000).

2.5.2. β -Amilases (EC 3.2.1.2 - 1,4- α -D-glucano malto hidrolase)

As β -amilases são endoenzimas que clivam as ligações glicosídicas, a partir da extremidade não redutora da amilose, amilopectina e glicogênio que são as ligações α -1,4 para produzir maltose (BHAT, 1998). Estas enzimas são incapazes de contornar as ligações glicosídicas do tipo α -1,6, interrompendo sua atividade nos pontos de ramificação.

São denominadas também de amilases sacarificantes, uma vez que as maltoses resultantes são facilmente fermentáveis (QUAGLIA, 1991). O amido solúvel quando hidrolisado por esta enzima resulta na produção de 69% de maltose e β -dextrinas (BHAT, 1998).

2.5.3. Glucoamilase (EC 3.2.1.3 - α -1,4-glucano glucano hidrolase)

Esta enzima também é chamada de amiloglucosidase, são exoenzimas++ que agem em ligações glicosídicas do tipo α -1,4 e α -1,6 removendo unidades

de glicose consecutivamente a partir da extremidade não redutora da cadeia de amido e de oligossacarídeos deixados pela ação da α -amilases, liberando β -D-glicose como produto (OLIVEIRA et al., 1993).

Os principais gêneros produtores de glucoamilase são: *Aspergillus* e *Rhizopus*, sendo o *Aspergillus niger* o melhor produtor desta enzima (SAUER et al., 2001).

2.5.4. Pululanase (EC 3.2.1.41 - α -dextrinas 6-glucohidrolase)

As pululanases clivam as ligações do tipo α -1,6 nos pontos de ramificação do amido e da amilopectina, fazendo a conversão em molécula de amilose, que possuem somente ligações do tipo α -1,4. Também são capazes de hidrolisar as ligações glicosídicas α -1,6 da pululana, gerando moléculas de maltotriose (BHAT, 1998).

São industrialmente importantes e geralmente são usadas em combinação com amilases sacarificantes, como: a glucoamilase, α -amilases e β -amilases para a produção de xaropes, onde a pululanase é adicionada juntamente com a glucoamilase para aumentar o teor de glicose, reduzindo o tempo de reação (BHAT, 1998).

2.5.5. α -D-Glucosidase (EC 3.2.1.5 - α -1,4-glucono hidrolase)

As α -D-Glucosidase agem nas ligações glicosídicas do tipo α -1,4 terminais do amido e libera como produto a D-glicose. Estas enzimas também podem clivar ligações terminais α -1,2, α -1,4 e α -1,6 de dissacarídeos e

oligossacarídeos gerando a α -D-glicose. É uma enzima de grande importância nos processos de produção de xarope com alto teor de glicose (BHAT, 1998).

2.5.6. Exo-glucanase (EC 3.2.1.6 - glucano malto hidrolase)

As exo-glucanase são enzimas que se caracterizam por liberar a maltoligossacarídeos do amido. Estes maltoligossacarídeos possuem um alto valor comercial e pode ser usado como suplemento alimentar para crianças, idosos e pacientes clínicos (BHAT, 1998).

2.5.7. Isoamilase (EC 3.2.1.68 - glicogênio 6-glucanohidrolase)

As isoamilases hidrolisam as ligações do tipo α -1,6 de amilopectina, glicogênio, dextrinas ramificantes e alguns oligossacarídeos. Entretanto, tais enzimas não hidrolisam as ligações do tipo α -1,6 da pululana e de β -dextrina-limite (ARA e ITO, 1993). Essas enzimas são usadas pela indústria para a produção de maltose e glicose a partir de amido em combinação com outras amilases.

2.5.8 Ciclodextrinases (EC 2.4.1.19 – ciclodextrina glicotransferase)

As ciclodextrinases são enzimas que hidrolizam o amido formando estruturas circulares denominadas de cliclodextrinas unidas por ligações glicosídicas do tipo α -1,4. Estes anéis podem ser constituídos por 6, 7 e 8 unidades de glicose, sendo chamadas de α , β e γ -ciclodextrinas, respectivamente. São enzimas extracelulares encontradas principalmente em bactérias do gênero *Bacillus* (SAHA e ZEIKUS, 1992), mas também foi descrita em *Klebsiella pneumoniae* M5al e *Micrococcus* sp (FOGARTY e KELLY, 1990).

2.6. A importância das amilases

As amilases têm sido amplamente utilizadas em diversos setores como: na produção de xaropes de glicose ou frutose, na panificação como agente anti-envelhecimento, componente de detergentes para lavanderia e louças, entre outros. Estas enzimas compreendem cerca de 30% da produção mundial das enzimas (GUPTA et al., 2003).

Na aplicação industrial, as amilases são de grande importância na indústria do amido e são utilizadas como catalisadores para a hidrólise de macromoléculas do amido até a produção de glicose. A razão que incentiva a utilização das amilases é devido ao fato de ser uma forma simples e barata de realizar o primeiro passo de despolarização do amido. Atualmente, o uso de enzimas é preferido ao invés da utilização de compostos químicos, devido ao alto rendimento e pelos inúmeros produtos que podem ser obtidos, como por exemplo: xarope de glicose, xarope de maltose feitos através da isomerização ou por processos de liquefação, sacarificação (BHAT, 1998).

Na panificação, a α -amilase é utilizada para degradar o amido da farinha, presente na massa e formar pequenas dextrinas, e sua utilização melhora a textura, volume, permite um atraso no envelhecimento, e melhora o sabor dos produtos de panificação (SHAH, 1991).

Um setor de aplicação das amilases é a indústria de bebidas alcoólicas, onde a matéria prima é normalmente a cevada, na qual as amilases tem o objetivo de hidrolisar a glicose para a fermentação alcoólica, cujo processo é realizado por leveduras (PRETORIUS & LAMBRECHTS, 1991). Já na produção de álcool combustível, o principal obstáculo na utilização do amido é a sua conversão em

açúcares fermentáveis, mas a conversão é feita pela adição de α -amilase bacteriana e glicoamilase fúngica, que são importadas geralmente da Europa. Porém, este processo apresenta vantagens quando comparado com a obtenção de álcool a partir da sacarose, pois este é um procedimento que necessita apenas da extração do caldo-de-cana antes da adição das leveduras. Uma forma de reduzir o custo desse processo é fabricar as enzimas amilolíticas nacionalmente, já que atualmente o Brasil é o país que importa mais de 10 milhões de dólares apenas com estas enzimas.

Portanto, as amilases são amplamente utilizadas para sacarificação ou liquefação do amido, mas que podem ser usada também no preparo de soluções viscosas de amido como nos processos: de urdidura de fibras têxteis, clarificação de cervejas e sucos, no pré-tratamento de ração animal ou para bioestonagem para remoção da goma em jeans (GUPTA et al., 2003).

2.7 Proteases e sua importância

As proteases são enzimas da família das hidrolases que clivam a proteína adicionando uma molécula de água à ligação peptídica (BERG et al., 2004). Estas enzimas podem ser obtidas de diferentes fontes, como plantas, animais e micro-organismos, e são fisiologicamente necessárias à sobrevivência de todos os seres vivos (RAO et al., 1998). As enzimas proteolíticas apresentam diversas aplicações biotecnológicas, constituindo em um dos mais importantes grupos de enzimas produzidas comercialmente (BARRETT, 1994).

A Tabela 1 mostra a classificação destas enzimas, que podem ser divididas em dois principais grupos: exopeptidases e as endopeptidases. As primeiras

clivam as ligações peptídicas próximo das extremidades das cadeias protéicas, e as endopeptidases atuam nas regiões internas das cadeias polipeptídicas, sendo o grupo que se encontram as principais proteases industriais, conforme ilustrado na Tabela 2 (BARRETT, 1994; RAO et al., 1998).

Tabela 1 - Classificação e divisão das proteases

Clivagem no substrato	Sítio Ativo	Resíduos de aminoácidos
Exopeptidases	Aminopeptidases	Aminodipeptidases Aminotripeptidases Aminopeptidases
	Carboxipeptidases	Serinocarboxipeptidases Metalocarboxipeptidases Cisteínocarboxipeptidases
Endopeptidases	Serinoproteases Metaloproteases Aspartatoproteases Cisteinoproteases	

(Fonte: RAO *et al.*, 1998)

Tabela 2 - Classificação e uso de endopeptidases na indústria

Grupo	pH	Sítio Ativo	Aplicações	Fonte
Serinoproteases	Alcalino	Ser (His)	Hidrólise protéica	Tripsina (Pâncreas)
			Detergentes	Subtilisina (<i>Bacillus</i>)
Metaloproteases	Neutro	Zn ²⁺	Cerveja	<i>Bacillus</i>
		Ca ²⁺	Couro	<i>Aspergillus oryzae</i>
Carboxiproteases	Ácido	Asp	Queijo	Quimosina (bezerro)
Tiolproteases	Tiol	Cys	Amaciamento de carne	Papaína (Papaya)

(Fonte: RAO *et al.*, 1998)

Estas enzimas representam atualmente 60% do mercado mundial de enzimas, sendo 40% deste mercado referente às proteases de origem microbiana. Elas são encontradas na produção de detergentes, na indústria de alimentos para o aumento da digestibilidade de alimentos de origem animal e na degradação de subprodutos ricos em proteína. A utilização das proteases como agentes de modificação das propriedades funcionais de proteínas têm se tornado bastante difundido na indústria de alimentos (JOHNVESLY e NAIK, 2001).

3. OBJETIVO

Selecionar clones recombinantes que produzam amilases e proteases utilizando a biblioteca metagenômica de DNA total extraído de amostras de solos de Terra Preta de Índio (TPI) da Região Amazônica.

3.1. Objetivos Específicos

- a) Isolar clones produtores de amilase e protease a partir da Biblioteca Metagenômica de Terra Preta de Índio;
 - b) Selecionar os clones de a ação amilolítica e proteolítica através de meios de cultura sólido contendo substrato amido e caseína, respectivamente;
 - c) Avaliar qualitativamente e quantitativamente a ação amilolítica e proteolíticas dos clones isolados;
 - d) Caracterizar parcialmente as enzimas produzidas pelos clones isolados;
 - e) Isolar o gene de α -amilase de *Bacillus liqueniformis* dos clones amilolíticos selecionados.
-

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARA, K.S.K.; ITO, S. Purification and characterization of an alkaline isoamilase from alkaliphic strain of *Bacillus*. **J. Gen. Micro.**, v.139, p. 781- 786, 1993.
- BALL, S.G.; MORELL, M.K. From bacterial glycogen to starch: understanding the biogenesis of the plant starch granule. **Annu. Rev. Plant Biol.**, v. 54, p. 207-233, 2003.
- BARBOSA, H.R.; TORRES, B.B. **Microbiologia básica**. Ed. Atheneu. São Paulo. 1998. 196p.
- BARNETT, J. A.; PAYNE, R. W.; YARROW, D. Yeast Characteristics and Identification. **Cambridge: University Press**, Cambridge. 2nd ed. 1200 pp, 1990.
- BARRETT, A. J. Classification of peptidases. In: BARRETT, A. J. (ed). **Methods in Enzymology**. New York: Academic Press, v. 244, p. 1-59, 1994.
- BATISTA-SILVA, L.; PEIXOTO, J. C.; ASTOLFI-FILHO, S.; LEOMIL, L. Diversidade bacteriana do solo de Terra Preta de Índio e Terra Mulata da Amazônia Ocidental. Universidade Federal do Amazonas, **Dissertação de Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Diversidade Biológica**. 2009.
- BHASKAR, N.; SUDEEPA, E.S.; RASHMI, H.N.; TAMIL SELVI, A. Partial purification and characterization of protease of *Bacillus proteolyticus* CFR3001 isolated from fish processing waste and its antibacterial activities. **Bioresource Technology** . v. 98, p. 2758–2764. 2007.
- BECK, E.; ZIEGLER, P. Biosynthesis and degradations of starch in higher plants. **Ann. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.**, v. 40, p. 95-117, 1989.
- BERG, J. M; STRYER, L.; TYMOCZKO, J. L. **Bioquímica**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1104 p , 2004.
- BHAT, M.K. Enzymatic processing of starch: presents and potential benefits. **Sug. J.**, v. 100, p. 372-376, 1998.
- BORNEMAN, J.; TRIPLETT, E.W. Molecular microbial diversity in soil from Eastern Amazonia: evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, n. 7, p. 2647-2653, 1997.
- BRUCHMANN, E. **Bioquímica técnica**. Zaragoza: Editorial Acribia. 1980. 233p.
- CAMARGO, F.A.O.; SANTOS, G.A.; GUERRA, J.G.M. Macromoléculas e substâncias húmicas. In: SANTOS, G.A.; CAMARGO, F.A.O. (Ed.) **Fundamentos da matéria orgânica do solo: ecossistemas tropicais e subtropicais**. Porto Alegre: Gênese, 1999. p. 27-39.
- CASTRO, G.R.; FERRERO, M.A.; ABATE, C.M.; MENDEZ, B.S.; SIFFERIZ, F. Simultaneous production of alfa e beta amilase by *Bacillus subtilis* MIR-5 in batch and continuous culture. **Biotech. Lett.**, v. 14, p. 49-54, 1992.
-

CHANG, P.L.; SCWARTZ, S.J. Characterization of the action of *Bacillus subtilis* alpha amylase on sweet potato. Starch, amylose and amylopectin. **J. Food Bioch.**, v. 12, p. 191-203, 1988.

COLOMBATTO, D.; MOULD, F.L.; BAHAT, M.K.; PHIPPS, R.H. AND OWEN, E. In vitro evaluation of fibrolytic enzymes as additives for maize (*Zea mays* L.) silage. I. Effects of ensiling temperature, enzyme source and addition level or thermophilic sources. **Animal Feed Science and Technology**, v.111, n.1, p111-128, 2004.

COWAN, D.; MEYER, Q.; STAFFORD, W.; MUYANGA, S.; CAMERON, R.; WITTWER, P. Metagenomic gene discovery: past, present and future. **TRENDS Biotechnol.**, v. 23, p. 321-329, 2005.

CRUEGER, W.; CRUEGER, A. Biotechnology: a textbook of industrial microbiology. **Madison: Science Technology**, Inc. Science Tech, Inc., 1984. 308p.

DANIEL, R. The soil metagenome - a rich resource for the discovery of novel natural products. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 15, p. 199-204, 2004.

DANIEL, R. The Metagenomics of soil. **Nature**, v. 3, p. 470-478, 2005.

DROZDOWICZ, A. Bactérias de solo. In: VARGAS, M.A. T.; HUNGRIA, M. **Biologia dos solos dos cerrados**. Planaltina: Embrapa-CPAC, p.17-66, 1997.

FALCÃO, N.P.S.; CARVALHO, E.J.M.; COMERFORD, N. Avaliação da fertilidade de solos antropogênicos da Amazônia Central. In: **Congresso da Sociedade de Arqueologia Brasileira**, XI. Grupo de trabalho: Terras Pretas Arqueológicas na Amazônia: Estado da Arte. Rio de Janeiro, 2001.

FOGARTY, W.M. AND KELLY, C.T. Recent advances in microbial amylases. In: **Microbial enzymes and biotechnology**. London: Elsevier Applied Science, p.71132, 1990.

GLASER, B.; GUGGENBERGER, G.; HAUMAIER, L.; ZECH, W. Persistence of soil organic matter in archaeological soils (Terra Preta) of the Brazilian Amazon region. In: REES, R.M.; BALL, B.C.; CAMPBELL, C.D.; WATSON, C.A. (Ed.). **Sustainable management of soils organic matter**, Wallingford, p. 190-194, 2001.

GODFREY, T.; WEST, S.I., Introduction to industrial enzymology. In: T. Godfrey, Editor, **Industrial Enzymology** (2 Ed.), Macmillan Press, West S. London, p. 1-8, 1996.

GOMES, E.; GUEZ, M.A.U; MARTIN, N.; SILVA R. Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. **Química nova**, v. 30, p.136-145, 2007.

GUPTA, R.K.; SAXENA, R.K.; KHAN, S. Bleach-stable, alkaline protease from *Bacillus* sp.. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, NE, v.21, p.135-138, 1999.

GUPTA, R.; BEG, Q.K. Bacterid alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, GE, v.59, p.15-32, 2002.

GUPTA, R.; GIGRAS, P.; MOHAPATRA, H.; GOSWAMI, V.K.; CHAUHAN, B. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. **Process Biochem.**, v. 38, p. 1599-1616, 2003.

HAKI, G.D. AND RAKSHIT, S.K. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. **Bioresource Technology**, v.89, p.17-37, 2003.

HANDELSMAN, J.; RONDON, M.R.; BRADY, S.; CLARDY, J.; GOODMAN, R.M. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. **Chem. Biol.**, v. 5, p. 245-249, 1998.

HANDELSMAN, J. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 68, p. 669-685, 2004.

HAMILTON, L. M.; KELLY, C. T.; FOGARTY, W. M. Production and properties of the raw starch-digesting α -amylase of *Bacillus* sp. IMD435. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 27-31, 1999.

JOHNVESLY, B.; NAIK, G.R. Studies on production of thermostable alkaline protease from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus* sp. JB99 in a chemically defined médium. **Process Biochemistry**, Oxford, UK, v.37, p.139-144, 2001.

KALIF, K. A. B., AZEVEDO-RAMOS, C. NUNES, A. S. Conhecendo a Amazônia. Projeto Soma Universidade Federal do Pará e Instituto de Pesquisa Ambiental da Amazônia (UFPA/IPAM) p. 29, 2000.

KERN, D.C.; COSTA, M.L. Composição química de solos antropogênicos desenvolvidos em Latossolo Amarelo derivados de lateritos. **Geociências**, v.16: p.141-156, 1997

KERN, D.C.; KÄMPF, N. Antigos assentamentos indígenas na formação de solos com terra preta arqueológica na região de Oriximiná, Pará. **Rev. Bras. Ciênc. Solo**, v. 13, p. 219-225, 1989.

KISS, S., DRAGAN-BULARDA, M., RADULESCU, D. Biological significance of enzymes in soil. **Adv. Agron.** v.27, p.25-91, 1975.

KNIGHT, V.; SANGLIER, J.J.; DITULLIO, D.; BRACCILI, S.; BONNER, P.; WATERS, J.; HUGHES, D.; ZHANG, L. Diversifying microbial natural products for drug discovery. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.62, p.446-458, 2003.

