



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS - UFAM
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**Estudo da alfa amilase de *Bacillus koreensis* isolado de ecossistema aquático da
Amazônia: clonagem molecular, expressão e caracterização.**

ROGÉRIO DE OLIVEIRA NEVES

Manaus – AM
Junho de 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS - UFAM
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

ROGÉRIO DE OLIVEIRA NEVES

**Estudo da alfa amilase de *Bacillus koreensis* isolado de ecossistema aquático da
Amazônia: clonagem molecular, expressão e caracterização.**

Tese apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em
Biotecnologia como parte dos
requisitos para obtenção do título
de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Dr. Spartaco Astolfi Filho

Manaus – AM
Junho de 2018

AGRADECIMENTOS

A Deus, Jesus e os anjos pela constante presença em meu lar.

Aos meus pais Carmem de Oliveira Neves e Carlos Roberto Neves.

Aos meus irmãos Roberto de Oliveira Neves e Robson de Oliveira Neves.

As minhas sobrinhas Camile Vitória Neves, Lívia Neves e Nicole Neves.

Ao meu filho Pablo Felipe Mendonça Neves.

Minha noiva Natália Carvalho e sua família.

Ao meu orientador Prof. Dr. Spartaco Astolfi Filho.

Aos meus amigos do Centro de Apoio Multidisciplinar - CAM, Laboratório de Tecnologia do DNA, Universidade Federal do Amazonas.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1	Ecosistemas aquáticos da Bacia hidrológica amazônica	16
2.2	Sistemas aquáticos e a comunidade microbiana	17
2.3	Enzimas	17
2.4	Enzimas vegetais	18
2.5	Enzimas animais	18
2.6	Enzimas microbianas	19
2.7	Amilases	19
2.8	Enzimas comerciais	20
3	OBJETIVO	22
3.1	GERAL	22
3.2	ESPECÍFICOS	22
4	MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1	Coleta de amostras de água	23
4.2	Isolamento, seleção e caracterização morfológica das UFC'S	24
4.2.1	Plaqueamento das Amostras de água	24
4.2.2	Detecção da atividade amilolítica	24
4.2.3	Caracterização morfológica	24
4.3	Identificação molecular	25
4.3.1	Extração, quantificação do DNA total e amplificação do gene rRNA 16S pela PCR	25
4.3.2	Sequenciamento do gene rRNA 16S	26
4.3.3	Identificação molecular (gene rRNA 16S)	26
4.3.4	Construção da árvore filogenética do gene rRNA 16S dos isolados bacterianos pelo método de distância	26
4.4	Desenho dos iniciadores, amplificação e sequenciamento do gene Amy (alfa amilase)	27
4.5	Árvore filogenética do gene Amy (alfa amilase)	28
4.6	Otimização da sequência para a síntese química do gene Amy	29

4.7	Transformação genética da bactéria DH5 α com os vetores pBSK-AMYKOR e o pDMU01-GFP para a clonagem	29
4.8	Construção do vetor de expressão genética pDMU01-AMYKOR	29
4.9	Estudo da regulação do sistema de expressão genética pDMU01-AMYKOR	31
4.10	Expressão genética da alfa amilase pelo sistema pDMU01-AMYKOR em DH5 α F'Iq e a precipitação com etanol 50%	32
4.11	Comparação das condições bioquímica e físico-químicas da atividade das enzimas alfa amilase selvagem e a recombinante do <i>Bacillus koreensis</i> isolado do rio Mamori/AM	33
4.11.1	Estudo da atividade da alfa amilase do isolado bacteriano	33
4.11.2	Velocidade da reação dextrinizante da alfa amilase <i>Bacillus koreensis</i> selvagem	33
4.11.3	Variação de pH das reações da alfa amilase <i>Bacillus koreensis</i> selvagem	34
4.11.4	Variação de temperatura das reações da alfa amilase <i>Bacillus koreensis</i> selvagem	34
4.11.5	Cinética da alfa amilase do <i>Bacillus koreensis</i>	34
4.12	Estudo das parâmetro físico-químico da alfa amilase recombinante (AMYKOR)	35
4.12.1	Velocidade da reação da alfa amilase recombinante (AMYKOR)	35
4.12.2	Efeito da variação de pH	35
4.12.3	Efeito da temperatura	35
4.12.4	Cinética da alfa amilase do <i>Bacillus koreensis</i>	35
4.13	Controle de substrato (positivo para o amido)	36
4.14	Branco reacional (ausência de amido)	36
4.15	Determinação da média e desvio padrão das reações enzimáticas	36
5	RESULTADOS	37
5.1	Isolamento das UFC's do ecossistema aquático amazônico	37
5.2	Revelação do halo por vapor de iodo em meio de cultivo LB ¼ com 1% de amido	37
5.3	Caracterização morfológica das UFC's por microscopia óptica	38
5.4	Abordagem molecular para identificar as UFC's	39

5.4.1	Extração e amplificação do gene rRNA 16S pela PCR	39
5.4.2	Sequenciamento do gene rRNA 16S	40
5.4.3	Identificação molecular (gene rRNA 16S)	41
5.4.4	Filogenia dos isolados bacterianos dos ecossistemas aquáticos da Amazônia com o uso do gene rRNA 16S	41
5.5	Desenho de iniciadores, amplificação do gene da alfa amilase (Amy) e sequenciamento	44
5.6	Estudo filogenético do gene Amy do <i>Bacillus koreensis</i> (sequência de DNA)	45
5.7	Otimização da sequência para a síntese química do gene Amy do <i>Bacillus koreensis</i> isolados no rio Mamori	47
5.8	Transformação genética da DH5 α para a clonagem dos vetores pBSK-AMYKOR e o vetor pDMU01-EG17, minipreparação de plasmídeos, construção do vetor de clonagem	48
5.8.1	Transformação genética da DH5 α pelos vetores pBSK-AMYKOR e pDMU01-EG17 e a minipreparação do DNA plasmidial	48
5.8.2	Construção do vetor de expressão genética do gene AMYKOR	49
5.9	Estudo da regulação da expressão do gene AMYKOR	50
5.10	Expressão genéticas quantitativa do gene AMYKOR da enzima alfa amilase	50
5.11	Estudo comparativo da atividade dextrinizante da alfa amilase do extrato enzimático do <i>Bacillus koreensis</i> precipitada (etanol 50%), e a alfa amilase recombinante (AMYKOR) precipitada (etanol 50%). Velocidade inicial das reações enzimáticas da alfa amilase precipitada com etanol 50%. Variação de pH e temperatura nas reações enzimáticas da alfa amilase precipitadas com etanol 50%. Determinação da velocidade máxima e km das reações enzimáticas da alfa amilase precipitadas.	52
5.11.1	Velocidade da reação enzimática da alfa amilase precipitada do <i>Bacillus Koreensis</i>	52
5.11.2	Variação de pH das reações enzimáticas da alfa amilase do precipitado <i>Bacillus koreensis</i>	53

5.11.3	Varição de Temperatura da reação enzimática da alfa amilase precipitada com etanol 50% do <i>Bacillus koreensis</i>	54
5.11.4	Cinética enzimática Michaelis-Menten da alfa amilase do <i>Bacillus koreensis</i> precipitada com etanol 50% (Km e velocidade máxima)	55
5.12	Velocidade da reação enzimática da alfa amilase precipitada com etanol 50% do sistema de expressão genética pDMU01-AMYKOR	57
5.12.1	Varição do pH da reação enzimáticas da alfa amilase (AMYKOR) recombinante e precipitada com etanol 50%	58
5.12.2	Varição da temperatura da reação enzimática da alfa amilase recombinante precipitada com etanol 50%	59
5.12.3	Michaelis-Mentem da reação enzimática da alfa amilase precipitado AMYKO	60
5.13	Comparação da quantidade de enzima por mL, após a precipitação com etanol 50% da alfa amilase recombinante e a alfa amilase do <i>Bacillus koreensis</i> selvagem e os parâmetros cinéticos da reação enzimática	62
6	DISCUSSÃO	64
6.1	Prospecção de bactérias com potencial dextrinizante (alfa amilase) dos ecossistemas aquáticos dos rios Negro, Solimões e Mamori	64
6.2	Identificação molecular dos isolados bacterianos dos ecossistemas aquáticos da Amazônia e a expressão genética da alfa amilase do <i>Bacillus koreensis</i> selvagem	65
6.3	Construção do sistema de expressão genética (pDMU01-AMYKOR) e a expressão do gene da alfa amilase recombinante	66
6.4	Estudo comparativo da atividade da alfa amilase recombinante com a alfa amilase do <i>Bacillus koreensis</i> selvagem	68
7	CONCLUSÃO	70
8	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71
	APÊNDICE	77

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Esquema da construção do vetor de expressão genética pDMU01-AMYKOR. 31
- Figura 2:** Revelação da atividade enzimática da alfa amilase com vapor de iodo sublimado dos UFC's dos Rios Negro, Solimões e Mamori, isoladas em meio de cultivo LB ¼ com 1% de amido (fécula de mandioca). Isolados 100 (rio Negro), isolado 148 (rio Solimões) e os isolados 178, 147 e 175 (rio Mamori). 38
- Figura 3:** Fotomicrográfica de campo claro dos isolados dos ecossistemas aquáticos dos rios Negro, Solimões e Mamori. Isolados 100 (rio Negro), isolado 148 (rio Solimões) e os isolados 178, 147 e 175 (rio Mamori). 39
- Figura 4:** Perfil eletroforético da extração de DNA total das UFC's isoladas dos sistemas aquáticos dos rios Negro, Solimões e Mamori. Isolados 100 (rio Negro), isolado 148 (rio Solimões) e os isolados 178, 147 e 175 (rio Mamori). 39
- Figura 5:** Perfil eletroforético de Amplicons de 500 pb do gene rRNA 16S em gel de agarose 0,8% das UFC's isoladas bacterianos dos rios Negro, Solimões e Mamori. M, marcador molecular de tamanho de 1 Kb; Canaleta 1, isolado 175 (rio Mamori); Canaleta 2, isolado 147 (rio Mamori); Canaleta 3, isolado 148 (rio Solimões); Canaleta 4, isolado 100 (rio Negro); Canaleta 5, isolado 178 (rio Mamori); Canaleta 6, isolado 178 (rio Mamori) e Canaleta 7, controle negativo da Reação em Cadeia da Taq-DNA polimerase (PCR). 40
- Figura 6:** Quality table (PHRED) dos dados brutos do sequenciamento do gene rRNA 16S dos isolados dos rios Negro, Solimões e Mamori. 41
- Figura 7:** Dendograma filogenético (Neighbor-Joining) das sequências de DNA do gene rRNA 16S dos isolados dos rios Negro (100_RN) e Mamori (178_RM e 147_RM), e com as sequências do gene rRNA 16S das espécies encontradas e obtidas do banco de dados NCBI. O alinhamento e a matriz de distância foram calculados com o algoritmo p-distance, com bootstrap teste de 500 repetições. 43