KUMAR, C.G.; TAKAGIM H. Microbial alkaline proteases: from a bioindustrial view point. **Biotechnology Advances**, New York, v.17, p.561-594, 1999.

KOSSMANN, J., LLOYD, J. Understanding and influencing starch biochemistry. **Crit. Rev. Plant Sci.**, v. 19, p. 171-226, 2000.

LEDERBERG, J., LEDERBERG, E.M. Replica plating and indirect selection of bacterial mutants. **Wisconsin**, v. 63, p. 399-406, 1951.

LEIGHTON, T .J.; DOI, R. H.; WARREN, R.A. J.; KELLN, R. A. The relationship of serine protease activity to RNA polymerase modification and sporulation in *Bacillus subtilis*. **J. Mol. Biol.**, v.76, p.103-122, 1973.

LEOMIL, L.; REIS, A.M.M.; TAVARES, P.; ARAUJO, J.F.; KRUGER, R.H.; ASTOLFI-FILHO, S.A. Construção de biblioteca metagenômica de Terra Preta de Índio. **Anais do 24º Congresso Brasileiro de Microbiologia, Brasília**, p. 56, 2007.

MACALLISTER, R.V. Nutritive sweeteners made from starch. **Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.**, v. 36, p. 15-57, 1979.

MOREIRA, A.; MALAVOLTA, E. Variação das propriedades químicas e físicas do solo na matéria orgânica em agrossistemas na Amazônia Ocidental (Amazonas). Piracicaba: **CENA/USP**, 2002. 79p.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Lenhinger: Princípios de Bioquímica. 4 ed. São Paulo: **Sarvier**, 2004, 1119p.

OLIVEIRA, I.M.A.; SILVA, F.T.; MARKES, T.A. Produção de Xarope de Frutose. **Monografia da Faculdade de Engenharia de Alimentos - UNICAMP**, Campinas - SP, 1993, 80p.

PRETORIUS, I. S. & LAMBRECHTS, M. G. The glucoamylase Multigene Family in *Saccharomyces cerevisiae* var. diastaticus: An Overview. **Critical Reviews in Biochem. Mol. Biol.**, v.26, p.53-76, 1991.

QUAGLIA, G. Ciência y Tecnologia de la Panificación. Zaragoza: **Editorial Acribia**, 1991, 485 p.

RAO, M. B.; TANKSALE, A.M.; GHATGE, M.S. and DESHPANDE, V.V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, p. 597-635, 1998.

RONDON, M.R.; AUGUST, P.R.; BETTERMANN, A.D.; BRADY, S.F.; GROSSMAN, T.H.; LILES, M.R.; LOIACONO, K.A.; LYNCH, B.A.; MacNEIL, I.A.; MINOR, C.; TIONG, C.L.; GILMAN, M.; OSBURNE, M.S.; CLARDY, J.; HANDELSMAN, J.; GOODMAN, R.M. Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 66, p. 2541-2547, 2000.

SAHA, B.C.; ZEIKUS, J.G. Cyclodextrin degradum enzymes. **Starch**, v. 44, p. 312-315, 1992.

SAID, S.; PIETRO, R.C.L.R. Enzymes as biotechnological products in the pharmaceutical sciences. **Modern Biotechnology in Medicinal Chemistry Industry**, Ed. Carlton A. Taft, Research Signpost, India, cap. 5, 2006.

SAIKI, R. K.; GELFAND, D. H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S. J.; HIGUCHI, R.; HORN, G. T.; MULLIS, K. B.; ERLICH, H. A. Primer-directed enzymatic amplification of dna with a thermostable dna polymerase. **Science**, v. 239, p. 487-491, 1988.

SAITO, N. Thermophilic extracellular α -amylase from *Bacillus licheniformis*. **Arch Biochem. Biophys.** v.155, p.290-298, 1973.

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

SAUER, J.; CHRISTENSEN, T.; FRANDBSEN, T.P.; MIRGORODSKAYA, E.; MCGUIRE, K. A.; DRIGUEZ, H.; ROEPSTORFF, P.; SIGURSKJOLD, B.W.; SVENSSON, B. Stability and function of inter domain linker variants of glucoamylase 1 from *Aspergillus niger*. **Biochem.**, v. 40, p. 9336-9346, 2001.

SCHLOTTER, M.; LEBUHN, M.; HEULIN, T.; HARTMANN, A. Ecology and evolution of bacterial microdiversity. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 24, p. 647-660, 2000.

SMITH, N.J.H. Anthrosol and human carrying capacity in Amazonia. **Ann. Assoc. Am. Geog.**, v. 70, p. 553-566, 1980.

STEINER, C.; TEIXEIRA, W.G.; LEHMANN, J.; ZECH, W. Microbial response to charcoal amendments of highly weathered soils and Amazonian dark earths in Central Amazonia - preliminary results. In: GLASER, B.; WOODS, W.I. (Ed.). **Amazonian dark earths; explorations in space and time**. p.183-193, 2004.

TEIXEIRA, W.G.; MARTINS, G.C. Soil physical characterization. In: LEHMANN, J.; KERN, D.C.; GLASER, B.; WOODS, W.I. (Ed.). **Amazonian dark earths; origin; properties and management**. p. 271-286, 2003.

VIHINEN, M.; MANTSALA, P. Microbial amylolytic enzymes. **Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.**, v.24, p.329-418, 1989.

WOODS, W.I. Development of antrosol research. In: LEHMANN, J.; KERN, D.C.; GLASER, B.; WOODS, W.I. (Ed.). **Amazonian dark earths; origin, properties and management**. p. 3-14, 2003.

ZHANG, P.Y.; WHISTLER, R.L.; BEMILLER, J.N.; HAMAKER, B.R. Banana starch: production, physicochemical properties, and digestibility - a review. **Carbohydr. Polym.**, v. 59, p. 443-458, 2005.

CAPÍTULO 01

Caracterização parcial de amilases e proteases obtidas de clones isolados da Biblioteca Metagenômica de Terra Preta de Índio

1. INTRODUÇÃO

As enzimas são em sua grande maioria de origem protéica e estão envolvidas em todos os processos bioquímicos do metabolismo celular, atuando na catálise das reações bioquímicas, sendo capazes de degradar moléculas extremamente complexas em pequenas unidades, como por exemplo, a decomposição do amido até glicose [1].

A utilização das enzimas pelo homem data desde a Antiguidade, no qual o homem explorava as enzimas através da fermentação natural para a produção de pães, queijo, vinho e cerveja. Atualmente, as enzimas são isoladas principalmente de micro-organismos e utilizadas em diversos setores industriais por proporcionarem uma alta especificidade pelo substrato, um aumento na estabilidade de reação, além de ser um produto de origem orgânica que não agride o meio ambiente [2,3].

As hidrolases são as enzimas mais aplicadas e produzidas no mercado mundial, dentre estas as amilases e proteases [4]. Amilases estão amplamente distribuídas na natureza sendo responsáveis pela degradação da molécula de amido. O amido é composto por duas principais estruturas químicas conhecidas como: amilose e amilopectina. Estas estruturas representam 98% do peso seco

do amido, no entanto o teor de cada polissacarídeo depende diretamente da fonte em questão [5].

As amilases representam uma grande parte do mercado mundial de enzimas, sendo que a maior aplicação está na produção de hidrolisados de amidos [4]. Já as proteases são enzimas que catalisam a hidrólise de ligações peptídicas entre as proteínas, estas enzimas representam atualmente 40% do mercado mundial, devido sua ampla utilização para modificação de propriedades funcionais de proteínas, sendo um grande destaque na industrial de alimentos e também são utilizadas na produção de detergentes, na recuperação e aproveitamento de resíduos e subprodutos, entre outros [5,6,7].

Foi estimado que em 2005 a venda mundial de enzimas superou a faixa de 2 bilhões de dólares, sendo que deste mercado 60% destas enzimas produzidas são de origem europeia, e o restante produzido pelos Estados Unidos e Japão [8]. No Brasil, a procura por microrganismos que expressam enzimas de potencial biotecnológico se revela de maior importância devido à dependência do país na produção de enzimas, uma vez que não possui um sistema de produção nacional, sendo dependente de empresas internacionais.

A biodiversidade da Amazônia constitui uma fonte de valor altíssimo para inovação em biotecnologia, assim é muito importante o estudo dos microrganismos que produzam eficientemente sistemas enzimáticos de interesse, o estudo da condição ótima de produção, purificação, caracterização bioquímica dessas enzimas e elucidação de seus mecanismos de ação e de regulação, além de estudos genéticos e moleculares, os quais são fundamentais para o

desenvolvimento de processos biocatalíticos economicamente mais competitivos.

Para ter acesso aos recursos genômicos dos micro-organismos não-cultiváveis, estudos recentes descrevem a seleção funcional direta desses novos genes a partir das bibliotecas metagenômicas, isto apresenta como vantajoso para o conhecimento rápido de bactérias ainda desconhecidas e não-cultiváveis [9].

Este trabalho produziu e caracterizou parcialmente enzimas amilolíticas e proteolíticas de clones isolados a partir de uma seleção funcional da biblioteca metagenômica de Terra Preta de Índio (TPI) da região Amazônica, visando desenvolver os recursos biotecnológicos oriundo da enorme microbiota existente na biodiversidade Amazônica.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Biblioteca metagenômica

O material utilizado para a seleção de micro-organismos produtores de amilases e proteases foi a biblioteca metagenômica construída a partir de Terra Preta de Índio, proveniente do município de Presidente Figueiredo, localizado a 107 km da cidade de Manaus, no Estado do Amazonas. A biblioteca foi construída por Leomil [10] utilizando o foscímio (pCC1Fos™ - EPICENTRE *Biotechnologies*) como vetor. A biblioteca obteve aproximadamente 10.000 clones, contendo insertos com aproximadamente 40.000 pares de base. Esta biblioteca encontra-se armazenada no *biofreezer* -80°C no Laboratório de Tecnologias do DNA, na Universidade Federal do Amazonas.

2.2. Isolamentos de clones para seleção de amilases e proteases

Para selecionar os clones presentes na biblioteca, foi necessário diluir a amostra inicial armazenada no *biofreezer* -80°C em uma diluição de 1:10³, em meio Luria-Bertani (LB) líquido. Após esta etapa, foram realizadas diluições seriadas de 10³ a 10⁹ a partir da diluição inicial, com um volume final de 100 µL para cada diluição. A fim de selecionar os clones, foi acrescentado às placas de Petri contendo meio ágar LB, o antibiótico cloranfenicol na concentração de 12 µg/mL. Para cada diluição, foram semeados 50µL da amostra diluída, em duplicata, nas placas de Petri e incubadas na estufa a 37°C durante 18 horas. A diluição utilizada no teste de seleção de clones foi aquela que apresentou um crescimento significativo e espaçado de colônias nas placas.

2.3. Teste da ação amilolítica e proteolítica para seleção dos clones positivos

Para o isolamento dos clones amilolíticos, os mesmos foram semeados em placas de meio Ágar LB contendo 0,5% (p/v) de amido e para a determinação da ação proteolítica, os clones foram crescidos em placas contendo o meio Ágar LB com 1% (p/v) de caseína (leite desnatado). Em cada placa contendo o meio de cultura e o substrato, cada clone esteve em um espaço individualizado, sendo que, inoculado na mesma placa, um micro-organismo como controle positivo (*Bacillus liqueniformis* ATCC 6348) e um controle negativo (*Escherichia coli* ATCC 25922). As placas foram incubadas em estufas por 24 horas a 37°C [11] e, em seguida, foram visualizados os halos de ação proteolítica (indicativos da atividade enzimática), para a ação amilolítica foi adicionado a placa contendo os clones o revelador (iodo sublimado) para visualização do halo amilolítico.

A atividade enzimática dos clones foram estimadas semi-quantitativamente usando um índice enzimático (IE) que expressa a relação do diâmetro médio do halo de degradação e o diâmetro médio da colônia [12]. Ao testar as colônias produtoras das referidas enzimas, os clones metagenômicos escolhidos foram que apresentaram melhores índices enzimáticos, perante este ensaio.

2.4. Produção das enzimas amilolíticas e proteolíticas

Os clones selecionados foram cultivados em meio líquido LB contendo 12 µg/mL de cloranfenicol, inoculando $1,5 \times 10^8$ Unidades Formadoras de Colônia por mL (UFC/mL), para os dois micro-organismos pesquisados, diferenciando-se os substratos: para o inóculo dos clones amilolíticos fez necessário adicionar

0,5% (p/v) de amido e para fermentação dos clones proteolíticos o meio de cultura continha 1% (p/v) de gelatina. A produção da enzima foi conduzida por incubação durante 24 h em uma estufa com agitação (150 rpm) na temperatura de 37°C. Após a fermentação, a biomassa bacteriana foi separada do extrato enzimático por centrifugação (12.000 g/ 5 min. a 4°C) [13]. O sobrenadante foi utilizado como extrato enzimático para detecções das atividades enzimáticas.

2.5. Ensaio enzimáticos

2.5.1. Ensaio Quantitativo da Atividade Dextrinizante da amilase

A metodologia utilizada para detectar esta atividade seguiu o protocolo descrito por Fuwa [14], preparando a solução do substrato utilizando 1 g de amido solúvel (MERCK) em 100 mL de água destilada. Retirou-se uma alíquota de 60 µL do extrato enzimático bruto e adicionou-se 40 µL de tampão fosfato de sódio (50 mM, pH 6,5) e 100 µL da solução de amido solúvel 1% (p/v). O sistema foi incubado em banho-maria, por 30 minutos, na temperatura 40°C. Interrompeu-se a reação com 200 µL de ácido acético e 200 µL do reagente FUWA (1% iodo em etanol absoluto, 10% iodeto de potássio e água destilada na proporção 1V:1V:3V), completando a mistura com água destilada para um volume final de 10 mL. Mediu-se a absorbância em 660 nm, comparando essa reação com o branco, preparado com 200 µL de tampão acetato de sódio, 200 µL de ácido acético e 200 µL de FUWA [14], acrescentado ao volume 9,4 mL de água destilada.

O amido consumido na reação foi quantificado de acordo com uma curva padrão construída com concentrações crescentes de amido solúvel (0 a 10 mg/mL de

amido). Definiu-se uma unidade (U) de amilase como a quantidade de enzima necessária para hidrolisar 0,1 mg de amido por minuto a 40°C [14].

2.5.2. Ensaio Quantitativo da Atividade Sacarificante da amilase

Realizou-se a atividade sacarificante da amilase utilizando a metodologia de Bernefeld [15] modificado. Foram incubado 60 µL do extrato enzimático em 40 µL de tampão fosfato de sódio (50 mM, pH 6,5) e 100 µL de amido solúvel (MERCK) 1% (p/v). O ensaio foi incubado durante 30 minutos a 40°C, em seguida, foram adicionados 1,5 mL de ácido dinitrosalicílico (DNS) para que a reação enzimática seja inativada. Posteriormente, incubou-se a reação por 5 minutos em banho-maria a 100°C, ocorrendo a formação do composto colorimétrico. Após o resfriamento, adicionou-se 8,3 mL de água destilada, sendo o sistema, desta forma, foi homogeneizado e, em seguida mensurou-se a absorbância em 540 nm. Preparou-se o branco da reação contendo 100 µL do tampão fosfato de sódio, 100 µL de amido 1% (p/v), 1,5 mL de DNS e 8,3 mL de água destilada.

Os açúcares redutores formados foram quantificados de acordo com a curva padrão de maltose [15] na qual uma unidade (U) de amilase é definida como a quantidade de enzima liberada em 0,1 mg de açúcar redutor por minuto a 40°C. A curva padrão para a realização do cálculo enzimático foi pelas concentrações de 0 a 10 mg/mL de maltose.

2.5.3. Ensaio Quantitativo da Atividade Proteolítica da Protease

A atividade proteolítica foi realizada de acordo com Leighton [16]. Utilizou-se o substrato azocaseína 1% (p/v) (Sigma, St. Louis, MO USA) dissolvida em tampão 0,2 M Tris-HCl, pH 7,2. Para a realização do ensaio foram adicionados

150 µL do extrato enzimático bruto em 250 µL de azocaseína (10mg/mL), sendo incubado por 1 hora a 30°C em uma câmara escura. Interrompeu-se a reação adicionando 1,2 mL de ácido tricloroacético (TCA) 10% (p/v), em seguida, centrifugou-se o ensaio a 10.000 g/10 min a temperatura a 4°C. Após a centrifugação, foram retirados 1,6 mL do sobrenadante e adicionado ao mesmo 1,4 mL de hidróxido de sódio (NaOH) 1M para homogeneizar o sistema. A leitura foi realizada em espectrofotômetro digital marcou comprimento de onda de 440 nm. Para a leitura inicial foi preparado um branco da reação que continha: 150 µL do tampão 0,2 M Tris-HCl (pH 7,2), 250 µL da azocaseína 1% (p/v), 1,2 mL TCA. Desta solução, foram retirados 1,6 mL do sobrenadante, que foi centrifugado e seu sobrenadante foi adicionado 1,4 mL de NaOH 1M.

Uma unidade de atividade proteolítica foi definida como a quantidade de enzima capaz de produzir um aumento na absorvância de 0,001/min em uma hora a 440 nm, sendo expressa em U/mL [16].

2.6. Caracterização parcial das enzimas produzidas pelos clones isolados

2.6.1. Determinação do pH ótimo

Para a determinação do pH ótimo da atividade amilolítica o complexo enzimático foi incubado com o substrato em diferentes pHs utilizando a solução de tampão McIlvane, com pH variando entre 3,0 a 8,0 e para cada pH realizou-se o ensaio enzimático utilizando a metodologia de FUWA [14], para a determinação da atividade amilolítica frente aos diferentes pHs.

- Proteases

Para a determinação do pH ótimo da atividade proteolítica o complexo enzimático foi incubado com o substrato em diferentes pHs utilizando a solução de tampão Tris-HCl 0,2M com pH, variando entre 5,0 a 10,0 e para cada pH realizou-se o ensaio enzimático utilizando a metodologia descrita por Leighton [16];

2.6.2. Determinação da estabilidade ao pH

- Amilases

Para a determinação da estabilidade ao pH da atividade amilolítica foi utilizada a solução de tampão McIlvane, com pH variando entre 3,0 a 8,0. O extrato bruto foi diluído 1:1 em tampão sendo incubado por 24 horas em cada pH a temperatura ambiente, em seguida, realizou-se o ensaio enzimático utilizando a metodologia de FUWA [14], para a determinação da atividade amilolítica frente aos diferentes pHs.

- Proteases

O ensaio para determinar a estabilidade frente ao pH da atividade proteolítica utilizou a solução de tampão Tris-HCl 0,2M com pH, variando entre 5,0 a 10,0 no qual as amostras foram incubadas em cada pH e a cada intervalo de 15 minutos (0 a 90 minutos), foram retiradas alíquotas do extrato incubado e determinada a sua atividade enzimática.

2.6.3. Determinação da Temperatura Ótima

- Amilases

Para determinar a temperatura ótima amilolítica, os ensaios foram incubados em pH ótimo da atividade enzimática em temperaturas que variaram de 30 a 100°C em 60 minutos de incubação. Utilizou-se a metodologia de Fuwa [14] para dosar a atividade enzimática.

- Proteases

Determinou-se a temperatura ótima utilizando a metodologia de Leighton [16], variando apenas a temperatura de incubação de 25 a 70°C durante 60 minutos.

2.6.3. Determinação da Termoestabilidade

- Amilases

Para a determinação da termoestabilidade das amilases, o extrato bruto foi incubado por até 120 minutos em temperaturas que variaram de 30 a 100°C. Determinou-se a atividade enzimática valendo-se da metodologia descrita no item 2.5.1 [14].

- Proteases

Verificou-se a termoestabilidade proteolítica nas temperaturas de 25, 30, 40, 50, 60 e 70°C, por um período de até 90 minutos. O extrato bruto foi incubado nestas temperaturas e a cada intervalo de 15 min, retirou-se uma alíquota do extrato incubado e determinou a atividade enzimática, como descrito no item 2.5.3 [16].

2.7. Estatística Experimental

Todos os experimentos foram realizados em triplicata, e os valores obtidos foram apresentados na forma de média ponderada, com os respectivos desvios padrão. O limite de significância para todas as análises estatísticas assumiu o valor de $\alpha=0,05$, resultando, portanto em um intervalo de confiança de 95%.

2.8. Extração do DNA plasmidial

Para os clones que apresentaram atividades amilolíticas e proteolíticas, procedeu-se uma extração do DNA plasmidial destes clones, a partir de uma cultura crescida por 18 horas contendo 15 mL de meio LB, cloranfenicol 12 $\mu\text{g/mL}$ e o clone com atividade enzimática. Utilizou-se o kit de extração plasmidial da “GE plasmidPrep Mini spin Kit”, e a cultura do clone crescido, centrifugado e o sobrenadante, descartado. O sedimento celular foi ressuspensionado uma única vez em uma solução tampão contendo RNase, ácido acético, hidróxido de sódio, clorofórmio e isopropanol. Ao final, foi lavado o DNA plasmidial/fosmídeo com Etanol 70% e foi ressuspensionado em 50 μL de H_2O Milli-Q. Para a visualização da presença dos clones, foi realizada uma corrida eletroforética em gel de agarose a 0,8% corado com brometo de etídio (0,5 mg/mL) e visualizado sob luz ultravioleta (U.V.).

2.9. Isolamento do gene amilolítico - PCR

O gene da α -amilase *Bacillus liqueniformis* (*amy1N*) e de *Bacillus subtilis* D2 (*amyE*) foi isolado a partir do DNA fosmidial extraído dos clones amilolíticos, pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) [17], utilizando a Taq DNA

Polimerase *High-Fidelity* (Invitrogen), com os iniciadores construídos [18,19] como segue abaixo.

Tabela 3 - Iniciadores utilizados para amplificar o gene *amyIN* e *amyE* dos clones isolados

Iniciadores 5' – 3'	Sítio de Restrição
TamyF – CGGGATCCAATCTTAAAGGGACGCTGATGCAG	<i>Bam</i> HI
TamyR – CGCCCGGGCTATCTTTGAACATAAATTGAAACCG	<i>Sma</i> I
PamyF – GCGAATTCGTGACCGCGTCATCGGTC	<i>Eco</i> RI
PamyR - GCAGCGGCCGCATTCTACAGCAGAAGTGGAAGATATATGG	<i>Not</i> I

A reação foi realizada nas seguintes condições: 40 ng de DNA, tampão 10X 0,25 mM de dNTPs, 2,5 mM de MgCl₂, 5 mM de cada iniciador, 2,5 U de Taq DNA polimerase “High-Fidelity” e água deionizada esterilizada para um volume total de 25 µL. O programa de PCR utilizado em termociclador (Thermo) era composto pelos seguintes passos: desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos; seguida de ciclo de 35 vezes com um passo de desnaturação a 94°C por 20 segundos, anelamento dos iniciadores com temperatura a 56°C por 30 segundos e um passo de extensão das fitas a 72°C por 2 minutos; além de um passo de extensão final a 72°C por 2 minutos. Os produtos da reação da PCR foram analisados quanto a sua qualidade e concentração por eletroforese utilizando gel de agarose a 0,8% corado com brometo de etídio (0,5 mg/mL) e visualizado sob luz U.V. e fotodocumentado.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Seleção dos clones com atividade amilolítica e proteolítica

Foram isolados 1.344 clones da biblioteca metagenômica de Terra Preta de Índio (TPI), para selecionar os clones com atividades enzimáticas para amilase e protease. Após a seleção em placas de Petri com os respectivos substratos, foram obtidos quatro clones amilolíticos (P1C4, P6F1, P5C4 e P6C12) que apresentaram a formação do halo de hidrólise de amido; e três clones proteolíticos (P3A4, P6A1 e P6H6), que apresentaram a formação do halo de proteólise conforme mostra a Figura 1.

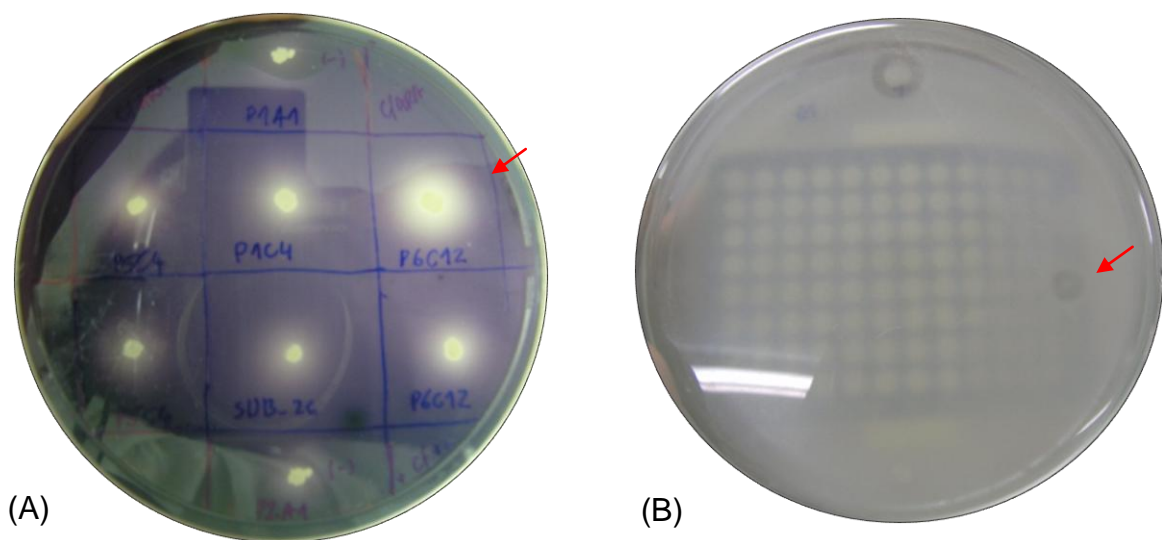


Figura 1 - Atividades enzimáticas dos clones presentes da biblioteca metagenômica. A: Clones que formaram halos de hidrólise de amido após a revelação com o vapor de iodo; B: Clones que formaram o halo de proteólise

Com os clones isolados, determinou-se o índice enzimático através da relação entre o diâmetro do halo (dh) e o diâmetro da colônia (dc) [12]: índice de amilólise (Ia) e o índice de proteólise (Ip), conforme demonstra a Tabela 4, com o intuito de selecionar os melhores clones produtores de amilase e protease, para produção em meio líquido.

Tabela 4 - Atividades enzimáticas estimadas semi-quantitativamente, utilizando o índice enzimático descrito [12]

Clone	Substrato no meio de cultivo	Diâmetro médio do halo (mm)	Diâmetro médio da colônia (mm)	Índice Enzimático (U/mL)
P1C4	Amido	6,5	3,3	2,16
P6F1	Amido	7,0	3,0	2,33
P5C4	Amido	7,0	3,0	2,33
P6C12	Amido	14,0	3,0	4,66
P3A4	Caseína	46,0	3,0	15,33
P6A1	Caseína	29,0	3,4	8,53
P6H6	Caseína	20,0	3,5	5,72

O número de clones positivos encontrados é superior aos números de clones descritos por Yun [20] e Rondon [21] que encontraram apenas um clone amilolítico e um clone proteolítico entre 30.000 clones testados das suas respectivas bibliotecas. Estes diferentes resultados podem ser explicados devido a biodiversidade de micro-organismos do solo amazônico que pode estar influenciando no número superior de clones positivos encontrados frente aos clones que haviam sido descritos de outras regiões.

Os índices de amilólise são inferiores aos demonstrados em outros micro-organismos isolados diretamente do solo, principalmente quando se compara ao gênero *Bacillus* sp. [22,23]. O clone P6C12 (4,66 U/mL) foi o clone que

apresentou melhor expressão da atividade amilolítica, como pode ser visualizado na Figura 1. Os clones P1C4, P6F1 e P5C4 produziram em média 2,27 U/mL. Para a produção da amilase em meio líquido, foram selecionados os 4 clones, apesar de 3 clones demonstrarem uma baixa produção semi-quantitativa. Muitos trabalhos demonstram que nem sempre o micro-organismo que produz o maior halo frente ao seu substrato será aquele que irá expressar melhor este produto em meio líquido [24]. Os halos obtidos dos 4 clones possuem pequenas diferenças, o que tornou necessária a expressão e caracterização em meio líquido e caracterizar parcialmente estas enzimas, para então se diferenciar melhor a produção enzimáticas destes 4 clones.

As atividades de proteólise foram bastante elevadas, quando comparadas aos clones amilolíticos, como encontrado no clone P3A4, que produziu 15,33 U/mL em 24 horas de cultivo. Os clones P6A1 e P6H6 produziram apenas 8,53 e 5,72 U/mL, respectivamente. Estes resultados demonstraram uma produção similar a proteases de origem bacteriana, quando cultivado em meio de cultura em pH 7,0. Riffel [25] isolou linhagens de *Bacillus* sp. que produziram atividade proteolíticas entre 5-8 U/mL, utilizando o índice de proteólise. Para a expressão em meio líquido escolheu-se apenas o clone P3A4 que produziu nitidamente uma elevada produção proteolítica frente aos outros 2 clones da biblioteca isolados.

3.2. Produção enzimática

Os resultados iniciais obtidos da cinética de produção dos clones produtores de amilase, foram inferiores aos resultados obtidos na dosagem semi-quantitativa. Para otimizar o processo de expressão, adicionou-se ao meio de cultivo 0,2 mg/mL de arabinose, que é um açúcar que induz o gene de multicópias do fosmídeo, presente nestes clones, auxiliando na melhor expressão da enzima [20], como pode-se observar nas Figuras 2 e 3.

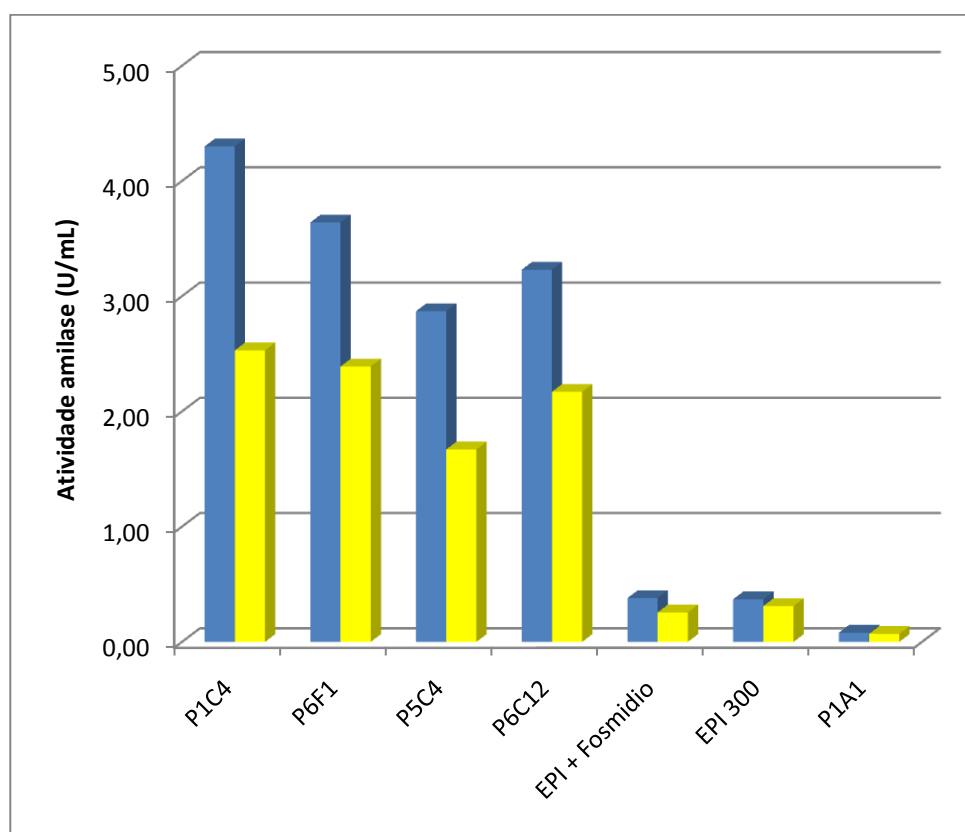


Figura 2 - Atividade enzimática da amilase dos clones positivos em 24 horas de cultivo, determinada com e sem a indução de arabinose no meio de cultura, com agitação de 150 rpm. No gráfico estão representados (■) com arabinose e (■) sem arabinose

A produção de amilase pelos clones recombinantes, após a indução, apresentou atividade enzimática maior ao final de 24 horas (um aumento em média de 11% do que de 18 horas), com exceção do clone P1C4 que demonstrou uma pequena queda em sua atividade, como pode ser observado na Figura 4. Para um processo de aplicação industrial este aumento torna-se insignificativo estatisticamente, devido ao intervalo de tempo representar 1/3 da produção enzimática para uma baixa produção neste período. Com isso, o período de 18 horas de produção enzimática torna-se muito mais vantajoso frente ao período de 24 horas [8].

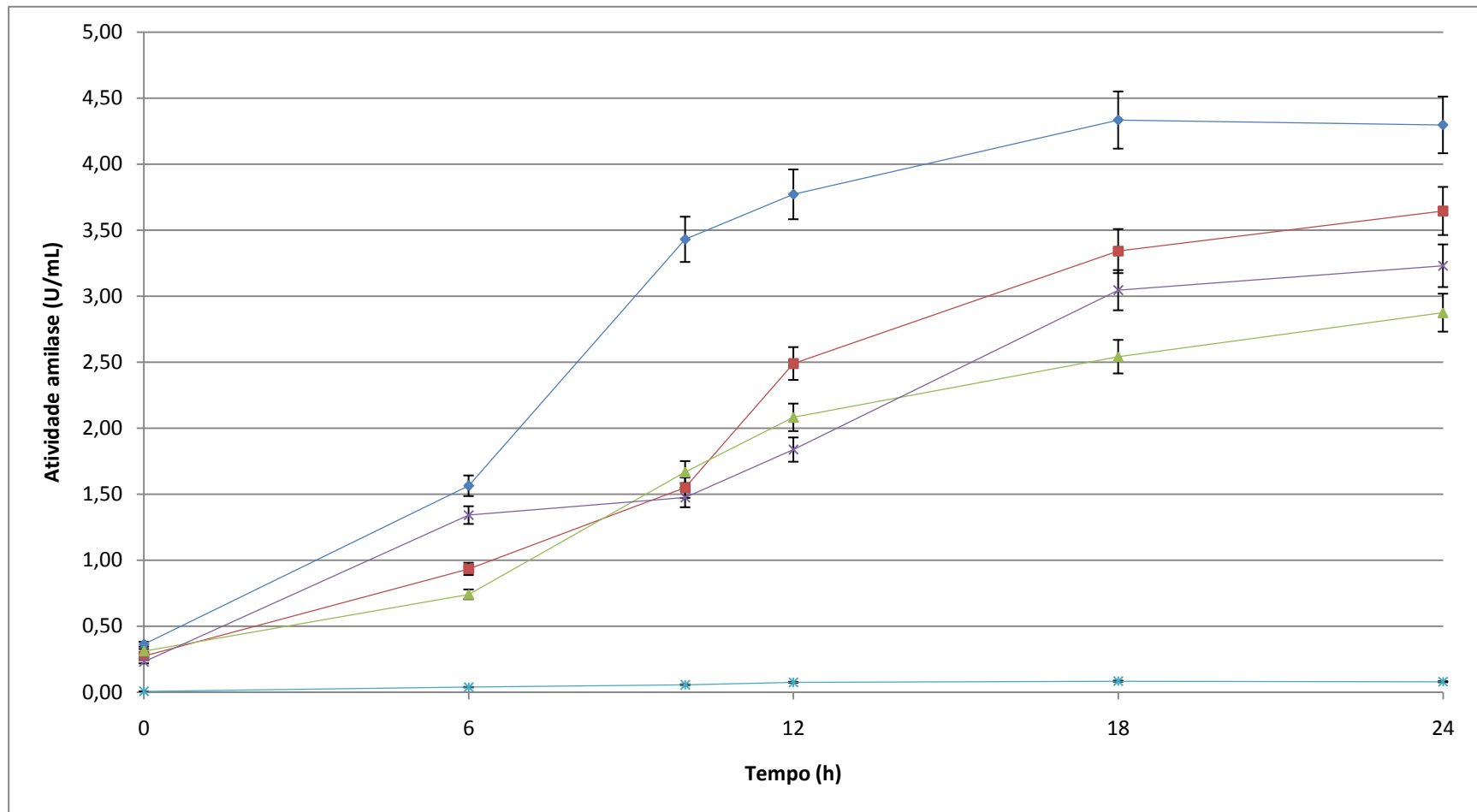


Figura 3 – Cinética atividade enzimática da amilase por tempo de cultivo com arabinose dos clones positivos durante 24 horas induzido com arabinose, a 37°C, com agitação de 150 rpm. No gráfico estão representados os clones (◆) P1C4, (■) P6F1, (▲) P5C4, (×) P6C12 e (*) P1A1

O clone P1C4 obteve a maior produção entre os clones amilolíticos, sendo a sua atividade de 15, 33 e 24% maior do que os clones P6F1, P564 e P6C12, respectivamente em 24 horas de fermentação. O clone P6C12 que demonstrou maior halo amilolítico em placa, quando cultivado em meio líquido, teve sua produção enzimática reduzida em 30,5%. Para todos os ensaios enzimáticos foi inoculado o clone P1A1, que é um clone de biblioteca metagenômica que não apresentou formação de halo amilolítico, servindo como um controle negativo para os ensaios de produção enzimática, e pode-se observar que o mesmo não produziu nenhuma unidade enzimática significativa.