- Figura 8:** Perfil eletroforético da amplificação do gene *Amy* (alfa amilase) dos isolados dos ecossistemas aquáticos da Amazônia. Isolados do rio Mamori (147, 178 e 175), isolados do rio Solimões (148) e isolado do rio Negro (100). Marcador molecular de tamanho de 1 Kb (Kb), controle negativo (C-) para a PCR. 43
- Figura 9A:** Dendograma filogenético (Neighbor-Joining) das sequências de DNA do gene *Amy* dos isolados do rio Mamori - *Amy*₁₇₈ (RM_*Bacillus koreensis*), e com as sequências de DNA do gene *Amy* das várias espécies encontradas e obtidas do banco de dados NCBI. O alinhamento e a matriz de distância foram calculados com o algoritmo p-distance, com bootstrap teste de 500 repetições. 46
- Figura 9B:** Dendograma filogenético (Neighbor-Joining) das sequências de aminoácidos do gene *Amy* do isolado do rio Mamori - *Amy*₁₇₈(RM_seq. aa), e com as sequências de DNA do gene *Amy* das várias espécies encontradas e obtidas do banco de dados NCBI. O alinhamento e a matriz de distância foram calculados com o algoritmo p-distance, com bootstrap teste de 500 repetições. 47
- Figura 10:** Análise eletroforética da digestão do vetor pDMU01-AMYKOR e o vetor pDMU01-GFP com as enzimas de restrição *NdeI* e *BamHI* em gel de agarose 0,8% corado com Brometo de Etídio. 1, ausência de enzima; 2, presença da enzima *NdeI*; 3, ausência de enzima; 4, presença da enzima *BamHI*; 5, ausência de enzima; 6, presença das enzimas *NdeI* e *BamHI*; M, Ladder de 1kb; 7, ausência de enzima e o 8, presença das enzimas *NdeI* e *BamHI*. 49
- Figura 11:** Perfil da atividade enzimática qualitativa da alfa amilase recombinante com a utilização de amido 1% no meio LB, além da presença ou ausência de glicose 0,5%, e IPTG 1 mM no estudo da regulação da expressão genética do gene AMYKOR; 50
- pL 01 - presença de glicose 0,5% e ausência de IPTG 1 mM.
pL 02 - ausência de glicose 0,5% e IPTG 1 mM.
pL 03 - presença de glicose 0,5% e IPTG 1 mM.
pL 04 - ausência de glicose 0,5% e presença de IPTG 1 mM.
- Figura 12:** Curva de calibração de amido corado com solução FUWA. 51

Figura 13:	Curva de crescimento da DH5 α F'Iq e a expressão da alfa amilase recombinante com indutor da expressão do operon lac 1mM de IPTG e a Glicose 0,5%.	52
Figura 14:	Velocidade inicial da Alfa amilase do <i>Bacillus koreensis</i> precipitada com etanol 50% do extrato enzimático.	53
Figura 15:	Alfa amilase do <i>Bacillus koreensis</i> precipitada com etanol 50% e variação de pH. Foi determinado o desvio padrão médio por reação enzimática.	54
Figura 16:	Alfa amilase do <i>Bacillus koreensis</i> precipitada com etanol 50% e variação de temperatura. Foi determinado o desvio padrão médio por reação enzimática.	55
Figura 17:	Michaelis-Menten da reação enzimática da alfa amilase precipitada com etanol 50% do <i>Bacillus koreensis</i> . Foi determinado o desvio padrão médio por reação enzimática.	56
Figura 18:	Duplo Recíproco da atividade enzimática da alfa amilase precipitada com etanol 50% do <i>Bacillus koreensis</i> . A cada reação enzimática foi determinado o desvio padrão médio.	57
Figura 19:	Perfil da velocidade inicial da atividade enzimática da alfa amilase recombinante (AMYKOR) precipitada com etanol 50%.	58
Figura 20:	Alfa amilase recombinante (AMYKOR) precipitada com etanol 50% e variação de pH. Foi determinado o desvio padrão médio por reação enzimática	59
Figura 21:	Alfa amilase recombinante (AMYKOR) precipitada com etanol 50% e variação de temperatura. Foi determinado o desvio padrão médio por reação enzimática.	60
Figura 22:	Michaelis-Menten da reação enzimática da alfa amilase recombinante (AMYKOR) precipitada com etanol 50% do <i>Bacillus koreensis</i> . Foi determinado o desvio padrão médio por reação enzimática.	61
Figura 23:	Duplo Recíproco da atividade enzimática da alfa amilase recombinante (AMYKOR) precipitada com etanol 50%. Foi determinado o desvio padrão médio por reação enzimática.	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Representação geográfica dos pontos de coletas de amostras de água dos rios Negro, Solimões e Mamori, nos períodos de maio e agosto de 2015.	23
Tabela 2:	Iniciadores desenhados para amplificar o gene Amy da alfa amilase das <i>Bacillus koreensis</i> do rio Mamori.	27
Tabela 3:	Iniciadores desenhados para amplificar o gene Amy da alfa amilase das <i>Bacillus koreensis</i> do rio Mamori.	28
Tabela 4:	Isolamento total de UFC's com a capacidade de hidrolisar o amido dos rios Negro, Solimões e Mamori, no período de maio e agosto de 2015.	37
Tabela 5:	Sequência de aminoácido do gene Amy do <i>Bacillus koreensis</i> (rio Mamori).	48
Tabela 6:	Parâmetros da atividade enzimática da alfa amilíase recombinante e a alfa amilase do <i>Bacillus koreensis</i> selvagem, precipitadas com etanol 50.	63

RESUMO

A região amazônica possui uma imensa Biodiversidade de ecossistemas aquáticos do planeta e várias vias bioquímicas nestes ecossistemas aquáticos, atuando na reciclagem do carbono orgânico, tal como, a alfa amilase. Para isto, o objetivo deste trabalho foi isolar bactérias amilolíticas dos ecossistemas aquáticos da Amazônia, seleção de um bom produtor de alfa amilase, clonagem e expressão do gene da alfa amilase (Amy). Com o propósito de isolar as unidades formadoras de colônias (UFC's) e identificar a atividade enzimática amilolítica qualitativa e quantitativa, além de, clonar o gene AMYKOR da alfa amilase e expressar em *E. coli*. As mostras de água foram coletadas nos rios Negro, Solimões e o Mamori, e posteriormente, foram identificados clones com a capacidade de hidrolisar amido. A seguir, foi extraído do DNA total das bactérias amilolíticas para amplificação dos genes de RNA Ribossomal 16 S e do gene de alfa-amilase para identificação taxonômica molecular. As análises das sequências mostraram ser *Bacillus koreensis* o isolado melhor produtor de alfa-amilase. Subsequentemente, foi enviado para a síntese química a sequências do gene alfa amilase, que posteriormente, foi clonado e expresso em *E. coli*. O *B. koreensis* e o clone recombinante de *E. coli* produtores de alfa-amilase foram cultivados em 50 mL meio LB com agitação a 30°C e 37°C respectivamente. As células foram retiradas por centrifugação a baixa velocidade e as enzimas dos sobrenadantes precipitadas com etanol 50%, recuperando-se um total de 106 unidades de alfa amilase (recombinante) e 120 unidades de alfa amilase selvagem de *Bacillus koreensis*. Os resultados da caracterização bioquímica mostraram que tanto a enzima natural como a recombinante apresentaram pH ótimo igual a 6 e temperatura ótima de 60 °C, para ambas as enzimas estudadas. Verificamos os parâmetros da cinética enzimática aparente de Km de 4,8 mg/mL e a velocidade máxima aparente de 2,6 mg⁻¹ . mL⁻¹ . minuto⁻¹ da alfa amilase recombinante, bem como, os parâmetros da cinética enzimática aparentes de Km aparente de 4,0 mg/mL e a velocidade máxima aparente de 2,3 mg⁻¹ . mL⁻¹ . minuto⁻¹ da alfa amilase selvagem do *Bacillus koreensis*. Pode-se verificar que tanto a alfa amilase natural como a recombinante apresentaram temperaturas ótimas, pHs ótimos e parâmetros cinéticos similares. Esses parâmetros indicam que a enzima tem potencial para uso industrial.

PALAVRAS-CHAVE: Bacia Amazônica, rio Negro, rio Solimões, rio Mamori, Vetor pDMU01 e AMYKOR.

ABSTRACT

The Amazon region has an immense Biodiversity of aquatic ecosystems of the planet and several biochemical pathways in these aquatic ecosystems, acting in the recycling of the organic carbon, such as the alpha amylase. For this, the objective of this work was to isolate amyolytic bacteria from Amazonian aquatic ecosystems, selection of a good alpha amylase producer, cloning and expression of the alpha amylase gene (Amy). In order to isolate the colony forming units (CFUs) and to identify the qualitative and quantitative amyolytic enzyme activity, besides cloning the AMYKOR gene of the alpha amylase and expressing it in *E. coli*. The water samples were collected in the Negro, Solimões and Mamori rivers, and later, clones with the ability to hydrolyze starch were identified. It was then extracted from the total DNA of the amyolytic bacteria for amplification of the Ribosomal 16 S RNA and alpha-amylase genes for molecular taxonomic identification. Sequence analysis showed that *Bacillus koreensis* was the best producer of alpha-amylase. Subsequently, sequences of the alpha amylase gene were sent to the chemical synthesis, which was subsequently cloned and expressed in *E. coli*. *B. koreensis* and the recombinant alpha-amylase producing *E. coli* clone were cultured in 50 ml LB medium with shaking at 30 °C and 37 °C respectively. Cells were removed by slow speed centrifugation and the enzymes from supernatants precipitated with 50% ethanol, recovering a total of 106 units of alpha amylase (recombinant) and 120 units of wild alpha amylase from *Bacillus koreensis*). The results of the biochemical characterization showed that both the natural and the recombinant enzyme presented optimum pH equal to 6 and optimum temperature of 60 °C, for both enzymes studied. We verified the parameters of apparent enzyme kinetics of K_m of 4.8 mg / mL and the apparent maximum rate of 2.6 mg⁻¹. mL⁻¹. minute⁻¹ of the recombinant alpha amylase, as well as apparent enzyme kinetics parameters of apparent K_m of 4.0 mg / ml and the apparent maximum rate of 2.3 mg⁻¹. mL⁻¹. minute⁻¹ of the wild-type alpha amylase from *Bacillus koreensis*. It can be seen that both natural and recombinant alpha amylase exhibited optimum temperatures, optimum pHs and similar kinetic parameters. These parameters indicate that the enzyme has potential for industrial use.

KEY WORDS: Amazon basin, Rio Negro, Solimões river, Mamori river, Vector pDMU01 and AMYKOR.

1. INTRODUÇÃO

O bioma amazônico com imensa fauna, flora e os ecossistemas aquáticos é definido como uma das maiores biodiversidades do planeta. Neste ecossistema, a água é um dos fatores mais importantes, pois participam da dinâmica da vazão de rios e lagos, quando ocorre precipitação pluvial, nos quais os rios enchem e conseqüentemente alagam os lagos, as terras planas e a floresta em sua margem, posteriormente, conectam os lagos e as áreas várzeas ao rio. Além disso, todo o sedimento em suspensão, presente na massa de água, são levados para os maiores afluentes do rio Amazonas (Sioli, 1951; Borén e Giúdice, 2008).

As terras planas alagadas e áreas em torno, são utilizadas para o cultivo de mandioca, que é a base da alimentação da população regional (Cravo *et al.*, 2002), boa parte da produção agrícola de mandioca é utilizada para a produção de farinha. Com isso, geram resíduos provenientes da parte de caule, casca e amido. Esses resíduos amiláceo, oriundos da produção de farinha, são carregados pelo processo de lixiviação, e quando acessam os ecossistemas aquáticos, induzem a divisão e o crescimento celular de populações de microrganismos pelo processo de bioestimulação, por consequência da decomposição da matéria orgânica e assimilação do carbono orgânico presente nos resíduos, além de causar o desequilíbrio e alterações na composição das comunidades bacterianas (Fernandes Júnior e Cereda, 1996; Azevedo & Farjalla, 2010). A respeito disso, tais mecanismos ativam as principais vias metabólicas voltadas para a expressão genética das enzimas da família amilolítica.

As enzimas amilolíticas são amplamente distribuídas nos ecossistemas e atuam na reciclagem do carbono orgânico, com a hidrólise das ligações α -1,4-O-glicosídicas e ligações α -1,6-O-glicosídicas presente na composição estrutural do amido (Fukusumi *et al.*, 1988). O grânulo de amido de mandioca é composto por amilose e amilopectina, além da presença de grupo fosfato, proteínas e lipídeos (Jobling, 2004; Denardin & Silva, 2009; Polizeli & Silva, 2016). Dentro do contexto, as enzimas glicosídeo-hidrolases são classificadas em endoamilases e exoamilases, quanto ao mecanismo de ação, substrato hidrolisado, ligação química que compõem a estrutura do substrato e o reconhecimento pela enzima do grupo químico (Lin *et al.*, 1997). As endoamilases são compostas por alfa amilase, CGTase e pululanase, que clivam ao acaso as ligações glicosídicas no interior da molécula, enquanto as exoamilases são constituídas pelas β -amilase, glicosidase, que hidrolisam a molécula a partir de uma extremidade não redutora (Surmely *et al.*, 2003).

A alfa amilase (E.C 3.2.1.1.), pertencente às endoamilases, são caracterizadas por apresentarem propriedades catalíticas, com a quebra de ligações alfa-glicosídicas do amido em glicose (menor frequência) e pequenos oligossacarídeos glicosil (alta frequência) com vários graus de polimerização e ramificação (Yang *et al.*, 2012). As alfas amilases possuem a estrutura (β/α)₈ ou barril TIM, evidenciadas nas famílias GH-70 e GH-77 das glicosídeo-hidrolases, além da subfamília glicosil hidrolase 13. São produzidas por vários gêneros de fungos filamentosos, leveduras e bactérias. Aquelas produzidas por bactérias como *Bacillus* sp., com aplicação comercial, são as mais estudadas por apresentarem características desejáveis, como a termoestabilidade (Pandey *et al.*, 2000). Além da utilização para a modificação de produtos industriais, compoem produtos nas indústrias farmacêutica, têxtil, alimentação humana e animal, produção de detergente, bebidas fermentáveis e destiladas (Polizeli & Silva, 2016).

A produção de alfa amilase extracelular, a partir de microrganismos selvagens ou recombinantes, ocorre devido a secreção da enzima para o meio líquido e sólido durante o processo fermentativo, facilitando a sua purificação. Bukhari & Rehman (2015) isolaram e purificaram alfa amilase de *Bacillus subtilis*, provenientes de isolados ambientais Cruz *et al.*, (2011), produziram alfa-amilase de *Aspergillus niger* em resíduos de cascas de mandioca. Já via recombinante, Onodera *et al.*, (2013) analisaram, expressaram e caracterizaram a alfa amilase de *Haloarcula japonica* enquanto que Yang *et al.*, (2012) obtiveram a alfa amilase por meio de clonagem, expressão e caracterização de *Bacillus subtilis*.

Diante disto, o mercado mundial de enzimas é promissor em consequência da forte demanda para a substituição dos catalizadores químicos pelos biodegradáveis (Monteiro & Silva, 2009). Portanto, a finalidade deste trabalho é realizar a bioprospecção na biodiversidade bacteriana dos ecossistemas aquáticos da Amazônica da enzima alfa amilase, com o propósito de viabilizar a produção de enzimas recombinantes na Amazônia.

2. REVISÃO DE BIBLIOGRÁFICA

2.1 Ecossistemas aquáticos da Bacia hidrológica amazônica

A bacia Amazônica é a mais densa rede fluvial do mundo, com cerca de 7×10^6 Km² de extensão e vazão de 209.00 m³/segundo (Moreira-Turcq *et al.*, 2003). Sua formação iniciou por volta de 10.000 a 12.000 anos atrás, com base no C¹⁴ (Maslin *et al.*, 2000). Esta bacia hidrográfica escoava toda a massa de água drenada da região Amazônica para o Oceano Pacífico, após a elevação da cordilheira dos Andes, por volta de 65 milhões de anos atrás, em consequência do choque das placas tectônicas, o curso da bacia hidrográfica da Amazônia foi alterado para o ocidente, Nesse sentido, a massa de água drenada da bacia Amazônica é escoada para o Oceano Atlântico, portanto, a bacia hidrográfica da Amazônia fornece 20% de toda água doce que chega nos oceanos e mares, além de compor a maior biodiversidade de ecossistemas aquáticos do mundo, com a composição de ecossistemas de água branca, cristalina e preta (Sioli, 1951; Borén e Giúdice, 2008), sendo formado por um incontável número de igarapés, riachos, córregos, várzeas alagadas e rios (Sioli, 1951, 1975, 1976, 1984).

Os rios amazônicos são classificados de acordo com suas propriedades físicas e químicas. De acordo com Sioli (1951, 1975, 1976, 1984), as massas de águas da bacia Amazônica que compõem os rios foram classificadas como águas claras, brancas e pretas.

Os rios de água branca apresentam águas turvas, com coloração barrenta e transparência entre 0.10 e 0.50 m. Nasce na região Andina ou Pré-Andina, carregando altas cargas de sedimentos em suspensão devido à erosão do solo nas cabeceiras e a sua concentração de sedimentos é de 0,1 g/L. O pH destes rios é quase neutro, com variação de 6.5 a 7.0. Segundo Moreira-Turcq *et al.* (2003), no período de abril de 1996, a concentração total de sólidos suspensos (TSS) na sub-bacia de águas brancas foi de 7.5 mg/L e em julho houve um aumento no TSS, apresentando 22.7 mg/L. São exemplares destes rios o Solimões-Amazonas, Madeira, Purus, Juruá, entre outros (Santos & Ferreira, 1999).

Os rios de água clara apresentam águas de coloração verde a verde-oliva e transparência entre 1.10 a 4.50 m. Eles nascem nos maciços pré-cambrianos das Guianas e do Brasil central e devido à presença do relevo mais regular, oferecem pouca possibilidade de erosão. O pH destes rios varia entre 4.5 a 7.0. Como estas regiões contêm as estações de seca e chuvosa bem definida, estes rios carregam material orgânico ou inorgânico em suspensão em quantidade apreciável no período chuvoso. A concentração média do total de sólidos suspensos é 7.2 mg/L do rio Tapajós e Xingu e para o rio Trombetas a média é 8

mg/L (Moreira-Turcq *et al.*, 2003). São exemplares os rios Tapajós, Xingu, Trombetas, entre outros (Santos & Ferreira, 1999).

Os rios de água preta apresentam coloração marrom e transparência entre 1.30 a 2.90 m. Nasce nos escudos da Guiana e do Brasil central onde o relevo é suave e os processos de erosão são poucos intensos e reduzidos pela densa mata pluvial e a carga de sedimento é baixa e com a ausência de cálcio e magnésio na formação geológica. As águas são ácidas com o pH entre 3.0 a 5.0 e há pobreza em sais minerais. A coloração escura é provocada pela decomposição de material orgânico produzindo pelas florestas, resultando em vários produtos solúveis como os ácidos húmicos e fúlvicos. São exemplos os rios: Negro, Uatumã, Preto da Eva, Urubu, Cururu, entre outros (Santos & Ferreira, 1999).

2.2 Sistemas aquáticos e a comunidade microbiana

Os lagos, rios e as várzeas, que constituem a bacia hidrológica amazônica é um dos nichos mais importante para a decomposição de matérias orgânicas de origem animal e vegetal, resultante das várias vias bioquímicas ativas das comunidades de bacteriumplancton encontradas nestes ecossistemas de água doce, da maior biodiversidade do mundo, a Amazônia. Nesse sentido, foram encontrados nos sistemas aquáticos dos rios Negro e Solimões, uns dos principais afluentes do rio Amazonas pelo estudo das comunidades de bactérias através da abordagem molecular, que possível acessar o gene rRNA 16S, sem a necessidade de isolar as bactérias, e amplificar e sequenciar o gene rRNA 16S, de modo que, foi possível identificar as comunidades bacterianas dos ecossistemas aquáticos em nível de gênero bacteriano (Neves, 2013). Através da abordagem molecular foi possível encontrar bactérias descritas na literatura de decorrência em ecossistemas terrestres que atuam nas vias biogeoquímicas e na reciclagem do carbono orgânico.

2.3 Enzimas

Enzimas são macromoléculas predominantemente proteica, fundamental a qualquer ser vivo, pois aceleraram as reações químicas que matem e regulam os processos vitais e são encontradas no universo extracelular e intracelular, com isso, a atenção destinada às enzimas foram intensificadas, a partir de meados do século XX. De modo que, avançaram as pesquisas tecnológicas e científicas em áreas como a bioquímica, subsequentemente, foram extraídas de células ou recuperadas de meios de cultivos microbiológico, além serem utilizadas em bioprocessos industriais.