Como citado por Yun [20], a arabinose presente no meio de cultivo induziu com sucesso a produção de amilase pelos clones, sendo que o clone P1C4 foi o que apresentou o maior aumento em sua produção de 41,2 e 82,3% em sua atividade dextrinizante e sacarificante, em 24 horas de cultivo, respectivamente. Todos os clones demonstraram maior expressão enzimática quando induzidos pela arabinose.

Tabela 5 - Atividades enzimáticas dextrinizante e sacarificantes dos clones amilolíticos isolados, o extrato enzimático bruto incubado na temperatura de 40°C por 30 minutos

Clones	Atividade Dextrinizante (U/mL)			Atividade Sacarificante (U/mL)		
	Sem Arabinose	Com Arabinose	Produção Elevada	Sem Arabinose	Com Arabinose	Produção Elevada
P1C4	2,53	4,30	41,2%	0,69	3,89	82,3%
P6F1	2,39	3,64	34,3%	1,13	2,97	62,0%
P5C4	1,67	2,87	41,8%	1,36	4,15	67,2%
P6C12	2,17	3,23	32,8%	0,91	3,04	70,1%
P1A1	0,07	0,08	41,2%	0,25	0,46	45,7%

Os resultados obtido como o clone P1C4 (4,3 U/mL) são inferiores aos demonstrados quanto comparado a outros micro-organismos isolados diretamente do solo (principalmente o gênero *Bacillus* sp.) para a expressão da mesma enzima, utilizando a cultura em frascos sob agitação e os mesmos métodos de ensaios enzimáticos [22,23]. Entretanto estes resultados são variáveis, pois Marco [26] expressou uma α -amilase de *B. subtilis* D2 em *E. coli* e obteve uma atividade enzimática do sobrenadante após 24 horas de cultivo, com uma produção de apenas 1,3 U/mL, sendo inferior a expressão demonstrada pelos clones produtores de amilases isolados neste trabalho.

A atividade enzimática sacarificante mostrou valores próximos da atividade dextrinizante, podendo inferir que os clones podem estar produzindo dois ou mais tipos de amilase [4]. Porém, esta maior atividade dextrinizante é característica de uma α -amilase de origem bacteriana que atua na hidrólise do amido resultando dextrinas [27].

Na fermentação da enzima no período de 10 horas de fermentação, o clone P3A4 produziu 26,3 U/mL de protease no extrato bruto, como se pode observar na Figura 4.

No período de 12 horas de incubação o clone perde 48,7% da sua produção enzimática, em relação a sua produção de 10 horas, sendo sua atividade relativa 24,5% menor do que no período de inicial (0h), após 6 horas de cultivo sua atividade aumenta em 48,8%. Rao [6] descreve que as proteases são enzimas de suma importância fisiológica para os organismos, logo sua necessidade de produção é prioritária, por isso sua larga produção em um curto período de tempo. Trabalhos demonstram uma atividade proteolítica secundária [1,28,29], no qual tem-se uma atividade inicial e após um período de tempo estas enzima tem sua atividade reduzida, por alguma necessidade fisiológica do micro-organismo e após uma período de tempo a enzima retorna a ser excretada novamente.

A cinética de produção do clone proteolítico demonstrou a produção de uma enzima secundária após 12 horas, descrita em trabalhos de caracterização enzimática de *Bacillus* sp. Alguns autores também fazem referencia a produção de uma segunda enzima proteolítica no extrato, por tratar-se de um extrato bruto, explicando a presença de duas enzimas atuando simultaneamente [30].

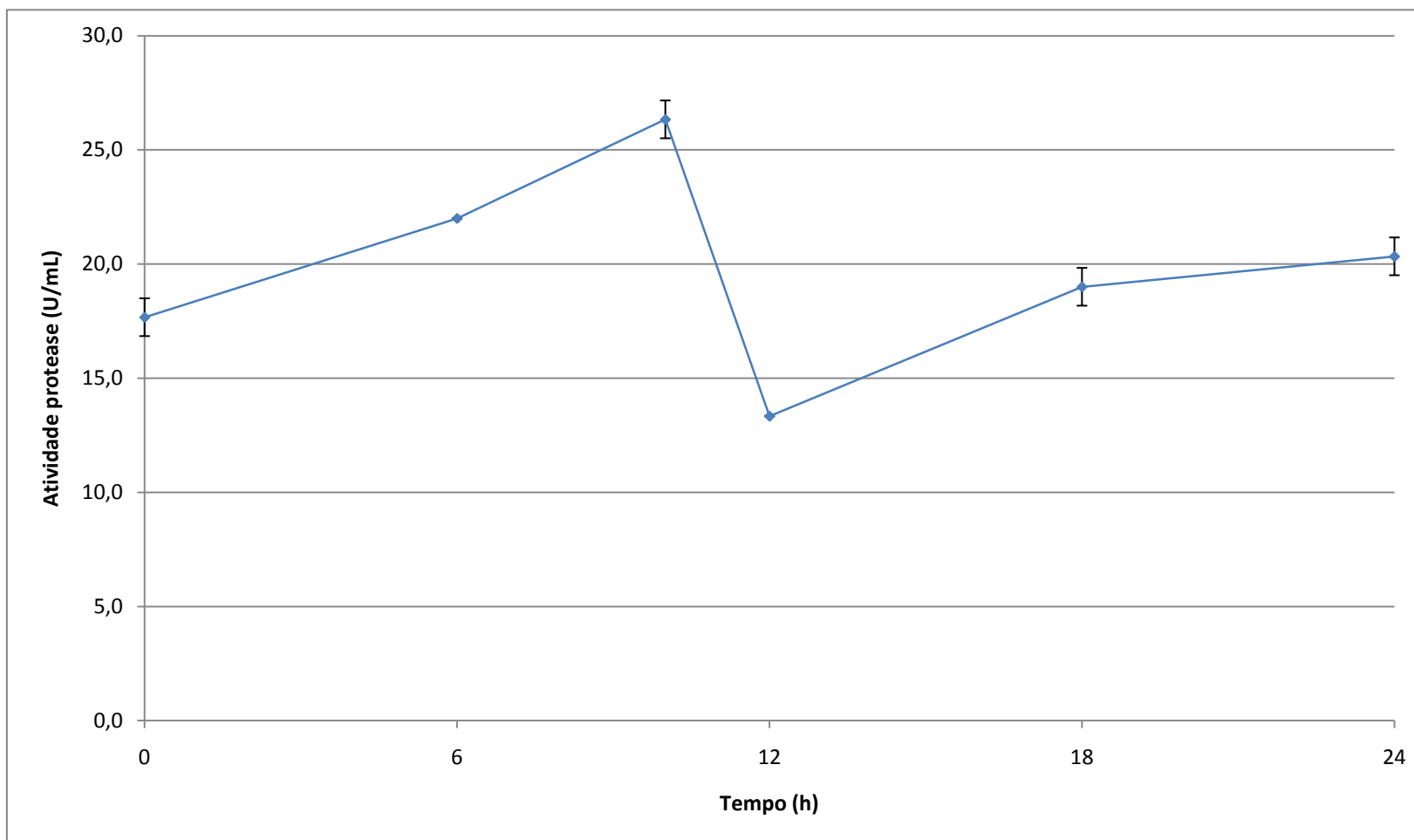


Figura 4 - Cinética de produção da protease do clone P3A4 durante 24 horas a 37°C, com agitação de 150 rpm. Atividade enzimática da amilase por tempo de cultivo

Os resultados obtidos da atividade enzimática do clone P3A4 foi de 26,3 U/mL sendo uma produção significativa para uma expressão bacteriana já descrita em trabalhos com o gênero *Bacillus* sp. [28,30]. Já o trabalho de Joo e Chang [7] demonstra uma produção enzimática de 107,9 U/mL em 48 horas por *Bacillus* sp., sendo quatro vezes superior a produção máxima do clone isolado.

Os fungos e leveduras são os micro-organismos que produzem proteases em escala elevada como descrito por Neves [31] que obtiveram 333 U/mL de protease em 72 horas em cultivo de leveduras na região Amazônica. Porém, as proteases bacterianas apresentam inúmeras aplicações na indústria alimentícia e química, principalmente do gênero *Bacillus*, que possuem alta capacidade de produção de proteases alcalinas [7].

3.3. Caracterização Parcial das Amilases

3.3.1. Atividade Enzimática em diferentes pHs

Todas as enzimas são sensíveis à concentração do íon H^+ do meio, existindo uma zona de pH em que a atividade enzimática é máxima. Isso ocorre, porque as enzimas possuem grupos ionizáveis, pertencentes aos resíduos de aminoácidos da molécula, de forma que as alternâncias de pH podem mudar sua conformação, sua capacidade de união com o substrato e a atividade catalítica dos grupos que formam o sítio ativo [32].

A atividade enzimática dos extratos brutos foram avaliadas em diferentes pHs a fim de determinar o pH ótimo da atividade, e também com o intuito de observar se há variação e a estabilidade nos pHs entre as amilases secretadas pelos diferentes clones. Os resultados das atividades amilolíticas em diferentes pHs (pH 3,0 até pH 8,0) podem ser observados na Figura 5 e 6.

Os resultados obtidos demonstram que além da variação na quantidade de amilase produzida por cada clone, nota-se também uma variação no comportamento da enzima frente a diferentes pHs, indicando que estes clones são diferentes entre si, tendo atividades máximas em pH variando de 6,0 a 7,5. As enzimas produzidas pelos clones amilolíticos isolados neste trabalho, atuam em soluções de pH levemente ácidos a neutros. Porém, a maioria das enzimas amilolíticas descritas do gênero *Bacillus* sp. atuam em pH alcalino [22,23]

As enzimas produzidas pelos clones P1C4 e P6C12 apresentaram um comportamento similar em diferentes pHs, demonstrando uma estabilidade nos diferentes pHs sem haver uma queda brusca na produção enzimática. O clone P1C4 produziu 5,81 U/mL, tendo sua atividade máxima em pH 7,0, e com perda de 25% da sua atividade relativa máxima produzindo apenas 4,41 U/mL em pH 8,0.

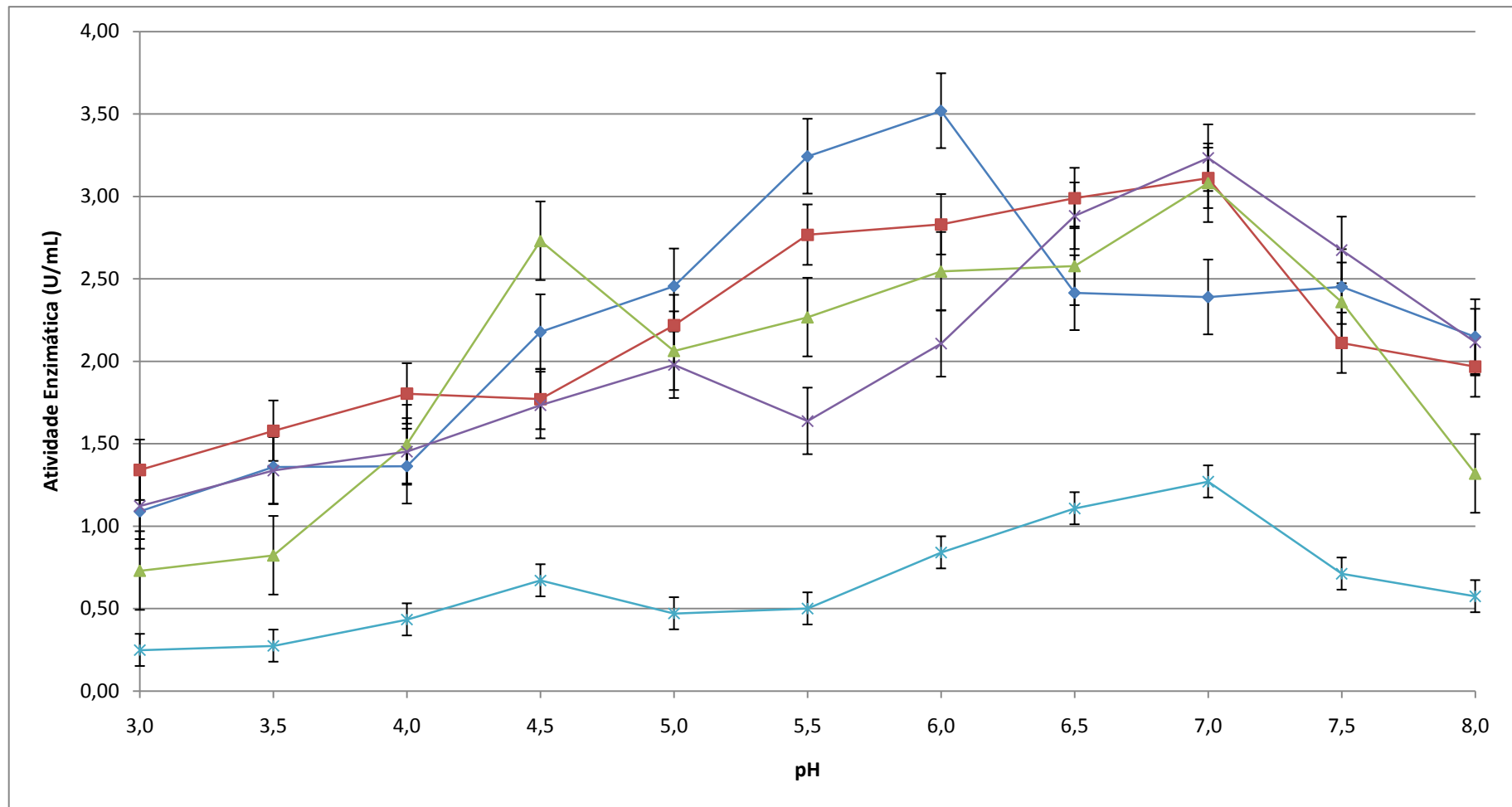


Figura 5 - Atividades das amilases em diferentes pHs produzidas pelos clones amilolíticos selecionados. No gráfico estão representados os clones (◆) P1C4, (▲) P6F1, (■) P5C4, (×) P6C12 e (*) P1A1

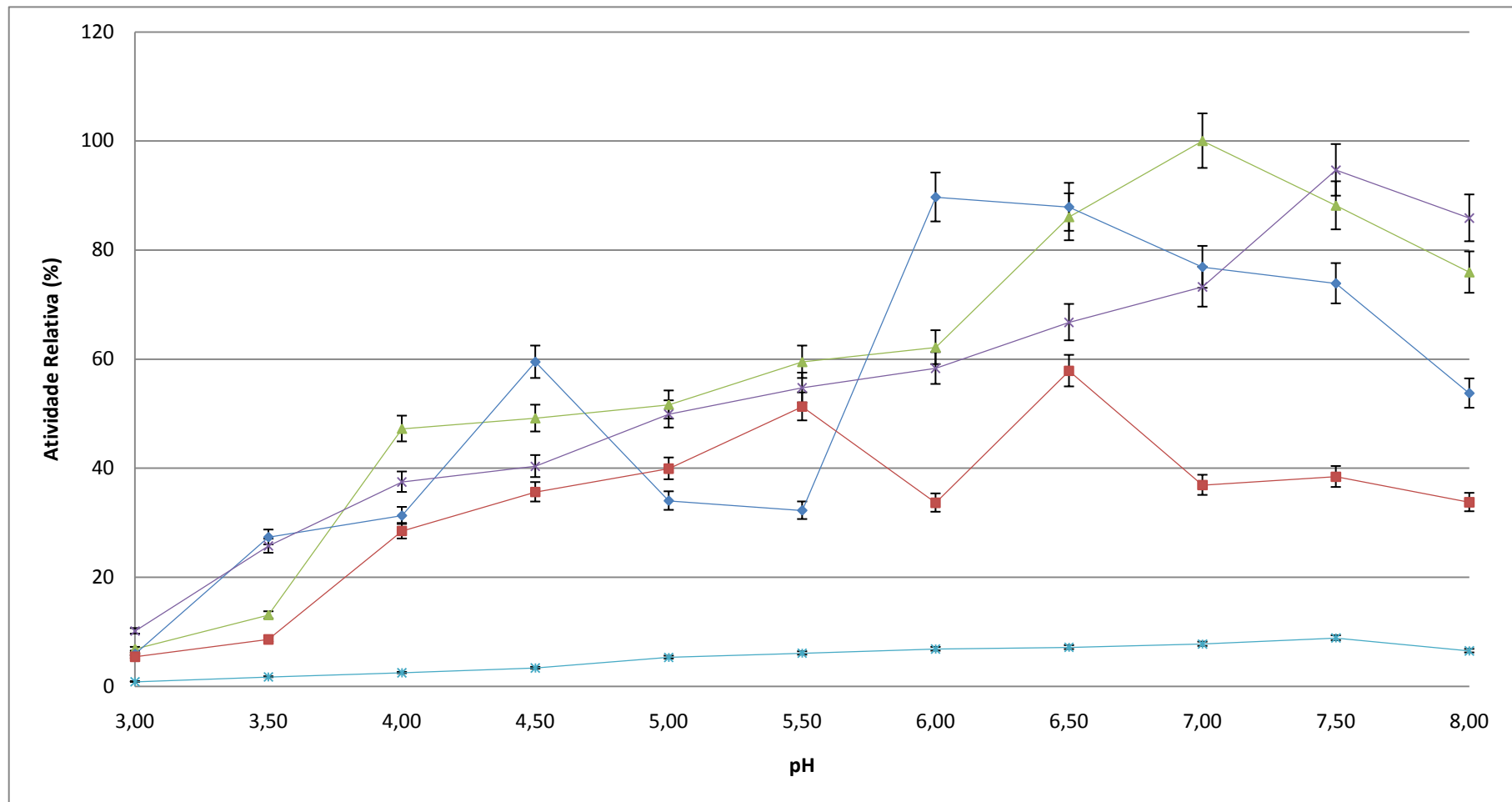


Figura 6 – Estabilidade enzimática das amilases produzidas pelos clones amilolíticos selecionados frente ao pH. No gráfico estão representados os clones (▲) P1C4, (◆) P6F1, (■) P5C4, (×) P6C12 e (*) P1A1

O clone P6C12 teve sua atividade máxima em pH 7,5 perdendo apenas 10% da sua atividade máxima em pH 8,0, demonstrando uma maior atividade enzimática em pH básico do que em pH ácido. Este clone quando exposto a pH 3,0 perdeu cerca de 90%, perdendo praticamente toda a sua habilidade de hidrolisar o amido, porém em pH 8,0 manteve sua atividade em 90%, sendo a única enzima deste trabalho a apresentar esta atividade em pH alcalino.