A parti da utilização das enzimas em bioprocessos industriais, houve grande procura por enzimas para a aplicação industrial, de tal forma que, foi intensificado a produção de enzimas industriais, a comercialização e a substituição de catalizadores químicos por enzimas, devido as condições brandas de pH e temperatura, em que estas macromoléculas geralmente atuam. O uso de enzimas pode reduzir os custos de produção e reverter em benefícios econômicos como consequência da redução de tempo e de energia utilizada para transformação da matéria prima em produto, assim como, o aumento da vida útil dos equipamentos que não precisarão ser submetidos a altas pressões e temperatura evitando a corrosão dos mesmos. Portanto, o uso de enzimas em bioprocessos industriais reduz a toxicidade dos rejeitos industriais que compromete o equilíbrio dos ecossistemas do plante, além de reduzir a carga poluidora dos afluentes industriais e auxiliar a rápida degradação dos compostos sólidos proveniente da atividade industrial.

2.4 Enzimas vegetais

Os seres vivos são produtores de enzimas, alguns em grande quantidade e outras, principalmente aqueles envolvidos em mecanismos regulatórios, em menores concentrações. As enzimas de origem vegetal que apresentam significativa importância industrial e comercial, e cuja a aplicação, já está consolidada em diversas indústrias, são as proteases papaína, bromelina (França-Santos *et al.*, 2009; Ferreira, *et al.*, 2011) e ficina e as amilase de cereais. A maioria das enzimas vegetais é comercializada em preparações brutas, mas a papaína e a bromelina são também comercializadas puras.

Deste modo, a regularidade e suprimento mundial de papaína, nos dias atuais, assim como, a flutuação do preço deste produto é consequência de vários fatores. Visto que a produção de enzimas de origem vegetal depende das condições de plantio, que envolvem desde o preparo do solo, a mão de obra, as condições ambientais e as políticas agrícolas nacionais e internacionais. Estes fatores são os principais motivos para o baixo número de enzimas vegetais comercializadas, entretanto, as técnicas no futuro de cultura de células vegetais, ampliadas para biorreatores industriais poderão resolver a deficiência da produção de enzimas de células vegetais.

2.5 Enzimas animais

As enzimas extraídas de tecidos animais encontram barreiras na produção industrial, sendo algumas delas extraídas de células vegetais, além da, legislação que regula a atividade agroindustrial e pecuária, da extração do tecidos e glândulas animais as enzimas, para evitar

a transmissão de vírus que ocasionalmente pode infectar os rebanhos e as preparação enzimática. Assim sendo, produtor de enzimas de origem animal de ter um certificado que ateste as condições fitossanitárias do rebanho. Muitas enzimas podem ser extraídas de tecidos animais, tais como pepsina, quimiotripsina, tripsina, elastase, lipase, hialuronidase e catalase, mas poucas são utilizadas industrialmente.

2.6 Enzimas microbianas

A produção de enzimas microbianas, diferente das enzimas vegetais e animais, não depende das intempéries climáticas, uma vez que são produzidas por biorreatores e as condições de cultivo são finamente controladas por monitores eletrônicos. Como também, adicionando a este fato a enorme biodiversidade de microrganismos disponíveis nos mais variados ecossistemas terrestres, aquáticos e atmosféricos, sendo que o habitat onde vive o microrganismo e as condições são fundamentais para a prospecção das macromoléculas adaptadas a estas condições, de tal forma que, microrganismos extremófilos são fonte de enzimas que atuam em condições extremas de temperatura, pH, concentração de sais e pressão acima das convencionais, e as enzimas comercializadas são proteases bacterianas (Lima *et al.*, 2014), amilase fúngicas (Santana *et al.*, 2012) e bacterianas, celulase e pectinas.

2.7 Amilases

No século passado surgiu uma grande indústria de processamento de amido, o trabalho pioneiro para a hidrólise do amido que utilizavam ácido, no entanto, este processo não era econômico, além de ser altamente poluente e o rendimento de glicose era muito baixo e a purificação do produto final por cromatografia. Na década passada, foi modificado o processo de hidrólise ácida do amido pela hidrólise das reações enzimáticas, denominadas de amilase ou enzimas conversoras de amido. Estas enzimas amplamente utilizadas para a produção de maltodextrinas, amidos modificados, e xarope de glicose ou frutose. Atualmente, estas enzimas compreendem 30% da produção mundial de enzimas.

O grande número de amilase pertencente à clã GH-H que inclui três famílias de glicosil transferase (GH-13, GH-70 e GH-77) e compartilham a estrutura de barril (α/β)₈, a hidrólise ou formação de ligação glicosídicas na conformação e a conservação de certos resíduos de aminoácidos no sítio catalítico, foram encontrados 21 tipos de reações diferentes e produtos específicos são encontrados nesta família, portanto, a estrutura de 25 membros desta família foi determinada por cristalografia a interação do substrato ou produto e o papel de diferentes aminoácidos encontrados próximo e no centro do sítio ativo.

O amido, um dos polissacarídeos mais importante da natureza, é o produto de reserva de muitas plantas economicamente importante como trigo, arroz, milho, mandioca e batata. É constituído por resíduos de α -D-glicose unidos uns aos outros por ligações glicosídicas. Existe dois tipos de polímeros presentes no amido tais como amilose e amilopectina. A amilose é um polímero do tipo linear composta por até 6000 resíduos de glicose ligados por ligações glicosídicas α -1,4. Já amilopectina consiste de pequenas cadeias lineares de 10 a 60 resíduos de glicose unidos por ligações α -1,4 e de cadeias laterais de cerca de 15 a 45 resíduos unidos por ligação α -1,6 (Said & Pietro, 2014).

As enzimas amilases são classificadas em quatro tipos de enzimas conversoras de amido: endoamilases, exoamilases, enzimas desramificadoras e transferases. As endoamilases são enzimas capazes de quebrar ligações glicosídicas α -1,4 das cadeias de amilose ou amilopectina. As exoamilases hidrolisam ligações glicosídicas α -1,4 e α -1,6. As desramificadoras quebram exclusivamente ligações glicosídicas α -1,6 e as transferases hidrolisam ligações glicosídicas α -1,4 da molécula doadora e transferem parte do doador para um aceptor glicosídica formando uma nova ligação glicosídica (Said & Pietro, 2014). As amilases podem ser encontradas em diversos organismos e estão entre as mais importantes enzimas usadas com a finalidades industriais.

Dentre as enzimas de fonte microbiana, a alfa amilase é uma das mais produzidas industrialmente pela demanda das indústrias farmacêutica em análises clínicas, têxtil para a remoção de goma de amido do tecido de algodão, alimentícia, indústria de papel celulose, detergentes e etanol (Gupta *et al.*, 2003; Monteiro & Silva, 2009).

2.8 Enzimas comerciais

Mundialmente, a produção de enzimas cresce cerca de 6,3% ao ano baseado na demanda do mercado mundial consumidor, destacando principalmente os países China e Índia, como os maiores consumidores de produtos enzimáticos, nos quais movimentaram uma quantia de US\$ 7 bilhões em 2017 (The Freedonia Group). Sendo que o Brasil, movimentou em torno de US\$ 147 milhões em 2005 que representa 3,7% do mercado mundial, e ainda somos dependentes da produção de enzimas industriais, para este período importamos 86% e exportamos 14% de enzimas industriais, indicando o atraso no desenvolvimento e produção de enzimas especiais (enzimas para a pesquisa, enzimas terapêuticas e enzimas para diagnósticos) e industriais (biocombustíveis, papel e celulose, têxtil, alimentação humana e animal, detergentes) (Monteiro & Silva, 2009).

As enzimas são utilizadas mundialmente para a produção de diversos produtos industriais fazendo parte da composição ou empregadas para a obtenção do produto. Antigamente a obtenção de enzimas era a partir de tecidos animais, vegetais e fontes microbianas selvagens. A enzima de fonte microbiana é amplamente utilizada por ser de fácil obtenção, sua produção independente de fatores sazonais, com a possibilidade de utilizar resíduos agroindustriais de baixo custo, aplicando a otimização do processo fermentativo e obtendo um elevado rendimento da produção de enzimas, através do uso de microrganismo naturais e/ou recombinante (Monteiro & Silva, 2009).

Portanto, a biodiversidade bacteriana dos ecossistemas aquáticos na região Amazônica abriga uma diversidade de biomoléculas pouco estudada, o que torna necessário mais estudos buscando suas potencialidades em aplicações biotecnológicas, levando a possibilidade do desenvolvimento de bioprocessos sustentáveis ecologicamente, para a futura substituição das tecnologias clássicas e poluidoras, por processos com menor ação impactante ao meio ambiente.

3. OBJETIVOS

3.1 GERAL

Isolar bactérias amilolíticas dos ecossistemas aquáticos da Amazônia, seleção de um bom produtor de alfa amilase, clonagem e expressão do gene da alfa amilase (Amy).

3.2 ESPECÍFICOS

Isolar unidades formadoras de colônias (UFC's) em meio seletivo dos rios Negro, Solimões e Mamori.

Selecionar isolados bacterianos com capacidade de hidrolisar amido.

Classificar taxonomicamente os isolados bacterianos por meio das sequências dos rRNA 16S.

Caracterizar a alfa amilase do isolado bacteriano melhor produtor dessa enzima.

Sequenciar o gene *Amy* do isolado bacteriano melhor produtor de alfa-amilase

Expressar a alfa amilase do *Bacillus koreensis* em *Escherichia coli*.

Caracterizar a atividade da alfa amilase recombinante comparativamente com a enzima selvagem.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta de amostras de água

As coletas de amostras de água foram realizadas nos períodos de maio e agosto de 2015 no rio Negro, porto do CEASA (BR319) em direção ao encontro das águas, e após o encontro das águas dos rios Negro e Solimões, prosseguiu-se a coleta no rio Solimões até a margem do porto do Careiro da várzea/AM (BR319). Subseqüentemente, foram coletadas amostras de água em agosto de 2015 no rio Mamori, afluente do rio Madeirinha próximo da cidade de Altazes/AM (tabela 1). Este nicho aquático, foi escolhido para o isolamento de bactérias, por consequência, da alta produção de farinha de mandioca artesanal amplamente praticada pelos ribeirinhos ao longo do rio Mamori. Conseqüentemente, os resíduos da produção de farinha de mandioca são descartados no rio Mamori, impactando o ecossistema aquático do rio Mamori, pela alta taxa de resíduos amiláceos.

Tabela 1: Representação geográfica dos pontos de coletas de amostras de água dos rios Negro, Solimões e Mamori, nos períodos de maio e agosto de 2015.