Neste trabalho não foi obtido nenhum clone com atividade relativa máxima em pH 3,0 a 5,5. O clone P5C4 teve seu pico de atividade em pH 6,5, porém perdeu cerca de 37% da sua atividade relativa máxima em pH 7,0. Em trabalhos utilizando *E. coli* para expressão de α -amilase de *B. subtilis* D2, a atividade relativa máxima encontrada foi em pH 6,5, perdendo cerca de 35% de sua atividade em pH 6,0 e 20% de sua atividade em pH 7,0 [26], sendo um comportamento enzimático similar ao apresentado pelo clone P5C4, que perdeu cerca de 52% de sua atividade em pH 6,0.

Já o clone P6F1 foi o único que apresentou atividade relativa máxima em pH 6,0, mantendo sua atividade em 85% em pH 7,0 e perdendo 51% da sua atividade máxima em pH 8,0. Em pH 3,0, todos os clones apresentaram uma atividade relativa de 10 a 15%. Já nos pH 5,0 e 6,0, apresentaram de 30 a 60% da atividade relativa.

Os clones P6F1 e P5C4 foram os únicos clones que apresentaram um perfil de dois picos de atividade em 4,5 e 6,0 para o clone P6F1 e 5,5 e 6,5 para o clone P5C4. Este perfil é observado quando são utilizados extratos brutos para os ensaios enzimáticos, pois nele pode conter a presença de diversas proteínas que podem estar de alguma forma interferindo na dosagem

enzimática [4]. A purificação de extrato enzimático é de grande importância principalmente para a aplicação desta enzima em processos industriais, para que haja uma ação enzimática de alta eficácia na degradação do amido. O processo de purificação atua nos grupos ionizáveis dos aminoácidos, que conferem às mesmas uma natureza poliônica que são responsáveis pelas interações eletrostáticas em resinas de purificação apropriadas [33].

De acordo com os dados, podemos observar que as enzimas apresentam maior atividade na faixa de pH entre 6,0 e 7,5, corroborando com os trabalhos descritos com amilase [34,35,36]. A maioria das reações em processos industriais apresentam pH em torno de 6,0 a 6,4, com isso, a adição das enzimas dos clones P1C4, P5C4 e P6C12 em uma reação, não haveria nenhum prejuízo, pois estariam estáveis nesta faixa.

3.3.2. Atividade Enzimática em diferentes Temperaturas e Termoestabilidade

A temperatura é uma variável crítica em alguns processos enzimáticos, produzindo simultaneamente efeitos opostos de aumento da reatividade enzimática e inativação [37]. A variação da atividade enzimática em função da temperatura pode resultar no aumento da agitação das moléculas com elevação de temperatura, que aumenta a frequência de colisões entre o substrato e a enzima e pode provocar a desnaturação da enzima, frente ao calor [38,39].

Este fator é limitante para a utilização de certas enzimas ou proteínas, principalmente em processos industriais. Neste trabalho realizamos a caracterização da atividade enzimática das enzimas produzidas pelos clones frente a diferentes temperaturas.

Nos ensaios de temperatura todos os clones apresentaram a formação de apenas um pico de atividade, como pode ser visualizado na Figura 7, ao contrário dos ensaios de pH, em que os clones P6F1 e P5C4 apresentaram dois picos de atividade.

O clone P1C4 apresentou a maior produção enzimática (6,93 U/mL) frente aos demais clones, apresentando sua atividade relativa máxima em 70°C, e manteve sua atividade em 60%, nas temperaturas de 30 a 60°C, obtendo seu pico máximo em 70°C, porém sua estabilidade foi perdida nas temperaturas de 80 e 100°C, perdendo 85% da sua atividade enzimática. Marco [26] demonstrou uma atividade relativa máxima a 50°C, mantendo sua atividade em até 80% nas temperaturas variando de 40 a 60°C.

As enzimas produzidas pelos clones P6C12 e P5C4 apresentaram comportamento similar em diferentes temperaturas. Ambas tiveram o pico de atividade relativa máxima em 60°C. O clone P5C4 apresentou uma atividade de 90 a 70°C, porém o clone P6C12 apresentou uma perda de 20% da atividade em 70°C.

Para o clone P6F1, a atividade relativa máxima foi encontrada a 80°C, porém a 60°C, a atividade ficou em torno de 65%, e nas temperaturas a 30°C e 50°C, este clone manteve sua atividade em 95%. Todos os clones apresentaram perda em torno de 80% de sua atividade relativa na temperatura a 100°C. A temperatura de 40°C dos ensaios enzimáticos padrão, os clones apresentaram uma atividade relativa de 50 a 65%.

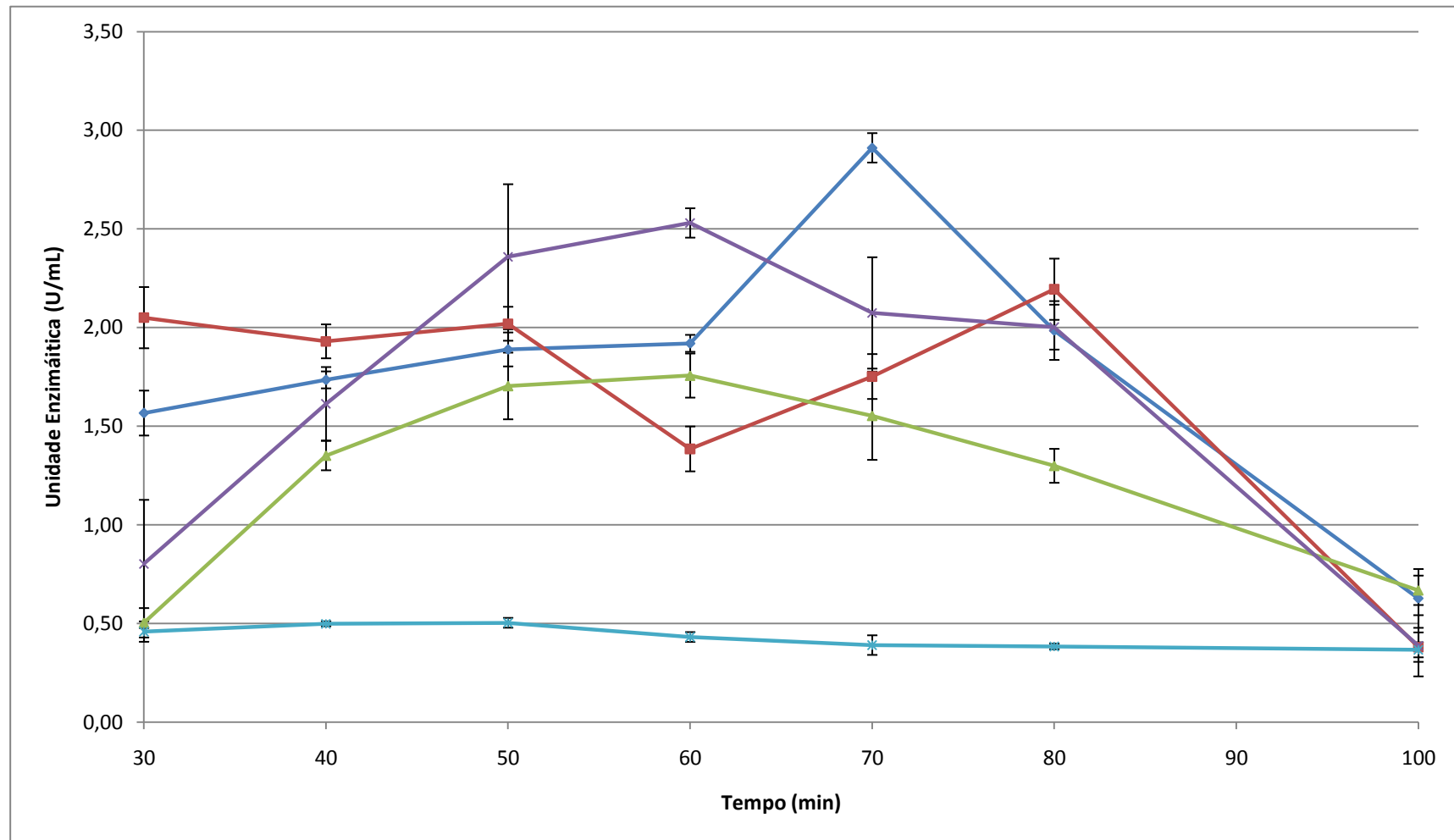


Figura 7 - Efeito da temperatura sob a atividade da amilase presente no extrato bruto dos clones amilolíticos. No gráfico estão representados os clones (◆) P1C4, (■) P6F1, (▲)P5C4, (×) P6C12 e (*) P1A1

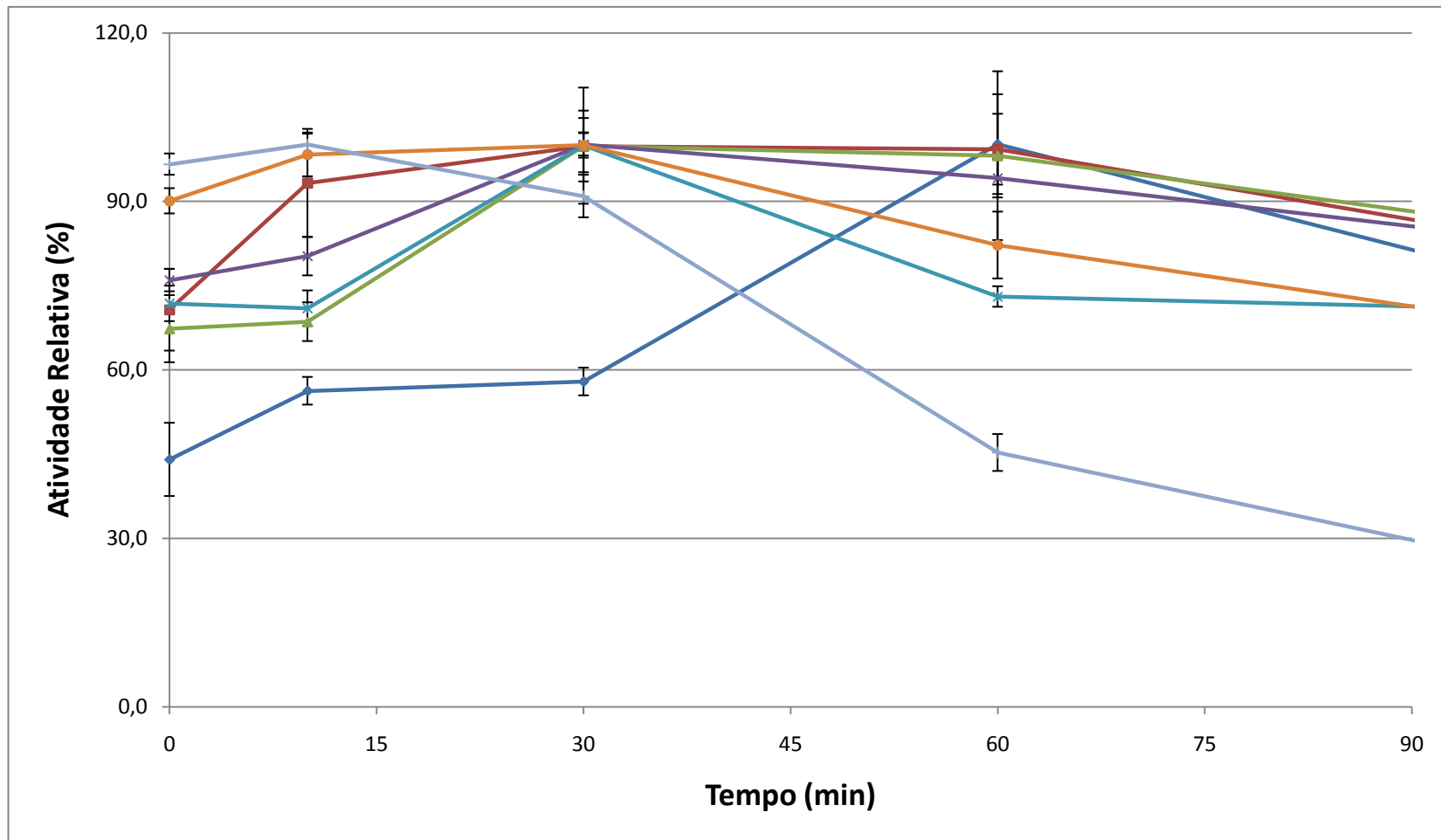


Figura 8 - Termostabilidade da amilase obtida do extrato bruto do clone P1C4. No gráfico estão representados as temperaturas de (◆) 30°C, (■) 40°C, (▲) 50°C, (×) 60°C, (✱) 70°C, (●) 80°C e (+) 100°C

A termoestabilidade dos clones foi obtida em todas as temperaturas, sendo a enzima incubada por até 90 minutos. Como se pode observar na Figura 8, o clone P1C4, manteve sua atividade relativa máxima em 100% nas temperaturas de 40, 50 e 60°C a partir de 30 minutos de incubação perdendo 15% de sua atividade somente após 90 minutos.

O clone P1C4 manteve sua atividade relativa máxima a 70°C, porém após 30 minutos, houve perda de 35% da sua atividade em 60 minutos, mantendo estável até 90 minutos de incubação. A temperatura a 100°C demonstrou perda de 70% da atividade relativa máxima em 60 minutos, sendo uma temperatura que pode ser considerada como de “quase” total inativação da enzima.

Na Figura 9, observa-se a termotolerância do clone P6F1, demonstrando as temperaturas de 30, 40 e 50°C com sua atividade em 100% de 15 a 90 minutos de incubação. A temperatura a 80°C tem seu pico de atividade relativa em 30 minutos perdendo apenas 30% da sua atividade máxima em 90 minutos, confirmando a temperatura ótima deste clone a 80°C.

A temperatura de 100°C, para um período de 60 minutos, inativou a enzima do clone P6F1, que perde 100% de sua atividade máxima em 60 minutos de incubação. Os clones P5C4 e P6C12 mantêm sua atividade relativa máxima em 95% em 90 minutos de incubação na temperatura a 60°C, sendo um ótimo resultado da termoestabilidade enzimática, como pode ser observado na Figura 10 e 11.

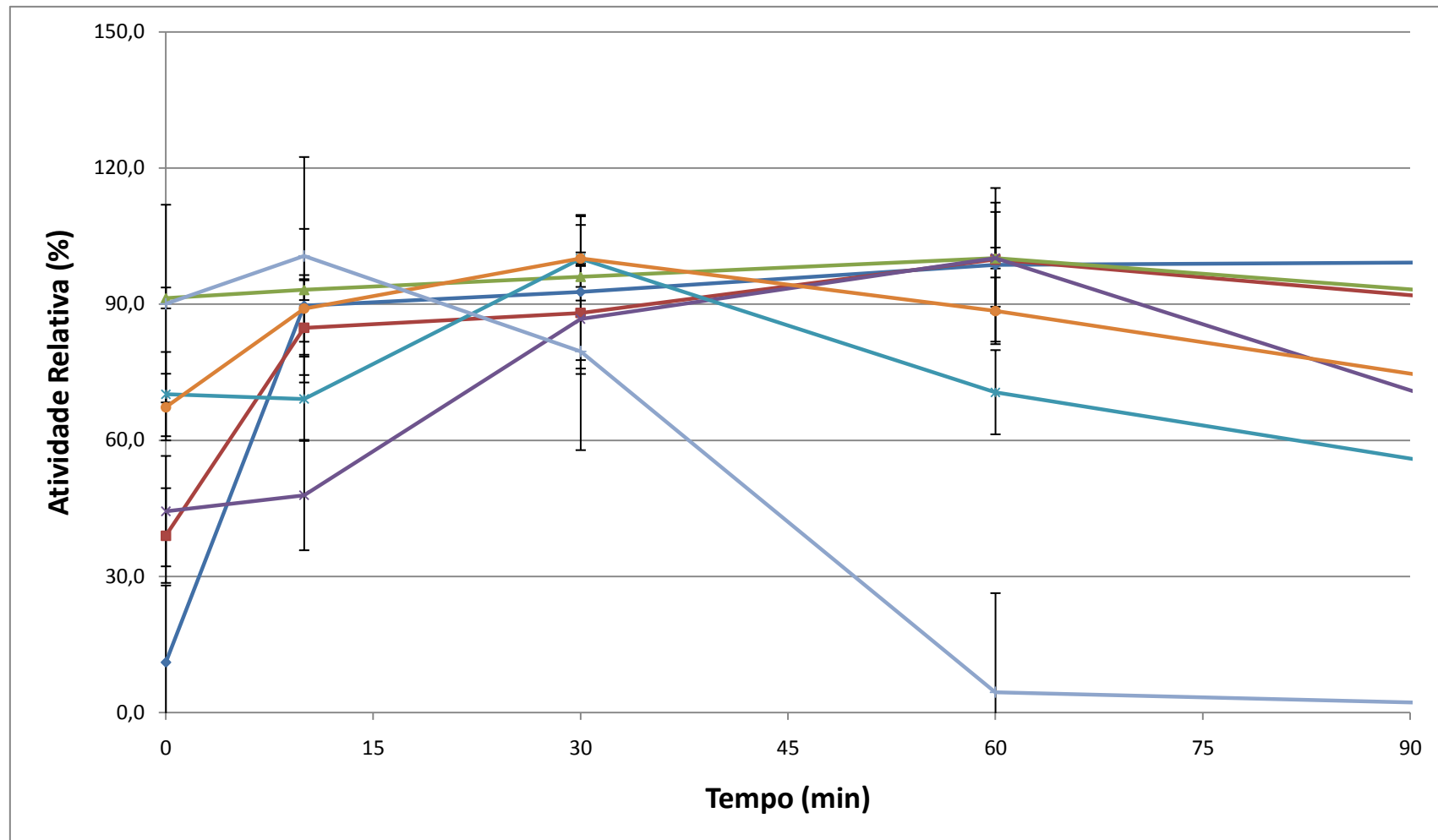


Figura 9 - Termoestabilidade da amilase obtida do extrato bruto do clone P6F1. No gráfico estão representadas as temperaturas de (◆) 30°C, (■) 40°C, (▲) 50°C, (×) 60°C, (*) 70°C, (●) 80°C e (+) 100°C

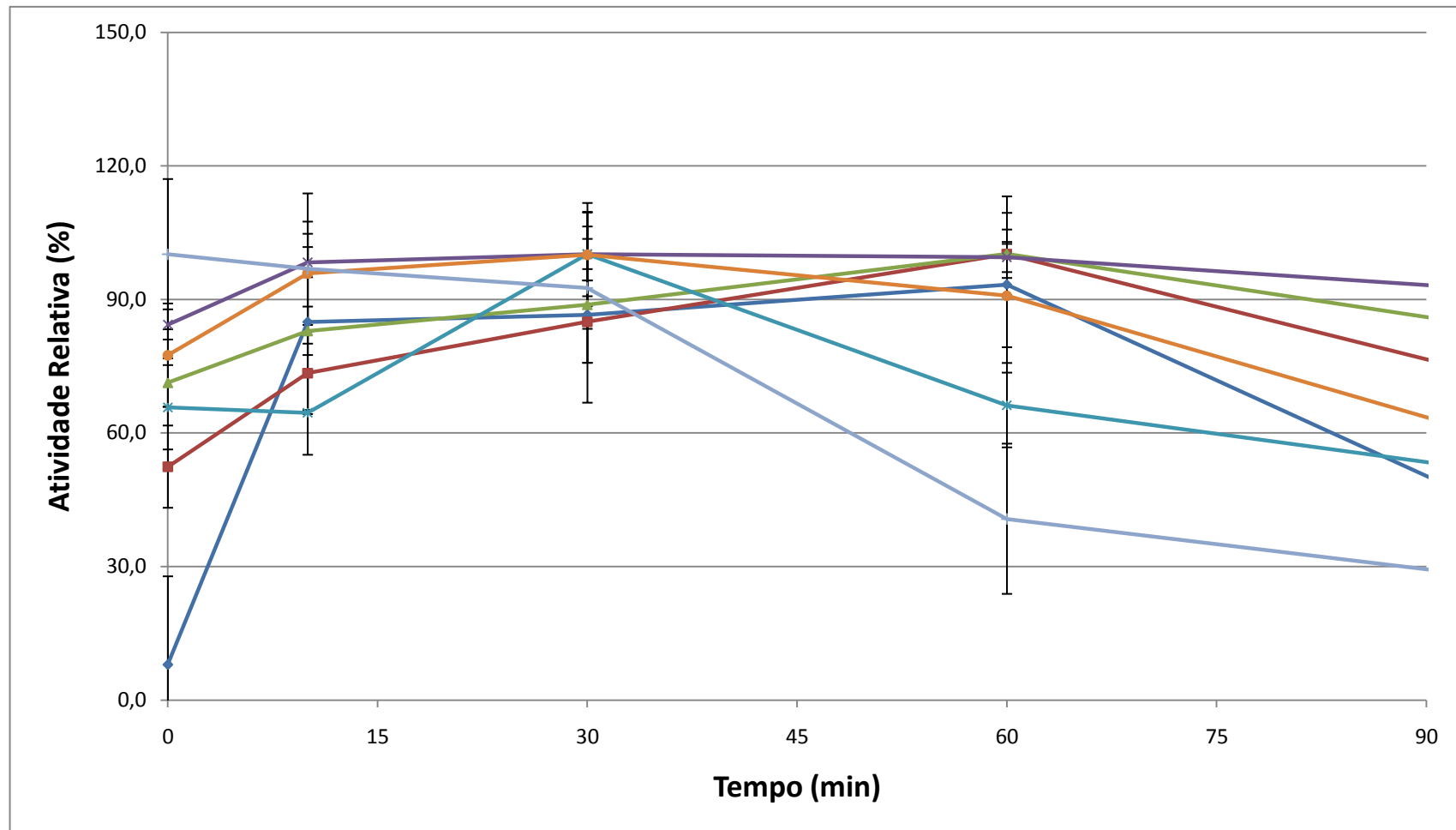


Figura 10 - Termostabilidade da amilase obtida do extrato bruto do clone P5C4. No gráfico estão representados as temperaturas de (◆) 30°C, (■) 40°C, (▲) 50°C, (×) 60°C, (*) 70°C, (●) 80°C e (+) 100°C.

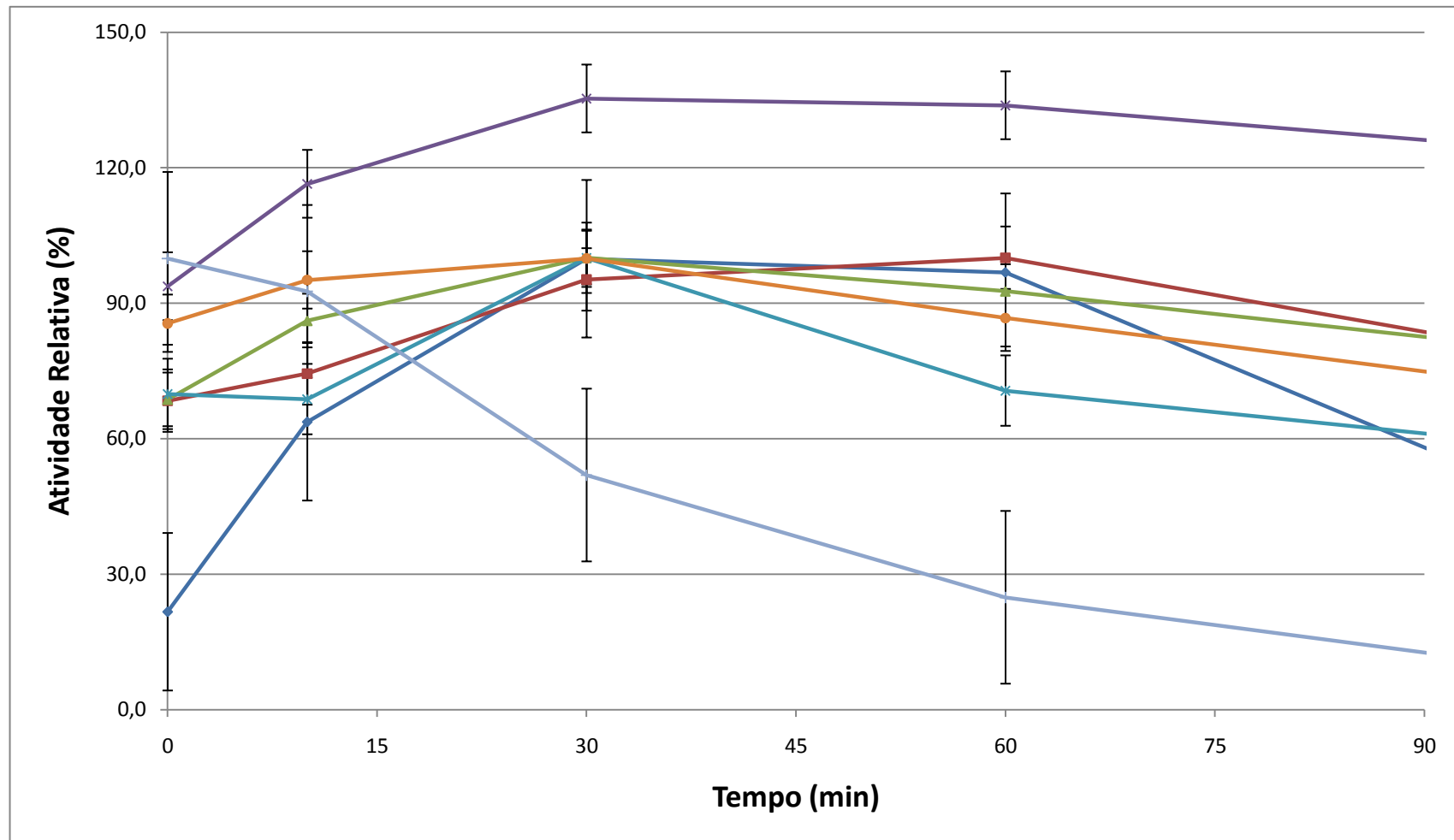


Figura 6 - Termostabilidade da amilase obtida do extrato bruto do clone P6C12. No gráfico estão representados as temperaturas de (◆) 30°C, (■) 40°C, (▲) 50°C, (×) 60°C, (*) 70°C, (●) 80°C e (+) 100°C

Wanderley et al. [40] trabalharam com *Cryptococcus flavus* em seu experimento de termoestabilidade, e verificaram uma temperatura ótima a 60°C, sendo que a atividade relativa manteve-se em 90% durante 60 minutos. Nos dados obtidos neste trabalho, a termoestabilidade desta enzima no período de 90 minutos foi alta, pois os dados analisados mostram a permanência desta enzima com mais de 80% de sua atividade relativa.

Na temperatura de 100°C, o clone P4C4 perdeu 70% e o clone P6C12 perdeu 80% da sua atividade máxima nesta temperatura, demonstrando uma alta instabilidade enzimática.

As características das amilases expressas pelos clones selecionados da biblioteca metagenômica foram de enzimas que atuam em pH que variam de 6,0 a 7,0, sendo a temperatura ótima encontrada em torno de 60 a 80°C, corroborando com trabalhos descritos utilizando a produção de amilase de origem bacteriana [34,35,36,40,41].

A maior produção enzimática foi demonstrada a 70°C pelo clone P1C4, mas esta enzima perdeu 35% da sua atividade quando exposta há 90 minutos nesta temperatura. Na termoestabilidade enzimática, tiveram destaques os clones P5C4 e P6C12 que conseguiram manter sua atividade relativa em 95% durante 90 minutos a 60°C. Rahmon [42] relatou que enzimas que possuem características termoestáveis, suportando temperaturas na faixa de 50°C a 70°C, são bastante utilizadas na indústria química, e principalmente, na indústria de detergentes.

Portanto, neste trabalho, as enzimas produzidas por estes quatro clones demonstraram ser bastante distintos entre si, principalmente quando submetidos a diferentes pH, no qual cada enzima teve um pH ótimo distinto.

A aplicação destas enzimas em processo industrial é muito relativa, por tratar-se de extratos brutos não purificados o que contribui para uma baixa especificidade enzimática frente a outros micro-organismos presentes no mercado industrial.

3.4. Caracterização Parcial das Proteases

3.4.1. Atividade Enzimática em diferentes pHs e sua estabilidade frente ao pH

A mudança de pH observada durante o crescimento de um micro-organismo afeta a estabilidade do produto no meio. A maioria das linhagens de *Bacillus* usadas comercialmente para a produção de proteases bacterianas apresentam pH ótimo entre 7 e 8, mas varia de acordo com o gênero e a espécie da bactéria [4,43].

O efeito do pH na atividade enzimática no extrato bruto do clone P3A4 está representado na Figura 12. A enzima apresentou atividade entre o pH 5,0 a 10,0 com atividade relativa máxima em pH 7,0 (34,3 U/mL). Em pH 5,0 houve a menor atividade proteolítica (13,6 U/mL) sendo 60% menor do que em pH 7,0, entretanto em pH 8 houve uma queda de apenas 15% de sua atividade relativa máxima, sendo que em pH 10,0 houve um aumento da atividade em 20% frente ao pH 3,0 (21 U/mL). Este comportamento segue o perfil de proteases bacterianas neutras, pois normalmente possuem atividade relativa em pHs que variam de 6,0 a 8,0 [6].

As proteases neutras são geralmente utilizadas em indústrias de alimentos, estas enzimas produzem uma diminuição no sabor amargo de algumas proteínas alimentares hidrolisadas [6]. Esta atividade ótima em pH neutro, têm sido descritas em trabalhos com *Yersinia ruckeri* e *Streptomyces albidoflavus* [44,45].

Na Figura 13, podemos visualizar a estabilidade da protease a cada 15 minutos frente os diferentes pHs. A enzima em pH 7,0 teve sua maior atividade relativa, porém sua estabilidade frente ao tempo de incubação foi baixa, perdendo 40% da sua atividade em 90 minutos. Entretanto, esta enzima em pH 8,9 e 10 demonstrou uma alta estabilidade frente ao pH ao longo do tempo de incubação, mantendo sua atividade relativa em 90 a 95% ($\approx 15,5$ U/mL) em 90 minutos de incubação.

Chellappan [46] descreveu uma protease bacteriana que manteve sua atividade em 80% após 120 minutos em pH entre 9,0 a 12, porém em pH 8,0, estas enzimas perderam 50% da atividade enzimática relativa. Os resultados obtidos nestes trabalhos são de grande importância, pois as proteases alcalinas possuem inúmeras aplicações na indústria de detergentes e de produtos químicos, como descrito por RAO [6].

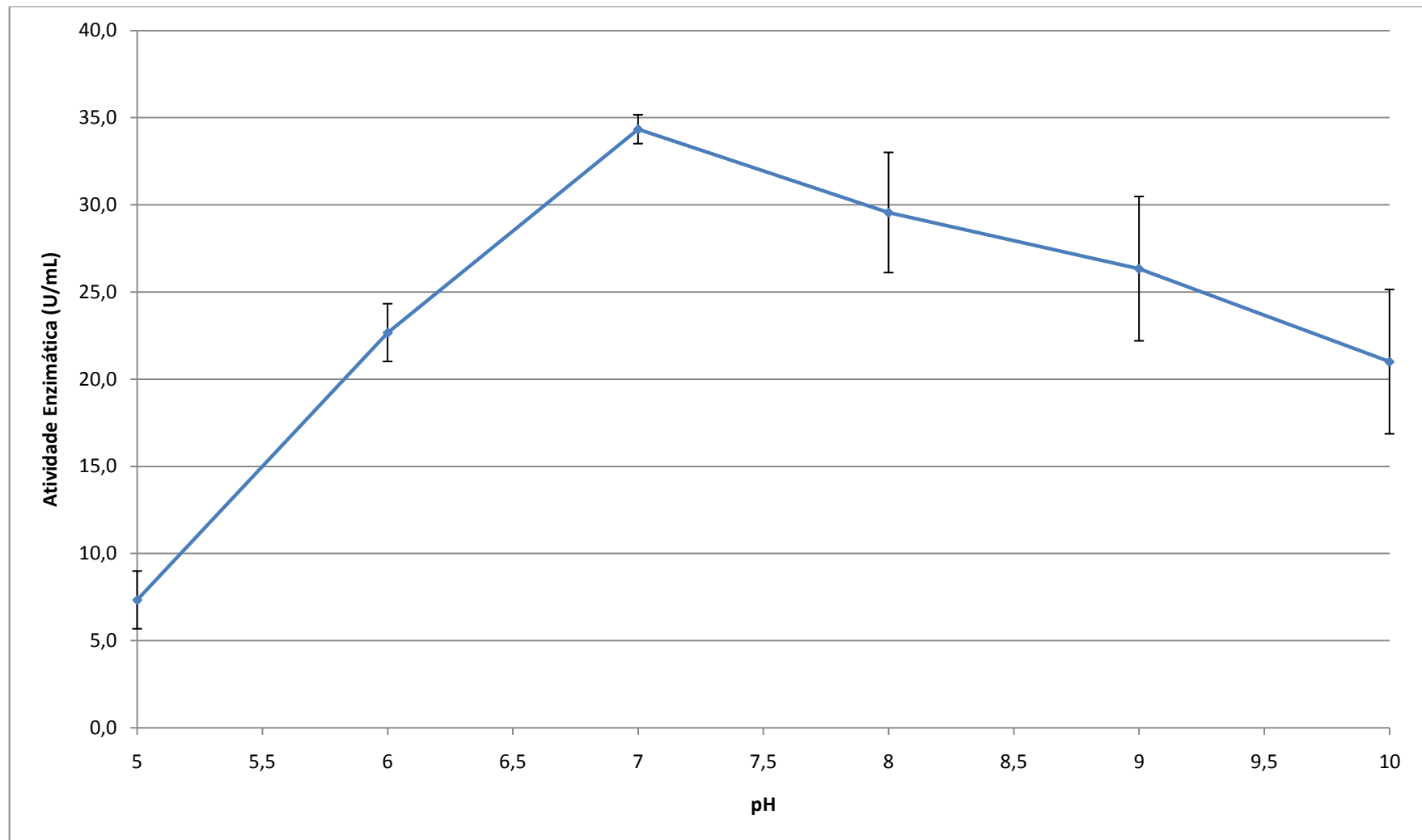


Figura 7 - Efeito do pH sobre a atividade de proteólise produzida pelo extrato enzimático bruto do clone P3A4