Ponto	Referência Geográfica	Local
RN01	S 03° 06'05.5" – W 059° 58'26.4"	Negro
RN02	S 03° 07'59.1" – W 059° 55'31.9"	Negro
RN03	S 03° 08'04.8" – W 059° 54'21.7"	Negro
RN04	S 03° 08'04.8" – W 059° 54'21.7"	Negro
Soli01	S 03° 08'21.7" – W 059° 54'15.5"	Solimões
Soli02	S 03° 09'01.9" – W 059° 54'18.9"	Solimões
Soli03	S 03° 09'34.1" – W 059° 54'13.6"	Solimões
Soli04	S 03° 09'46.6" – W 059° 54'10.1"	Solimões
Soli05	S 03° 10'24.4" – W 059° 54'02.1"	Solimões
RM	S 3° 38'43.44" – O 59° 37'53.39"	Rio Mamori

Para a coleta de água foi utilizado uma garrafa coletora de PCV (Poli Cloreto de Vinila) com dimensões de 10 cm de diâmetro e 50 cm de comprimento afixada a um peso náutico de 5 Kg em 10 metros de cabo. Foram coletados 300 mililitros de água a 1 metro de profundidade e os materiais foram esterilizados com hipoclorito de sódio 0,2% e posteriormente lavadas com água destilada e álcool 70%. A coleta e transporte de material

biológico foi autorizada pelo registro no SISBIO, Ministério de Meio Ambiente, sob número 43846-1, no período de 2014 a 2015.

Após as coletas, as amostras foram transportadas para o laboratório de Tecnologia de DNA, Centro de Apoio Multidisciplinar – CAM, Instituto de Ciências Biológicas –ICB, Universidade Federal do Amazonas – UFAM e em seguida processadas.

4.2 Isolamento, seleção e caracterização morfológica das UFC'S

4.2.1 Plaqueamento das Amostras de água

Foram semeadas 50 µL de amostras de água em meio de cultivo sólido LB (Laurie & Bertani) 1/4 com 1% de amido (fécula de mandioca). As placas de Petri foram incubadas a 30 °C por 24 horas. Após o crescimento, cada UFC foi repicada por estrias de esgotamento até a purificação das colônias.

4.2.2 Detecção da atividade amilolítica

Quanto ao crescimento celular, os isolados bacterianos foram revelados com vapor de iodo sublimado em Capela de Exaustão com Fluxo de ar, os halos formados pela atividade da enzima secretada no meio de cultura foram mensurados com o uso de paquímetro, mensurando também, os diâmetros das colônias (Hankin & Anagnostakis, 1976).

O método utilizado para determinar a atividade enzimática, foi a operação matemática de divisão do diâmetro do halo da atividade enzimática (dividendo), pelo diâmetro da colônia (divisor), de tal forma que, podemos determinar os índices enzimáticos, e os valores maiores ou iguais a 2, foram determinantes para a seleção das bactérias com maior atividade amilolítica das Unidades Formadoras de Colônias – UFC's. Os isolados positivo para a hidrólise do amido foram criopreservados em Glicerol 50% a - 80 °C (Heylen *et al.*, 2012; Scussiato *et al.*, 2014).

4.2.3 Caracterização morfológica

Dentre as colônias isoladas, foram selecionados cinco isolados que apresentaram índice enzimático (I.E.) igual ou superior a dois (2), para prosseguir com o trabalho de caracterização morfológica.

Para a caracterização da morfologia bacteriana, foi utilizada a técnica de microscopia óptica, com o auxílio dos corantes cristal de violeta, lugol e a safranina, foi possível melhorar o ajuste do contraste, de tal forma que, facilitou a visualização da morfologia das bactérias, além da coloração de Gram.

4.3 Identificação molecular

4.3.1 Extração, quantificação do DNA total e amplificação do gene rRNA 16S pela PCR

Os isolados escolhidos pela atividade enzimática qualitativa, foram semeados em meio líquido LB ¼ (Laurie & Bertani) e incubados a 30 °C, por 18 horas, em 150 rpm, logo após, foram centrifugados a 12000 rpm a temperatura ambiente para a formação do *pellet* celular, em seguida, foi removido o meio de cultivo líquido e os *pellets* celulares foram secos a temperatura ambiente para extração do DNA total.

Em seguida, foi utilizado o método Fenol/Clorofórmio para extração do DNA total do isolado bacteriano. Subsequentemente, foi montado o sistema de eletroforese em gel de agarose 0,8% e corado com o brometo de Etídio (Sambrook *et al.*, 2001), além da, quantificação da massa de DNA total ($\eta\text{g}/\mu\text{L}$) por espectrofotometria (Nanodrop®).

Após a caracterização e quantificação, o DNA total foi diluído em concentração de 60 $\eta\text{g}/\mu\text{L}$ e para a reação da PCR, foi montado uma outra diluição, 30 $\eta\text{g}/\mu\text{L}$. Desta diluição, foi transferido 2 μL de DNA e 3 μL de água MilliQ autoclavada para a reação da PCR.

Para a técnica da Reação em Cadeia da Taq-DNApolimerase, foi utilizado 25 μL de volume final por reação, dentro do contexto, foi montado o mix de 20 μL por reação da PCR com o tampão de reação 1X, Cloreto de Magnésio (MgCl_2 - 2,5 mM), dNTP's 2,5 mM, iniciadores Forward (F - 0,2 pmols/ μL) e o Reverse (R - 0,2 pmols/ μL) desenhados pelo grupo de pesquisa CAM/UFAM e com a enzima Taq-DNApolimerase 0,3 Unidades/25 μL , por fim, foram montadas 5 reações por amostras com o volume final de 125 μL .

As reações foram levadas para o termociclador (Bio Rad - T100 - Thermal Cycler) e foi utilizado 95 °C a 3 minutos na fase inicial, para aquecer a tampa do equipamento, posteriormente, para um termo ciclo foi utilizado 95 °C a 50 segundos na desnaturação do DNA, para o anelamento dos iniciadores ao DNA, foi reduzida a temperatura para 58 °C por 1 minuto e a fase de extensão, foi de 72 °C por 40 segundos, no final dos 36 ciclos, foi utilizado a temperatura de 72 °C por 2 minutos.

Subsequentemente, a amplificação do gene rRNA 16S, foi montado o sistema de eletroforese Tris-Ácido Bórico-EDTA 1X, logo foi aplicado 100 μL de Amplicons do gene rRNA 16S no gel de agarose 0,8% a 90 Volts por 4 horas e corado com Brometo de Etídio. Posteriormente a migração do DNA no gel de agarose, foram excisados do gel de agarose os Amplicons. Em seguida, foi utilizado o Kit de purificação de DNA do gel de agarose, seguindo a orientação do fabricante (illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit).

4.3.2 Sequenciamento do gene rRNA 16S

O sequenciamento pelo método de Sanger (Sanger & Coulson, 1975) inicia-se com a amplificação pela técnica de PCR da sequência molde (Amplicons do gene rRNA 16S dos isolados bacterianos). Neste procedimento, foi utilizado 2 µL do produto da PCR a [50 ng/ µL] e 1,5 µL do Kit Dye, que contém as bases nitrogenadas (guanina, citosina, guanina e adenina) marcadas com cromóforos distintos, além de ¼ das bases nitrogenadas do Kit Dye são terminadoras de transcrição e foram utilizados para paralisar a reação da Taq-DNA polimerase gerando fragmentos de DNA de vários tamanhos, e logo foi utilizado 1 µL de primer e 5 µL de água, para um volume final de 10 µL para a reação de sequenciamento.

As sequências de DNA amplificadas de vários tamanhos foram aplicadas no sequenciador (Applied Biosystems, série 3500) e os dados brutos obtidos após o sequenciamento, foram analisados com o uso de ferramentas de bioinformática e as bases nitrogenadas nomeadas. Esses softwares são responsáveis por transformar os dados brutos em sequências de DNA, além de prever a qualidade de cada base da sequência.

As sequências foram nomeadas e a qualidade das bases foram calculadas de acordo com o algoritmo PHRED, submetidas ao programa localizado no endereço <http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/> [20/10/2017] (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA).

4.3.3 Identificação molecular (gene rRNA 16S)

Após o sequenciamento do gene rRNA 16S e predição das sequências de DNA pela ferramenta de bioinformática PHRED, as sequências foram enviadas para a plataforma de bioinformática localizada no National Center for Biotechnology Information – NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.c>), com o uso da ferramenta de bioinformática BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, [20/10/2017]), foram comparadas as sequências do gene rRNA 16S com as sequências depositadas no Gene Bank (data base – 16S ribossomal RNA sequences (Bacteria and Archaea) [22/05/2017]) – NCBI por alinhamento, foi obtido a porcentagem do parentesco entre as espécies bacterianas estudadas.

4.3.4 Construção da árvore filogenética do gene rRNA 16S dos isolados bacterianos pelo método de distância

O algoritmo de distância-p, foi escolhido para calcular a distância evolutiva entre as sequências obtidas pelo sequenciamento do gene rRNA 16S dos isolados dos rios Negro, Solimões e Mamori, além de calcular a proximidade entre os pares de sequências dos

isolados. Estes métodos são baseados em uma matriz de distância evolutiva que calcula a distância entre sequências de DNA e aminoácidos.

O modelo de árvore escolhido para prosseguir com o trabalho da tese, após o cálculo da matriz de distância, foi o agrupamento de vizinhos (Neighbor-Joining), este algoritmo heurístico calcula a evolução mínima entre as OTUS (Unidades Taxonômicas Operacionais) analisadas, onde a evolução mínima está contida a cada passo da análise, produzindo uma única árvore no final do processo de análise (Lim et al., 2006).

O alinhamento local das sequências do gene rRNA 16S dos isolados dos rios Negro, Solimões e Mamori, foi com o uso da ferramenta de bioinformática Clustal W2, subsequentemente, foi utilizada a ferramenta de bioinformática MEGA X, para o cálculo das distâncias entre as sequências, a confecção da matriz de distância e a construção da árvore filogenéticas dos isolados dos rios Negro, Solimões e Mamori.

4.4 Desenho dos iniciadores, amplificação e sequenciamento do gene Amy (alfa amilase)

O desenho foi iniciado com o estudo das 5 sequências do gene da alfa amilase do *Bacillus Koreensis* e 1 sequência do *Cytophaga s.p.* e 1 sequência do *Anoxybacillus s.p.* e as sequências estão depositadas no National Center for Biotechnology Information – **NCBI**, logo depois, foi criado um arquivo com as 7 sequências e com o auxílio do programa ClustalW foram alinhadas localmente, após o alinhamento foram desenhados três pares de iniciadores, classificados de Forward: os iniciadores NV1A anela na posição entre 121 pares de base (pb) a 144 pb; NV1B anela na posição entre 145 pb a 163 pb e o NV1C anela na posição entre 797 a 819. Os iniciadores Reverse foram classificados de NV2A e anela na posição entre 1541 pb a 1561; NV2B anela na posição entre 1519 a 1540 e o NV2C anela na posição entre 797 a 819 (Tabelas 2 e 3). Logo após, os desenhos foram enviados para a empresa Exxtend Biotecnologia Ltda., para a síntese química dos oligonucleotídeos.