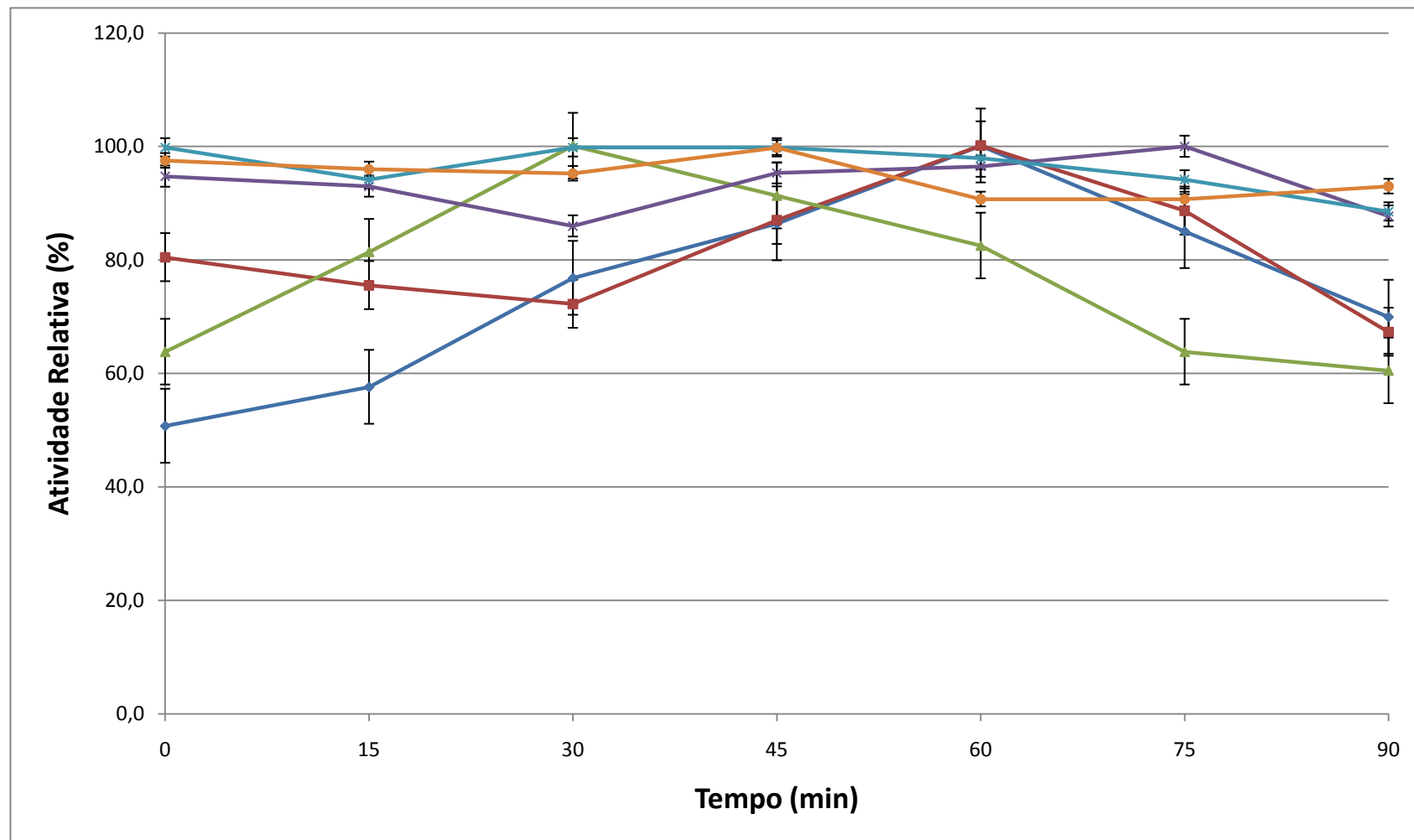


Figura 8 - Estabilidade enzimática ao pH da protease produzida pelo clone proteolítico selecionados. No gráfico estão representados os pHs (◆) 5, (■) 6, (▲) 7, (×) 8, (*) 9 e (●) 10

3.4.2. Atividade Enzimática em diferentes Temperaturas e Termoestabilidade

A temperatura é um dos fatores mais importantes que influenciam no crescimento e sobrevivência dos organismos, sendo que a temperatura considerada ótima em sua maioria está em torno de 30 e 40°C, embora alguns micro-organismos apresentam uma tolerância elevada diferente dos demais organismos [47]. A maioria dos estudos de produção de proteases em micro-organismos demonstra rendimentos ótimos numa faixa de temperatura ótima variando de 28 a 60°C. Como foi descrito, a temperatura ótima de 28°C para *Penicillium griseofulvum* e temperaturas ótimas de 30 a 45°C, 55 e 60°C para *Bacillus* sp. [48].

O extrato enzimático bruto do clone P3A4 demonstrou atividade relativa máxima em temperatura ótima a 30°C, produzindo 56,0 U/mL da enzima em 90 minutos, e mantendo sua atividade relativa de 99% até 40°C, como pode ser observado na Figura 14. Na temperatura de 50 e 60°C, a enzima perdeu 43% da sua atividade relativa, e a 70°C, teve sua atividade reduzida em 59% (22,0 U/mL).

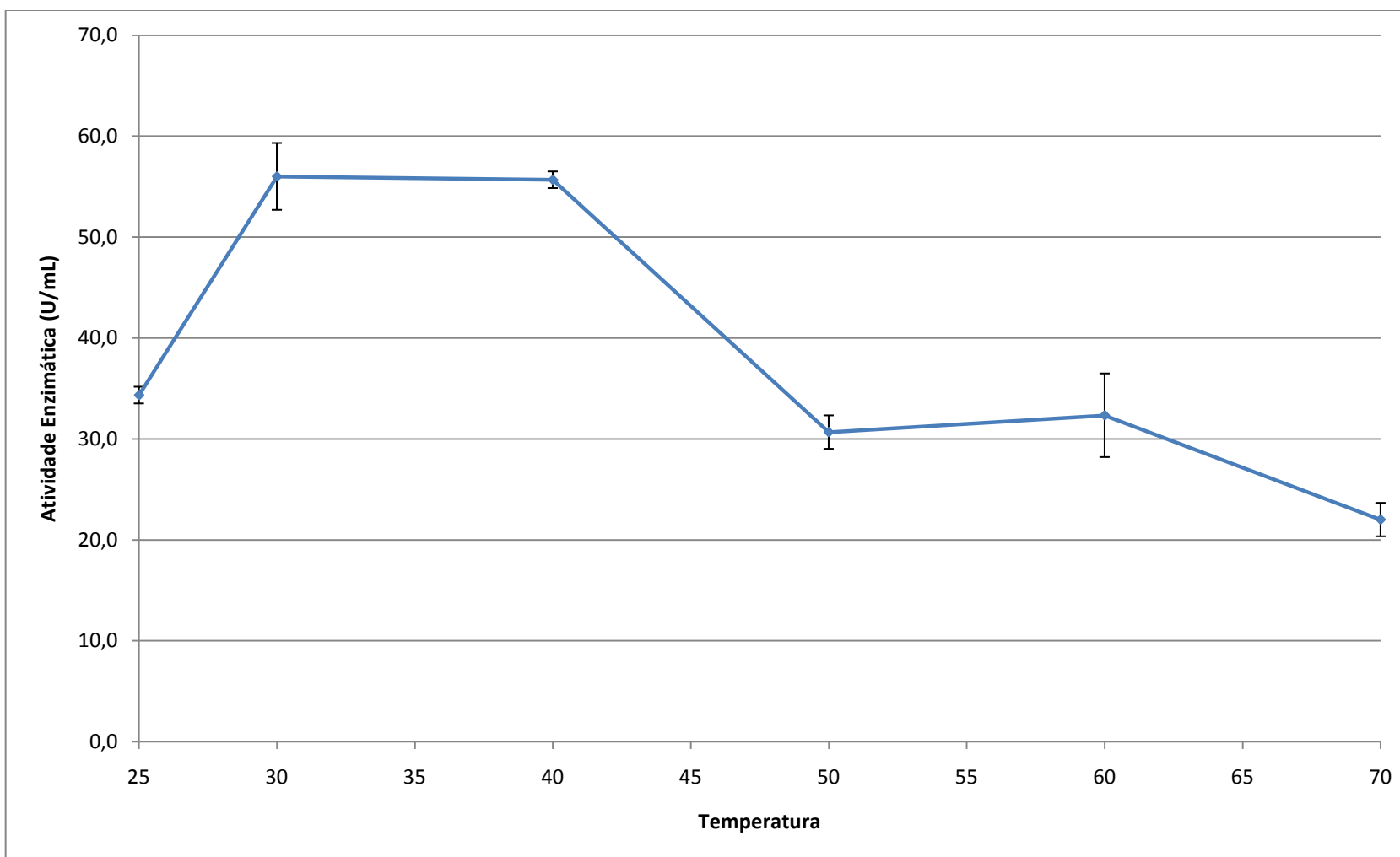


Figura 9 - Efeito da temperatura sob a atividade de proteólise presente no extrato bruto do clone P3A3

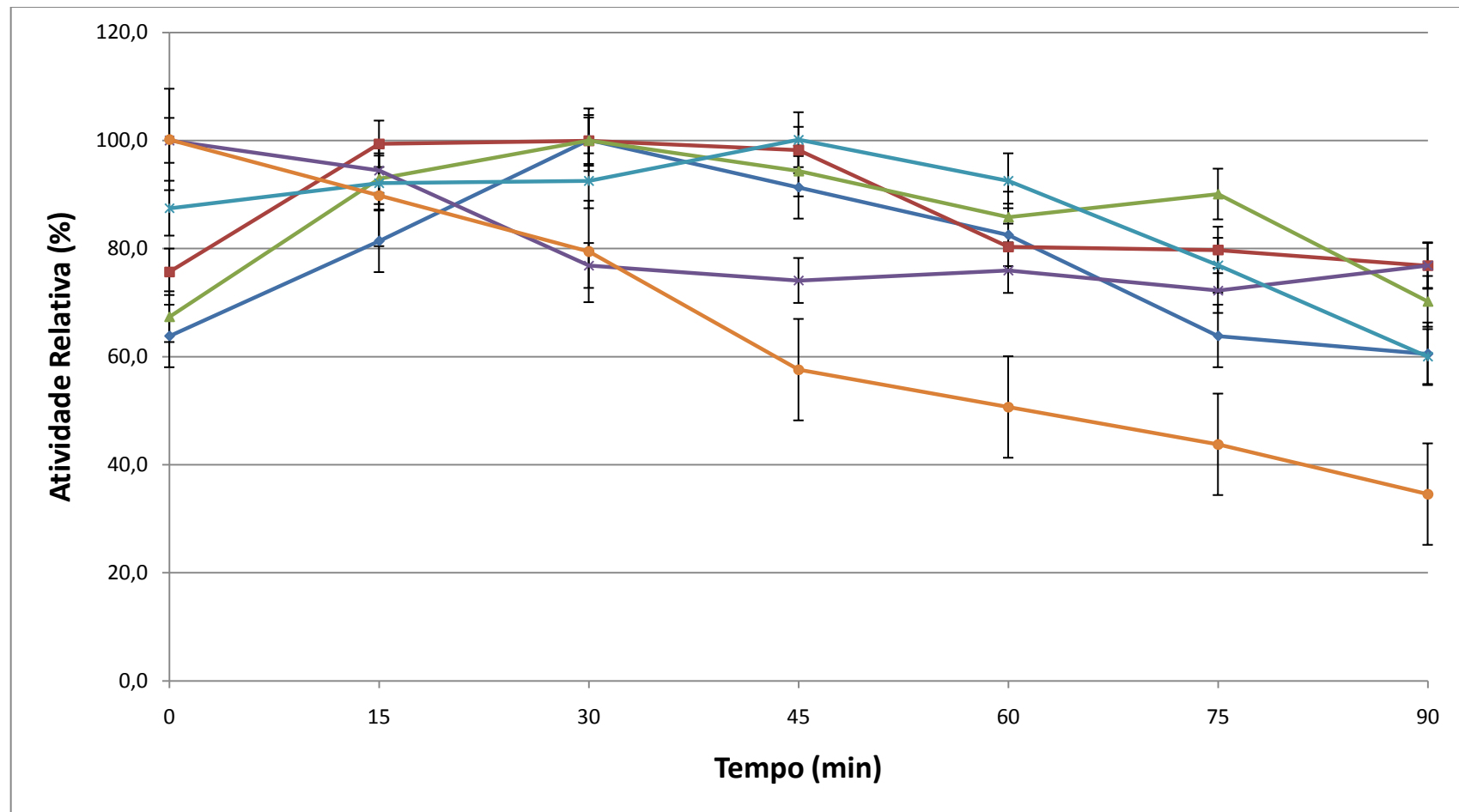


Figura 15 - Efeito da temperatura sob a atividade de proteólise presente no extrato bruto do clone P3A3. No gráfico estão representados as temperaturas de (◆) 25°C, (■) 30°C, (▲) 40°C, (×) 50°C, (*) 60°C e (●) 70°C

A temperatura ótima encontrada no extrato bruto dos clones para máxima atividade relativa foi em torno de 30 a 40°C, demonstrando uma baixa termoestabilidade frente à temperatura. Entretanto, como pode-se observar na Figura 15, na temperatura a 30°C, a enzima apresentou-se instável, perdendo 20% da atividade relativa após 45 minutos de incubação. Nas demais temperaturas analisadas, houve uma queda em média de 20% em sua atividade relativa, no entanto, na temperatura a 50°C manteve estabilidade após 30 minutos de incubação, produzindo 27,7 U/mL em 90 minutos, mantendo sua atividade relativa semelhante na temperatura de 30°C. O perfil enzimático encontrado nesta enzima foi relatado em proteases produzidas por *B. subtilis* e *Bacillus pumilis*, na qual as mesmas apresentaram termotolerância e mantiveram-se estáveis a temperatura de 55°C, porém a temperatura ótima para produção da enzima foi de 37°C [22], como foi descrito neste trabalho. A termoestabilidade desta enzima a 50°C é de suma importância para sua aplicação em processo industrial, como já relatado, e as enzimas que possuem características termoestáveis (50°C a 70°C) são amplamente utilizadas no setor industrial, tanto na área química, como as que produzem detergentes [42].

3.5. Isolamento do gene amilolítico

O DNA plasmidial foi obtido com o kit de extração plasmidial da “*GE plasmidPrep Mini spin Kit*”, como descrito no item 4.8 de Material e Métodos. Na Figura 16, está demonstrado a extração do DNA dos clones selecionados, quatro (4) clones produtores de amilase e um (1) clone produtor de protease.

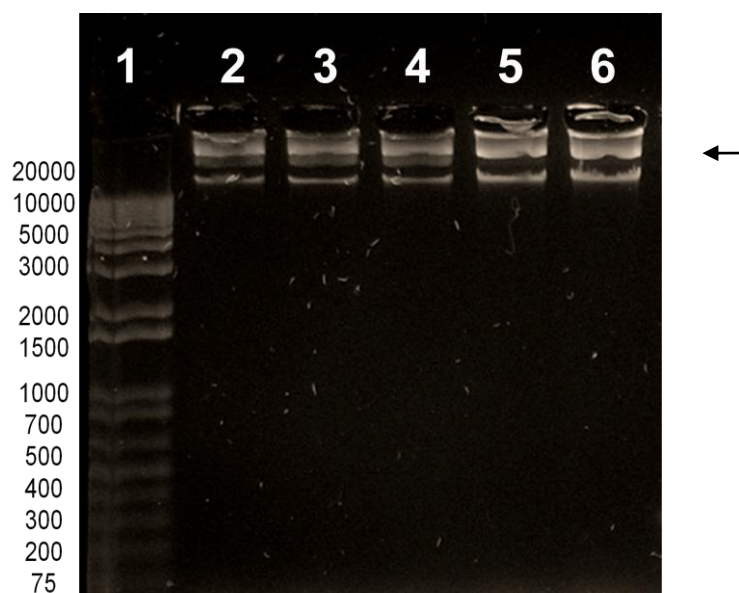


Figura 10 - Perfil eletroforético da extração de DNA plasmidial em gel de agarose a 1%. (1) Marcador de peso molecular 1 Kb Plus (Fermentas); (2) Clone P1C4; (3) Clone P6F1; (4) Clone P5C4; (5) Clone P6C12; (6) Clone P3A4

Na Figura 17, está demonstrada a amplificação por PCR do gene da α -amilase de *Bacillus liqueniformis*, e o produto de amplificação dos clones P1C4, P6F1, P5C4 e P6C12 apresentaram um fragmento de aproximadamente 1500 pares de bases (pb), similar ao controle positivo da reação, o que corresponde ao tamanho da seqüência do gene *amyIN* que possui o tamanho de 1540 pb [18].

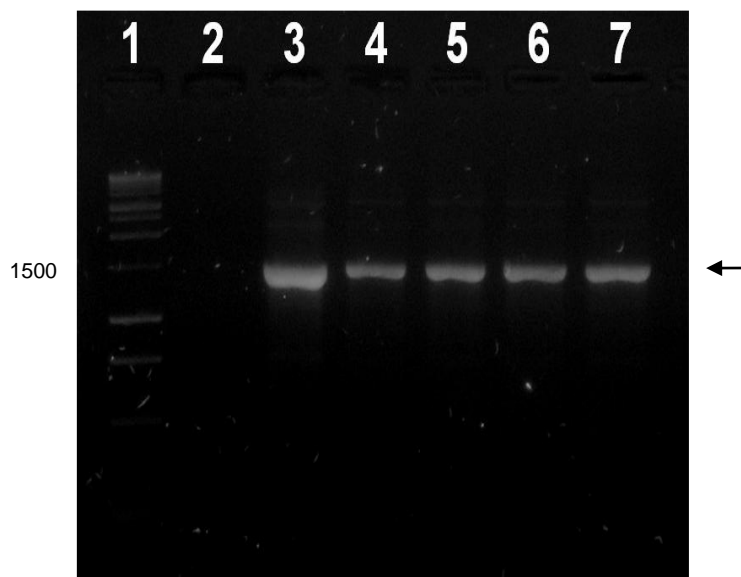


Figura 11 - Eletroforese dos produtos da PCR para amilase de *B. liqueniformis* (*amyIN*) em gel de agarose a 1%. (1) Marcador de peso molecular 1Kb (Fermentas); (2) controle negativo da reação; (3) controle positivo da reação; (4) Clone P1C4; (5) Clone P6F1; (6) Clone P5C4; (7) Clone P6C12

Para o gene *Pamy*, codificador de α -amilase de *B. subtilis*, os produtos da reação de PCR obtido dos quatro clones amilolíticos, não apresentaram amplificação deste fragmento gênico, como pode ser observado na Figura 18. O controle positivo da reação amplificou um fragmento gênico de aproximadamente 1500 pb, correspondente ao tamanho da seqüência do gene que possui 1565 pb [19].

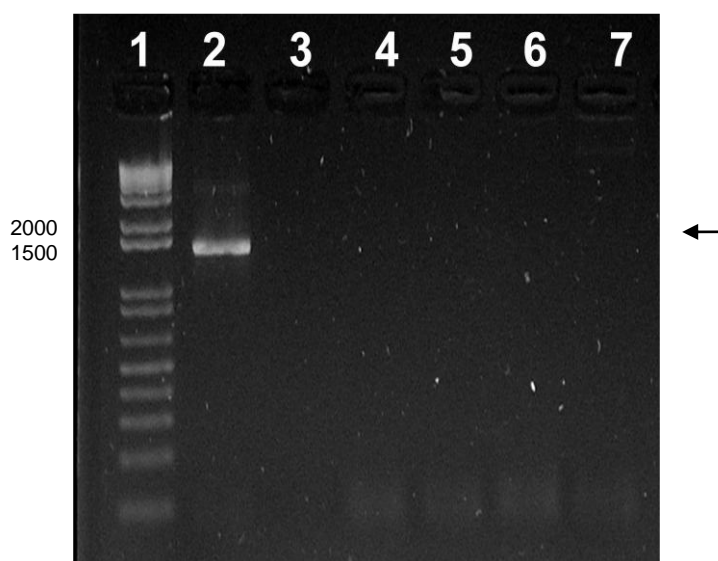


Figura 12 - Eletroforese dos produtos de PCR para amilase de *B. subtilis* (*Pamy*) em gel de agarose a 1%. (1) Marcador de peso molecular 1Kb Plus (Fermentas); (2) controle positivo da reação; (3) controle negativo da reação; (4) Clone P1C4; (5) Clone P6F1; (6) Clone P5C4; (7) Clone P6C12

Por fim, os quatro (4) clones amilolíticos isolados da biblioteca metagenômica de terra preta de índio, apresentaram o gene codificador para α -amilase de *B. liqueniformis*, como foi observado na Figura 17, porém nenhum destes clones apresentaram o gene codificados da α -amilase de *B. subtilis*.

Os clones amilolíticos isolados neste trabalho apresentaram características distintas entre si, o clone P1C4 foi o maior produtor da enzima frente aos demais, destacando-se com uma elevada produção a 70°C, que demonstrou ser uma enzima termotolerante a temperaturas elevadas, porém com uma termoestabilidade relativamente baixa. Todos os clones amilolíticos produziram atividades enzimáticas inferiores quando comparadas a micro-organismos já

isolados, como do gênero *Bacillus* e clones de bibliotecas metagenômicas, descritos por Yun [20]. Estes trabalhos descreveram suas atividades enzimáticas utilizando enzimas purificadas, o que eleva a especificidade das enzimas excretadas destes micro-organismos.

Com isso, os extratos enzimáticos de amilases produzidos pelos clones isolados neste trabalho, poderão ser purificados, aumentando a especificidade da enzima frente ao substrato. Sendo assim, poderemos obter um extrato enzimático puro e concentrado, tornando-se estas enzimas de grande interesse na aplicação industrial, pois serão enzimas com características distintas a dos micro-organismos isolados atualmente, merecendo um grande destaque na termotolerância e termoestabilidade detectada. Estas enzimas poderão ser utilizadas no setor industrial, como catalisadores, para a hidrólise do amido, no qual sua aplicação na a hidrólise de macromoléculas como até a produção de frutose.

Atualmente, as amilases compreendem em cerca de 30% da produção mundial de enzimas, estes clones amilolíticos isolados da Biblioteca Metagenômica de Terra Preta de Índio demonstraram atividades enzimáticas distintas dos micro-organismos descritos na literatura, podendo com isto, comprovar a eficiência da técnica metagenômica que visa buscar novos bioprodutos para a aplicação industrial, além de relatar sobre a diversidade Amazônica bastante desconhecida.

Neste trabalho foi isolado um clone proteolítico que apresentou uma produção enzimática oito vezes superior aos clones amilolíticos, em apenas 10 horas de fermentação, tornando-se uma produção significativa quando

comparada a outras enzimas bacterianas já descritas. A protease produzida apresentou característica de uma enzima secundária no metabolismo bacteriano deste clone, sendo produzida em grande quantidade durante a fase exponencial do crescimento microbiano, apresentando uma queda durante a fase estacionária do crescimento.

Os resultados obtidos da caracterização proteolítica demonstraram uma atividade enzimática ótima em pH neutro, sendo portanto uma enzima diferente das já descritas atualmente que atuam em pH alcalino [6]. Sua utilização é de suma importância na indústria de alimentos para redução do sabor amargo de algumas proteínas utilizadas neste setor. Já sua produção enzimática frente à elevação da temperatura, demonstrou uma termotolerância a 70°C e uma termoestabilidade de até 50°C, perdendo apenas 20% da sua atividade ótima quando comparada com sua melhor produção a 30°C, esta característica é relatada em *Bacillus subtilis* e *Bacillus pumilis* que apresentam esta característica de termotolerância [22] mantendo-se estável em temperaturas superiores, perdendo cerca de 15% da sua melhor produção a 37°C.

O fator temperatura é determinante para uma futura aplicação desta protease em outros processos industriais, tais como nos setores de: química e produção de detergentes [42]. A protease do clone metagenômico isolado da Biblioteca de Terra Preta de Índio, demonstrou a possibilidade de sua aplicação em 3 setores industriais e uma elevada produção enzimática em seu extrato bruto, tornando-se a enzima de maior destaque deste trabalho, porém como mencionado anteriormente este extrato proteolítico deverá ser purificados para

sua futura aplicação industrial e otimizada da sua atividade enzimática significativa, do qual espera-se ainda uma melhoria na atividade proteolítica.

As enzimas isoladas nestes trabalhos são oriundas de micro-organismos presentes no solo amazônico, o que demonstra a riqueza presente neste ambiente, pois o solo é um ambiente extremamente complexo, devido à interação de diversos parâmetros como: pH, água, estrutura do solo, variação climática e o bioma presente no mesmo, do qual diversos trabalhos demonstram ser o solo amazônico como um vasto reservatório da diversidade genética de micro-organismos [49,50].

As enzimas produzidas pelos clones isolados neste trabalho, da vasta diversidade microbiana presente no solo amazônico que produziram enzimas com características de grande interesse industrial, podendo tornar estas enzimas novos bioprodutos para aplicação industrial. Atualmente o mercado mundial visa utilização de enzimas frente ao uso de compostos químicos, devido ao seu alto rendimento, ausência de poluição ambiental e pelos inúmeros produtos que podem ser obtidos de sua ação.

4. CONCLUSÕES

Com os dados obtidos neste trabalho, podemos inferir que:

- 1) Foram isolados quatro (4) clones produtores de amilase e três (3) clones produtores de protease da Biblioteca metagenômica de TPI;
 - 2) O maior halo amilolítico obtido em placas de cultivo foi apresentado pelo clone P6C12, correspondente a 14,0 mm;
 - 3) O clone P3A3, foi o que apresentou o maior halo de proteólise (46,0 mm);
 - 4) A adição de arabinose interferiu positivamente na produção em meio fermentativo, aumentando as atividades amilolíticas dextrinizante e sacarificante dos clones amilolíticos isolados;
 - 5) A cinética enzimática dos clones amilolíticos apresentou maior atividade relativa em 24 h de fermentação;
 - 6) A maior produção de protease (26,3 U/mL) foi obtida em 10 horas de fermentação;
 - 7) As amilases caracterizadas parcialmente tiveram sua atividade ótima em pH neutro a levemente alcalino, o clone P1C4 demonstrou a maior produção a 70°C, já os clones P5C4 e P6C12 demonstraram a maior termoestabilidade;
 - 8) A protease demonstrou sua atividade ótima em pH neutro, sua temperatura ótima foi de 30°C e sua termoestabilidade foi demonstrada em 50°C. Estas características indicam sua aplicação em 3 setores industriais como: produção de alimentos, indústria química e produção de detergentes;
-

- 9) Todos os extratos enzimáticos obtidos neste trabalho devem ser purificados para melhorar sua atividade enzimática relativa, concentração enzimática e para futuras aplicações nos setores industriais;
 - 10) As enzimas produzidas neste trabalho demonstraram características e atuação novas quando comparadas a enzimas descritas atualmente, o que comprova a eficiência da construção de bibliotecas metagenômicas para o isolamento de novos bioprodutos;
 - 11) O solo de Terra Preta de Índio demonstrou ser um ambiente que contém uma vasta biodiversidade microbiana onde podem ser obtidos novos bioprodutos.
 - 12) Para os clones amilolíticos foi realizado o isolamento do gene de α -amilase de *Bacillus liqueniformis* foi realizado com sucesso.
-

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Berg JM, Stryer I, Tymoczko JL. Bioquímica. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.
 - [2] Barrett AJ. Classification of peptidases. In: Barrett AJ. Methods in Enzymology, Academic Press, NY, 1994, 1-59.
 - [3] Godfrey T, West SI. Introduction to industrial enzymology. In: Godfrey T. Industrial Enzymology, Macmillan Press, West S. London, 1996, 1-8.
 - [4] Gupta R, Gigras P, Mohapatra H, Goswami VK, Chauhan B. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. Process Biochem 2003; 38:1599-1616.
 - [5] Ball SG, Morell MK. From bacterial glycogen to starch: understanding the biogenesis of the plant starch granule. Annu. Rev. Plant Biol 2003; 54:207-233.
 - [6] Rao MB, Tanksale AM, Ghatge MS, and Deshpande VV. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. Microbiology and Molecular Biology Reviews 1998; 62:597-635.
 - [7] Joo HS, Chang CS. Production of an oxidant and SDS-stable alkaline protease from an alkaliphilic *Bacillus clausii* I52 by submerged fermentation: feasibility as a laundry detergent additive. Enzyme and Microbial Technology 2005; 38:176-183.
 - [8] Bhat MK. Enzymatic processing of starch: presents and potential benefits. Sug. J. 1998; 100:372-376.
 - [9] Daniel R. The soil metagenome - a rich resource for the discovery of novel natural products. Curr. Opin. Biotechnol 2004; 15:199-204.
 - [10] Leomil L, Reis AMM, Tavares P, Araújo JF, Kruger RH, Astolfi-filho S. Construção de biblioteca metagenômica de Terra Preta de Índio. Brasília: Anais do 24° Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2007, p. 56.
 - [11] Lederberg J, Lederberg EM. Replica plating and indirect selection of bacterial mutants. Wisconsin 1951; 63:399-406.
 - [12] Hankin L, Anagnostakis SL. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. Mycologia 1975; 67:597-607.
 - [13] Barnett JA, Payne RW, Yarrow, D. Yeast Characteristics and Identification. 2 ed. Cambridge: University Press, 1990.
 - [14] Fuwa HJ. A new method for microdetermination of amylase activity by use the amylose as the substrate. J. Biochem 1945; 41:583-603.
 - [15] Bernfeld P. α - e β - Amylases. Methods Enzymol 1955; 1:149-158.
-

-
- [16] Leighton TJ, Doi RH, Warren RAJ, Kelln R. A. The relationship of serine protease activity to RNA polymerase modification and sporulation in *Bacillus subtilis*. J. Mol. Biol. 1973; 76:103-122.
- [17] Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of dna with a thermostable dna polymerase. Science 1988; 239:487–491.
- [18] Oliveira TS. Clonagem e expressão do gene que codifica α -amilase de *Bacillus licheniformis* em *Bacillus subtilis*. Manaus: Dissertação (Mestrado em Biotecnologia na Universidade Federal do Amazonas), 2009. 91p.
- [19] Müller G. Clonagem e expressão do gene da α -amilase de *Bacillus subtilis* variedade D2 na levedura *Pichia pastoris*. Manaus: Dissertação (Mestrado em Biotecnologia na Universidade Federal do Amazonas), 2008, 108p.
- [20] Yun J, Kang S, Park S, Yoon H, Kim MJ, Heu S and Ryu S. Characterization of a novel amylolytic enzyme encoded by a gene from a soil-derived metagenomic library. Appl Environ Microbiol 2004; 70:7229–7235.
- [21] Rondon MR, August PR, Bettermann AD, Brady SF, Grossman TH, Liles MR, Loiacono KA, Lynch BA, Macneil IA, Minor C, Tiong CL, Gilman M, Osburne MS, Clardy J, Handelsman J, Goodman RM. Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. Appl. Environ. Microbiol 2000; 66:2541-2547.
- [22] Kim TU, Gu BG, Jeong JY, Byun SM, Shin YC. Purification and characterization of amaltotetraose-forming alkaline α -amylase from an alkalophilic *Bacillus* strain GM8901. Appl Environ Microbiol 1995; 61: 3105-12.
- [23] Lin LL, Chyau CC, Hsu WH. Production and properties of a raw-starch-degrading amylase from the thermophilic and alkaliphilic *Bacillus* sp. TS-23. Biotechnol Appl Biochem 1998; 28:61-68,
- [24] Bhaskar N, Sudeepa ES, Rashmi HN, Tamil, Selvi A. Partial purification and characterization of protease of *Bacillus proteolyticus* CFR3001 isolated from fish processing waste and its antibacterial activities. Bioresource Technology 2007; 98:2758–2764.
- [25] Riffel A, Lucas F, Heeb P, Brandelli A. Characterization of a new keratinolytic bacterium that completely degrades native feather keratin. Archives of Microbiology 2002; 179:258-265.
- [26] Marco JL, Bataus IA, Valência FF, Ulhoa CJ, Astolfi-filho S. Felix CR. Purification and characterization of a truncated *Bacillus subtilis* α -amylase produced by *Escherichia coli*. Applied Microbiology Biotechnology 1996; 44:746–752.
- [27] Pandey A, Webb C, Soccol CR, Larroche C. Enzyme Technology. 1 ed. New Delhi: Asiatech Publishers, 2005.
-

- [28] Gupta RK, Saxena RK, Khan S. Bleach-stable, alkaline protease from *Bacillus* sp.. Biotechnology Letters 1999; 21:135-138.
- [29] Gupta R, Beg QK. Bacterid alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. Applied Microbiology and Biotechnology 1992; 59:15-32.
- [30] Bierbaum G, Karutz M, Weuster-botz D, Wandrey, C. Production of protease with *Bacillus licheniformis* mutants insensitive to repression of exoenzyme biosynthesis. Appl Microbiol Biotechno 1994; 40:611-617.
- [31] Neves KCS, Porto ALF, Teixeira MFS. Seleção de leveduras da Região Amazônica para a produção de protease extracelular. Acta Amazônica. v.36, p.299-306, 2006.
- [32] Sandhya C, Sumantha A, Szakacs G, Pandey A. Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. Process Biochemistry 2005; 40:2689-2694.
- [33] Quadri MB, Cruz JM, Santana CC. Modelagem numérica do processo de adsorção em coluna de insulina sobre a resina ACCEL plus. Florianópolis In: 2º Encontro Brasileiro sobre Adsorção, 2000, p. 231-240.
- [34] Vihinen M, Mantsala P. Microbial amylolytic enzymes. Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol 1989; 24:329-418.
- [35] Saito N. Thermophilic extracellular α -amylase from *Bacillus licheniformis*. Arch Biochem. Biophys 1973; v:290-298.
- [36] Khoo SL, Amirul AA, Kamaruzaman M, Nazalan N, Azizan MN. Purification and characterization of α -amylase from *Aspergillus flavus*. Folia Microbiol 1994; 39:392-398.
- [37] Illanes A, Wilson L, Tomasello G. Temperature optimization for reactor operation with chitin-immobilized lactase under modulated inactivation. Enzyme and Microbial Technology 2000; 27:270-278.
- [38] Scriban R. et al. Biotecnologia. São Paulo: Manole, 1985.
- [39] Trevan MD, Boffey S, Goulding KH, Stanbury P. Biotecnologia: Princípios biológicos. Zaragoza:Acriba, 1990.
- [40] Wanderley KJ, Torres FAG, Moraes LMP, Ulhoa CJ. Biochemical characterization of alpha-amylase from the yeast *Cryptococcus flavus*. Fems Microbiology Letters 2004; 231:165-169.
- [41] Hamilton LM, Kelly CT, Fogarty WM. Production and properties of the raw starch-digesting α -amylase of *Bacillus* sp. IMD435. Process Biochemistry 1999; 35:27-31.
- [42] Rahmon R, Saxema RK, Khan S. Bleach-stable, alkaline protease from *Bacillus* sp. Biotechnology Letters 1999 2:135-138.
-

-
- [43] Nascimento WC, Martins ML. Production and properties of an extracellular protease from thermophilic *Bacillus* sp. *Brazilian Journal of Microbiology* 2004; 35:91-96.
- [44] Secades P, Guijarro JA. Purification and characterization of an extracellular protease from the fish pathogen *Yersinia rockery* an effect of culture conditions on production. *Applied and Environmental Microbiology* 1999; 65:3969-3979.
- [45] Bressolier MP, et al. Purification and characterization of a keratinolytic serina proteinase from *Streptomyces albidoflavus*. *Applied and Environmental Microbiology* 1999; 65:2570-2576.
- [46] Chellapan S, Jasmin C, Bashur M. et al. Production, purification and partial characterization of a novel proteases from marine *Engyodontium album* BTMS10 under solid state fermentation. *Process Biochemistry*. Oxford, UK, in Press, 2005.
- [47] Brock TD, Madigan MT, Martinko JM, Parker J. *Biology of Microorganisms*. 7 ed. New York: Prentice-Hall International, 1994.
- [48] Kumar CG, Takagi MH. Microbial alkaline proteases: from a bioindustrial view point. *Biotechnology Advances* 1999; 17:561-594.
- [49] Rodrigues FS. Análise filogenética de bactérias rizosféricas de duas espécies frutíferas da Amazônia Central pela construção de bibliotecas genômicas 16S rRNA. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Manaus: Dissertação de Mestrado (Agricultura no Trópico Úmido do Programa Integrado de Pós-Graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais, INPA), 2008.
- [50] Batista-Silva L, Peixoto JCC, Astolfi-filho S, Leomil L. Diversidade bacteriana do solo de Terra Preta de Índio e Terra Mulata da Amazônia Ocidental. Manaus: Dissertação de Mestrado (Programa de Pós-Graduação em Diversidade Biológica - UFAM), 2009.
-