Tabela 2: Iniciadores desenhados para amplificar o gene Amy da alfa amilase das *Bacillus koreensis* do rio Mamori.

Primer Forward			
Identificação	Sequência do oligonucleotídeo	Temperatura de anelamento - TM	Posição de anelamento na região do gene AMY
NV1A	5' ATG ATG CAA TAT TTT GAA TGG TAC 3'	TM 62 °C	121 – 144 pb
NV1B	5' GTT CCA AAT GAC GGC CAG C 3'	TM 60 °C	145 - 163 pb
NV1C	5'AGA TGC GGT GAA ACA TAT TAA G 3'	TM 60 °C	797 – 819 pb

Tabela 3: Iniciadores desenhados para amplificar o gene Amy da alfa amilase das *Bacillus koreensis* do rio Mamori.

Primer Reverse			
Identificação	Sequência do oligonucleotídeo	Temperatura de de anelamento - TM	Posição de anelamento na região do gene AMY
NV2A	5' TTA CTG CTG AAC CCA TAC AG 3'	TM 58 °C	541 - 1561 pb
NV2B	5' AA ACA GAA CCC CCG TTT ACA G 3'	TM 62 °C	1519 – 1540 pb
NV2C	5' TTA ATA TGT TTC ACC GCA TCT AG 3'	TM 62 °C	797 – 819 pb

Os iniciadores NV1B e NV2B; NV1C e NV2B, foram utilizados para amplificação do gene Amy, com o auxílio de PCR. Subsequentemente, os Amplicons do gene da alfa amilase dos isolados bacterianos foram purificados com o uso do kit (illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit) e seguindo a orientação do fabricante.

O método de Sanger foi utilizado para sequenciar o gene Amy dos isolados dos ecossistemas aquáticos da Amazônia, já descrito anteriormente (item 4.3.2). Consequentemente, foram utilizados os iniciadores desenhados NV1B, NV2B, NV1C e NV2C, e os dados brutos do gene da alfa amilase (Amy), foram utilizados para a nomeação das bases nitrogenadas, além da predição das sequências com o auxílio do programa PHRED, como também, já descrito no item 4.3.2 e a ferramenta CAP3, para predição da sequência consenso.

4.5 Árvore filogenética do gene *Amy* (alfa amilase)

A ferramenta utilizada na análise filogenética, foi o MEGA X, e consequentemente, o método escolhido foi o Neighbor-Joining. Para a análise, foi utilizado a sequência de DNA do gene *Amy* do isolado do rio Mamori e identificado como *Bacillus koreensis* e as sequências de DNA do gene *Amy* depositadas no banco de dados (NCBI) de espécies bacterianas. Bem como, foram calculadas pelo algoritmo p-distancia a distância genética entre as sequências analisadas, além de, utilizar o bootstrap de 500 repetições.

Para a construção da segunda árvore filogenética, como já descrito, foram utilizadas a sequência de aminoácidos da enzima alfa amilase (Amy) do isolado do rio Mamori e identificado como *Bacillus koreensis* e as sequências de aminoácidos da alfa amilase depositadas no banco de dados do NCBI de espécies bacterianas.

4.6 Otimização da sequência para a síntese química do gene Amy

A sequência do gene Amy foi analisada por alinhamento com o auxílio da ferramenta de bioinformática BLAST no Gene Bank (NCBI) [20/08/2017], em seguida, foi traduzida para a sequência de aminoácidos com o auxílio da ferramenta de bioinformática *Translate tool* (<https://web.expasy.org/translate/>). Posteriormente, foi analisado o peptídeo sinal da sequência com a ferramenta de bioinformática SignalPn 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) [21/08/2017]. Logo após, foram desenhados dois sítios de restrição, o primeiro, logo após, o promotor na posição 1pb, o sítio da enzima de restrição *NdeI*. O segundo sítio de restrição, foi colocado posteriormente ao stop códon, o sítio da enzima de restrição *BamHI* na posição 1560. Foi utilizado o programa NEBcutter V2.0 (<http://www.labtools.us/nebcutter-v2-0/>) [22/08/2017] para verificar se há sítos de restrição das enzimas *NdeI* e *BamHI* na sequência do gene. Em seguida, o desenho do gene Amy da alfa amilase foi enviado para a Empresa GenOne Biotechnologies para a síntese química que remeteu o mesmo clonado no vetor comercial nomeado pBSK-AMYKOR (figura 1).

4.7 Transformação genética da bactéria DH5 α com os vetores pBSK-AMYKOR e o pDMU01-GFP para a clonagem

A transformação genética da *E. coli* de linhagem DH5 α com o vetor pBSK-AMYKOR, também, com o vetor pDMU01-EG17. Foi utilizado o método de pulso elétrico (eletroporação), posteriormente, foi semeada em meio de crescimento LB sólido com 1% de amido e 200 μ g/mL de ampicilina, logo depois, foi incubada a 37 °C, por 18 horas, de acordo com Sambrook *et al.*, (2001).

Após a clonagem do pBSK-AMYKOR e o pDMU01-EG17 em DH5 α , as hospedeiras bacterianas foram repicadas em meio de cultivo líquido LB, com 100 μ g/mL de ampicilina; incubada a 37 °C em 150 rpm por 18 horas e, posteriormente, foi extraído o DNA plasmidial utilizando o kit (illustraTM plasmidPrep Mini Spin Kit), de acordo com a orientação do fabricante.

4.8 Construção do vetor de expressão genética pDMU01-AMYKOR

O vetor de expressão genética pDMU01 contém o gene de resistência a ampicilina, responsável pela seleção da bactéria *E.coli* recombinante, gene de origem de replicação do PUC, promotor DM02, operador Lac 01 modificado, sítio de ligação (Polylink) do gene exógeno, e o terminador de transcrição rrnB.

O pDMU01-EG17 têm sítios de restrição das enzimas *NdeI* e *BamHI*, localizado no operon lac, que foram utilizados para clonar o gene EG17 (mapa físico do vetor pDMU01, figura 1), posteriormente, foi removido o gene EG17 do vetor pDMU01 com as enzimas de restrição *NdeI* e *BamHI*. Após a remoção do gene EG17, foi montado o sistema de eletroforese em gel de agarose 0,8% com o vetor linear, logo depois, da migração do DNA plasmidial pelo gel de agarose 0,8%, foi possível excisar o DNA plasmidial e remover do gel de agarose 0,8%, e subsequentemente, foi purificado o DNA plasmidial do vetor de expressão genética pDMU01 com o kit (illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit), seguindo as orientações do fabricante. Além da, remoção do gene AMYKOR do vetor de clonagem pBSK (mapa físico do vetor pBSK, figura 1) com as enzimas de restrição *NdeI* e *BamHI*, logo após, a purificação do DNA do gene AMYKOR excisado e removido do gel de agarose 0,8%.

Subsequentemente, com a purificação do DNA plasmidial (pDMU01) e o DNA do gene AMYKOR, foi construído o sistema de ligação com a enzima DNA ligase, o tampão da enzima, o gene AMYKOR (90 ng) e o vetor (60 ng), posteriormente, o sistema foi incubado a 16 °C, por 18 horas. Após a ligação, o sistema de expressão genética foi precipitado com Glicogênio 1mg/mL, NaCl 3 M e etanol. Logo depois, foi centrifugado a 14.000 rpm por 30 minutos, a 4 °C e lavado com etanol 70%, novamente centrifugado a 14.000 rpm por 30 minutos, a 4 °C e seco em fluxo de ar (Fluxo laminar) e o DNA foi ressuspendido em água destilada autoclavada e MilliQ.

A DH5α foi transformada geneticamente pelo vetor de expressão genética pDMU01-AMYKOR, logo foi semeada em meio de crescimento sólido LB seletivo com 1% de amido, para a seleção das transformantes recombinantes, foi utilizado 200 ng/mL de ampicilina. Após a minipreparação de DNA plasmidial das células transformadas e recombinantes, foram analisados pelo perfil de restrição, com o uso das enzimas *NdeI* e *BamHI* em gel de agarose 0,8%, com a finalidade de selecionar o vetor pDMU01-AMYKOR.

O sistema de digestão qualitativo, foi montado com 0,5 µL de enzimas, 1 µL de DNA do vetor (100 ng/µL), e o tampão das enzimas, para um volume reacional de 10 µL, e subsequentemente, o vetor pBSK-AMYKOR e o pDMU01-EG17 foram digeridos com as enzimas de restrição *NdeI* e *BamHI*.

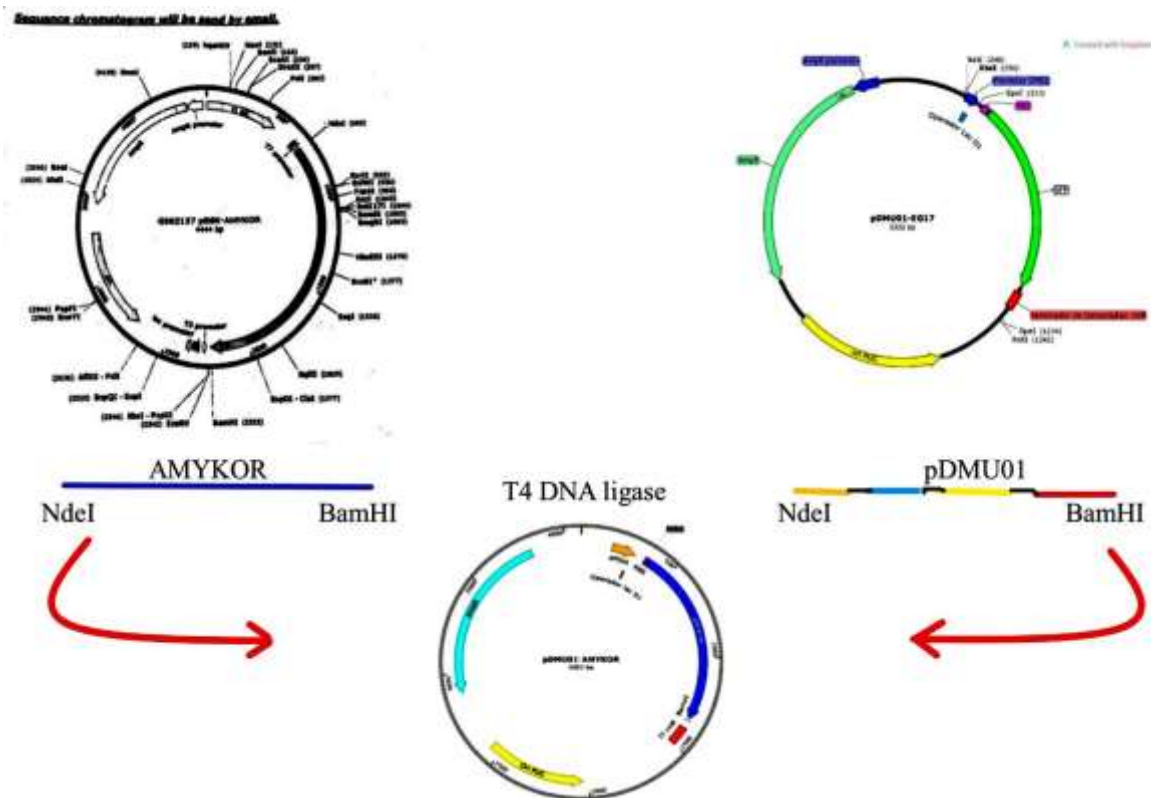


Figura 1: Esquema da construção do vetor de expressão genética pDMU01-AMYKOR

4.9 Estudo da regulação do sistema de expressão genética pDMU01-AMYKOR

Após a escolha do vetor recombinante, foi utilizado 2 μL do vetor pDMU01-AMYKOR recombinante, para transformação genética da bactéria DH5 α F'Iq (100 μL), pelo método de pulso elétrico. Após a transformação genética da *E.coli*, foi semeada em meio de cultivo sólido LB, com 1% de amido e 200 $\mu\text{g/mL}$ de ampicilina, subsequentemente, incubada a 37 ° C, por 18 horas. Logo, foram identificadas as colônias recombinantes pela formação de halo entorno das colônias bacterianas transformadas e recombinantes, após a reveladas com vapor de iodo sublimado.

Para a análise da expressão genética, foi utilizado o meio de cultivo base LB sólido, com 1% de amido e 100 $\mu\text{g/mL}$ de ampicilina em placa de Petri, além de, testar a presença de glicose 0,5% e IPTG 1mM, bem como, a ausência da glicose 0,5% e IPTG 1mM.

Logo, foram utilizadas 4 placas de vidro, para o repique das 20 colônias positivas na degradação do amido. Consequentemente, foram utilizadas as seguintes condições para o estudo da expressão genética da alfa amilase: placa 01, com presença de glicose 0,5% e ausência de IPTG 1mM, a placa 02, com ausência de glicose 0,5% e IPTG 1 mM, a placa 03, com presença de glicose 0,5% e IPTG 1mM e a placa 04, com ausência de glicose 0,5%

e presença IPTG 1 mM. Logo foram incubadas a 37 ° C, por 18 horas e reveladas com vapor de iodo

4.10 Expressão genética da alfa amilase pelo sistema pDMU01-AMYKOR em DH5α F'Iq e a precipitação com etanol 50%

A *E.coli* de linhagem DH5α F'Iq, foi transformada geneticamente com o plasmídio pDMU01-AMYKOR, foi pré-selecionada com o método de iodométrico, pela formação de halo de hidrólise de amido. Após a seleção das recombinantes, foram pré-inoculadas em meio de crescimento líquido LB, com 100 µg/mL de ampicilina e incubadas a 37 ° C em shaker com agitação de 150 rpm, por 18 horas.

Posteriormente, foi transferido 500 µL do pré-inóculo, para 600 mL de meio de cultivo LB líquido, suplementado com 100 µg/mL de Ampicilina e incubado a 37 ° C a 150 rpm. Subsequentemente, foi monitorado o crescimento celular em espectrofotômetro, com o comprimento do espectro de 600 monômetros e os pontos mensurados de hora em hora, até atingir a densidade Ótica de 0,7 (absorbância), a partir da qual, foi adicionado 1 mM de IPTG, e a expressão genética, se prolongou por mais 4 horas e foi interrompida com a centrifugação a 4000 G por 30 minutos a 4 ° C, e o extrato enzimático foi armazenado a 16 ° C para posterior caracterização da enzima alfa amilase.

Para a caracterização da alfa amilase, foi construída a equação da reta, para a determinação do substrato residual, que não foi convertido em produto pela alfa amilase. Logo, foi utilizado as concentrações de amido, entre 0 a 20 mg/mL, com a presença da solução de FUWA.

Subsequentemente, foram montadas as reações em triplicata com 50 µL de amido em diferentes concentrações e 50 µL de tampão (fosfato de sódio 50 mM, pH 6,0), e logo depois, foram incubadas por 10 minutos a 60°C, em seguida, foi adicionado 100 µL de ácido acético 1 M. Posteriormente, se adicionou 100 µL do reagente FUWA e 4,7 mL de água, as reações foram homogeneizadas por inversão e a leitura feita a 660 nanômetro (nm) em espectrofotômetro, para a definição da equação da reta, foi determinado o coeficiente angular e o coeficiente linear, posteriormente foi determinada a equação da reta.

O extrato bruto foi clarificado por centrifugação a 4000 g por 10 minutos a 4 ° C, em seguida, foi precipitada a enzima alfa amilase com etanol, na concentração de 50%. Para a precipitação (Biazus et al., 2010) foi utilizado 50 mL de extrato enzimático, subsequentemente, o volume do extrato enzimático foi dividido em 2 tubos falcons de 50 mL, logo após foram adicionados 1 volume de etanol 100%. O sistema de precipitação foi incubado a 16 ° C por 16 horas, após a incubação os tubos foram centrifugados 4000 G por

40 minutos a 4 °C, logo depois, foi descartado o sobrenadante por inversão e o pellet de proteínas totais foi seco em fluxo de ar (Fluxo laminar), o pellet proteico então foi ressuspenso em 6 mL de tampão fosfato de sódio 50 mM e pH 6. e por fim, o pellet de proteínas totais foi concentrado 10 vezes.

4.11 Comparação das condições bioquímica e físico-químicas da atividade das enzimas alfa amilase selvagem e a recombinante do *Bacillus koreensis* isolado do rio Mamori/AM

4.11.1 Estudo da atividade da alfa amilase do isolado bacteriano

O método utilizado para a caracterização bioquímica e físico-química da atividade da enzima alfa amilase do *Bacillus koreensis* e a recombinante, foi iodométrico (reagente FUWA), descrito por FUWA, 1954. Além disso, a alfa amilase presente no caldo enzimático foi precipitado com etanol 50% (Biazus *et al.*, 2010), com o propósito de concentrar a alfa amilase dos extratos enzimáticos, de tal forma que, possibilitaram os estudos dos parâmetros ideais da reação enzimática da alfa amilase. Para a caracterização da atividade da alfa amilase, foi selecionado o isolado 178 com o índice enzimático satisfatório para o teste enzimático qualitativa e quantitativos.

4.11.2 Velocidade da reação dextrinizante da alfa amilase *Bacillus koreensis* selvagem

A avaliação da velocidade da reação enzimática da alfa amilase do *Bacillus koreensis* selvagem isolado do rio Mamori e precipitada com etanol 50%, foi prosseguida com a variação da concentração da alfa amilase entre 5 a 30 µL por meio reacional, além do tempo de reação.

Logo, não se alterou o pH, a concentração de substrato (1% de amido) e a temperatura. Subsequentemente, as reações foram incubadas entre 0 a 15 minutos, a 60°C, e posteriormente, as reações foram paralisadas com a adição de 100 µL de ácido acético 1 M. Logo após, foram adicionados 100 µL do reagente FUWA e 4,7 mL de água nas reações enzimáticas, e foram homogeneizadas por inversão e a leitura feita a 660 nanômetros em espectrofotômetro.

O calcular da quantidade de enzima dextrinizante por unidade em mililitros foi possível com a relação matemática direta de 1 unidade de enzima é necessária para hidrolisar o amido e gerar 0,1 mg de dextrinas em um minuto.

4.11.3 Variação de pH das reações da alfa amilase *Bacillus koreensis* selvagem

A avaliação da reação enzimática da alfa amilase do *Bacillus koreensis* selvagem com diferentes condições de pH, foi realizada, variando o pH entre 2 a 10 unidades, no entanto, foi mantida as condições reacionais de 15 µL de alfa amilase precipitada com etanol 50%, 50 µL de amido a 10 mg/mL e 35 µL de tampão fosfato de sódio 50 mM. Subsequentemente, os meios reacionais foram incubados por 3 minutos a 60°C, logo as reações foram paralisadas com a adição de 100 µL de ácido acético 1 M, posteriormente, foi adicionando 100 µL do reagente FUWA e 4,7 mL de água, logo após, as reações foram homogeneizadas por inversão e a leitura feita a 660 nm em espectrofotômetro.

4.11.4 Variação de temperatura das reações da alfa amilase *Bacillus koreensis* selvagem

A avaliação da reação enzimática da alfa amilase do *Bacillus koreensis* selvagem com a variação de temperatura entre 0 e 100 °C, foi executada com as condições não alteradas dos meios reacionais de 15 µL de alfa amilase precipitada com etanol 50% e 50 µL de amido [10 mg/mL], 35 µL de tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 6). Subsequentemente, os meios reacionais foram incubados por 3 minutos em temperaturas entre 0 a 100 °C, logo as reações foram paralisadas com a adição de 100 µL de ácido acético 1 M, posteriormente, foi adicionando 100 µL do reagente FUWA e 4,7 mL de água, logo após, as reações foram homogeneizadas por inversão e a leitura feita a 660 nm em espectrofotômetro.

4.11.5 Cinética da alfa amilase do *Bacillus koreensis*

A determinação aparente da velocidade da reação enzimática da alfa amilase do *Bacillus koreensis* precipitada com etanol 50%, foi executada com a variação da concentração de substrato entre 0 a 20 mg/mL e mantidas as demais condições de pH, temperatura, tempo reacional e a concentração da alfa amilase. Posteriormente a reação enzimática da alfa amilase, e a partir dos resultados obtidos de absorbância, foram calculadas as concentrações de amido residual, utilizando a equação da reta. Subsequentemente, foram calculados os produtos de 6 pontos reacionais. Em seguida, foram determinadas a velocidade da reação enzimática por minuto, visto que, o resultado foi demonstrado em gráfico de dispersão X Y.

O Km e a velocidade máxima foram calculadas, a partir do tratamento matemático dos valores de substrato e a velocidade da reação enzimática da alfa amilase. Nesse sentido, os resultados obtidos pela reação enzimática (Absorbância) e as concentrações utilizadas do substrato, foram divididos por 1, modificando o perfil do gráfico de hipérbole encontrada na

constante de Michaelis-Menten, para o perfil do gráfico de uma reta. Posteriormente foi possível determinar a equação da reata pelo método do duplo recíproco, posteriormente, foram calculados o K_m e a velocidade máxima da reação enzimática da alfa amilase do *Bacillus koreensis* selvagens.

4.12 Estudo das parâmetro físico-químico da alfa amilase recombinante (AMYKOR)

4.12.1 Velocidade da reação da alfa amilase recombinante (AMYKOR)

A avaliação da velocidade da reação enzimática da alfa amilase recombinante e precipitada com etanol 50%, foi através da variação da concentração da alfa amilase entre 5 a 30 μL por meio reacional, além do tempo de reação, metodologia descrita no item **4.11.2**.

4.12.2 Efeito da variação de pH

As reações foram feitas em triplicatas com 50 μL de amido [10 mg/mL], 35 μL de tampão (fosfato de sódio 50 mM) com variação de pH entre 2 a 10 (intervalo de 1 unidade de pH) e 15 μL de extrato bruto. As reações foram incubadas por 3 minutos a 60 °C, em seguida, as reações foram paralisadas com a adição de 100 μL de ácido acético 1 M. Logo após, foram adicionados 100 μL do reagente FUWA e 4,7 mL de água, logo após, foram homogeneizadas por inversão e as leituras feita a 660 nm em espectrofotômetro.

4.12.3 Efeito da temperatura

As reações foram feitas em triplicatas com 50 μL de amido [10 mg/mL], 35 μL de tampão (fosfato de sódio 50 mM, pH 6,0) e 15 μL de extrato bruto. Logo após, as reações foram incubadas por 3 minutos com a temperatura variando entre 0 a 100 °C. As reações foram paralisadas com a adição de 100 μL de ácido acético 1 M. Logo após, foram adicionados 100 μL do reagente FUWA e 4,7 mL de água, subsequentemente, as reações foram homogeneizadas por inversão e as leituras a 660 nm em espectrofotômetro.

4.12.4 Cinética da alfa amilase do *Bacillus koreensis*

Os parâmetros de K_m e velocidade máxima aparente, foram calculados para a atividade da alfa amilase recombinante, como já descrito acima, item **4.11.5**

4.13 Controle de substrato (positivo para o amido)

O controle positivo foi preparado com 50 µL de amido [10 mg/mL], 50 µL de tampão (fosfato de sódio 50 mM, pH 6,0). Foi incubado por 3 minutos a 60 °C e a reação foi paralisada com a adição de 100 µL de ácido acético. Posteriormente foi adicionado 100 µL do reagente FUWA e 4,7 mL de água. O sistema foi homogeneizado por inversão e a leitura feita a 660 nm em espectrofotômetro.

4.14 Branco reacional (ausência de amido)

O controle, com ausência de amido, foi preparado com 70 µL de tampão (fosfato de sódio 50 mM - pH 6,0) e 30 µL de extrato bruto. Incubado por 3 minutos a 60 °C e a reação foi paralisada com a adição de 100 µL de ácido acético 1 M. Logo após, se adicionou 100 µL do reagente FUWA e 4,7 mL de água. Foi homogeneizado por inversão e a leitura feita a 660 nm em espectrofotômetro.

4.15 Determinação da média e desvio padrão das reações enzimáticas

Os dados das reações enzimáticas da alfa amilase em triplicata, foram analisados pelo programa Graphpad Prisma, que calculou a média e desvio padrão dos resultados da atividade dextrinizante das enzimas alfa amilase do *Bacillus koreensis* e a recombinante.

5 RESULTADOS

5.1 Isolamento das UFC's do ecossistema aquático amazônico

Neste trabalho foram isoladas 6.179 unidades formadoras de colônias – UFC's totais dos ecossistemas aquáticos dos rios Negro Solimões e Mamori. A partir desta totalidade, foi observado 1.014 UFC's (tabela 4) com a capacidade de expressar e secretar a alfa amilase em meio de cultivo sólido, sendo confirmado, pela formação de halos transparentes ao redor das colônias em placa de Petri, após a coloração com vapor de iodo.

Por meio da mensuração do índice enzimático dos isolados bacterianos dos rios Negro, Solimões e Mamori, foram selecionadas as Unidade Formadoras de Colônias com o índice enzimática igual ou superior a 2, desta totalidade de UFC's capazes de hidrolisar o amido 1%.

Portanto, verifica-se a quantidade expressiva de bactérias amilolíticas isoladas do rio Mamori em meio de crescimento LB ¼, suplementado com 1% de amido, desta quantidade de bactérias amilolítica. Foi observado uma diferença de 589 UFC's, conforme a comparação dos resultados do rio Mamori, com o resultado do rio Solimões. Entretanto, foi visualizado uma diferença percentual de 5% de UFC's amilolíticas para o rio Solimões, de acordo com, o resultado da comparação com o rio Negro (tabela 4).

Tabela 4: Isolamento total de UFC's com a capacidade de hidrolisar o amido dos rios Negro, Solimões e Mamori, no período de maio e agosto de 2015.

Local de coleta	UFC's totais	UFC's amilolíticas	UFC's amilolíticas \leq 2	UFC's amilolíticas \geq 2	Porcentagem de UFC's amilolíticas
Rio Negro	1.452	87	7	80	5,5 %
Rio Solimões	698	169	3	166	23,7%
Rio Mamori	4.029	758	2	756	18,7%

Os resultados percentuais das unidades formadoras de colônias (UFC's) amilolíticas, foram obtidas considerando a totalidade de isolados da coluna 2 como 100%, para cada local de coleta.

5.2 Revelação do halo por vapor de iodo em meio de cultivo LB ¼ com 1% de amido

A atividade enzimática qualitativa das UFC's isoladas dos ecossistemas aquáticos dos rios Negro, Solimões e Mamori, foram detectadas pela hidrolise do amido 1%, em consequência da formação de halos de degradação (área incolor em torno das colônias), após

a revelação com vapor de iodo, e com o resultado, foi possível visualizar a atividade da alfa amilase secretada no meio de cultivo sólido.

Portanto, com a análise da atividade enzimática qualitativa em meio de cultivo sólido suplementado com 1% de amido, foi possível visualizar isolados com índices amilolítica maior ou igual ao índice enzimático (I.E.) de 2 (figura 2). Sendo que, os índices enzimáticos dos isolados foram de 3,25 (I.E.) para o isolado 175, o isolado 147 de 3 (I.E.) e o isolado 178 de 4 (I.E.) (Ecosistema aquático do rio Mamori), isolado 148 de 3,4 (I.E.) (ecossistema aquático do rio Solimões) e o isolado 100 de 2 (I.E.) (ecossistema aquático do rio Negro) (figura 2).

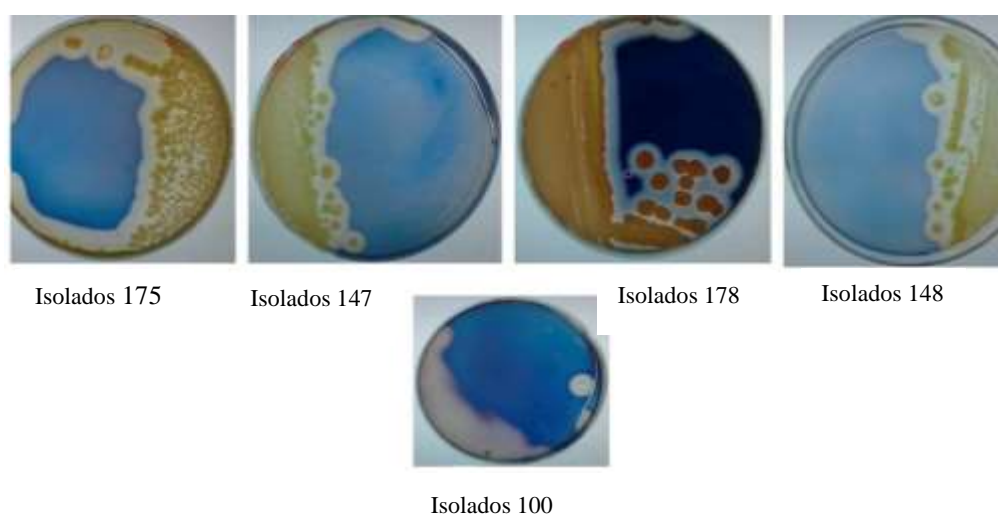


Figura 2: Revelação da atividade enzimática da alfa amilase com vapor de iodo sublimado dos UFC's dos Rios Negro, Solimões e Mamori, isoladas em meio de cultivo LB $\frac{1}{4}$ com 1% de amido (fécula de mandioca). Isolados 100 (rio Negro), isolado 148 (rio Solimões) e os isolados 178, 147 e 175 (rio Mamori).

5.3 Caracterização morfológica das UFC's por microscopia óptica

As UFC's selecionadas pelo índice enzimático, foram caracterizadas morfológicamente pela microscopia óptica e com o auxílio dos corantes foram determinadas as características de Gram positivo para os isolados analisados (Figura 3) dos ecossistemas aquáticos dos rios Negro (isolado 100), Solimões (isolado 148) e Mamori (isolados 178, 147 e 175).

A partir dos métodos clássicos microbiológicos de isolamento em meio de cultivo seletivo, foi possível isolar células bacterianas dos sistemas aquáticos dos rios Negro,

Solimões e Mamari, além de, observar os isolamentos bacterianos purificados, após 3 repiques sucessivos, figura 3.

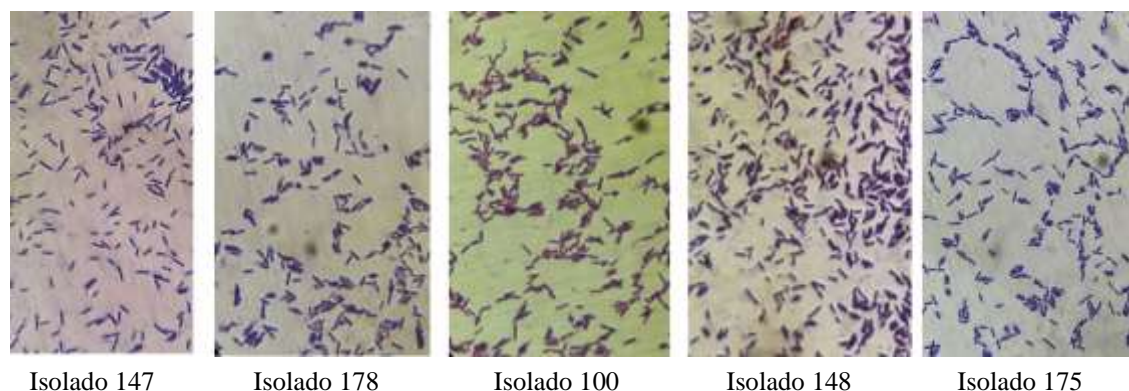


Figura 3: Fotomicrográfrica de campo claro dos isolados dos ecossistemas aquáticos dos rios Negro, Solimões e Mamori. Isolados 100 (rio Negro), isolado 148 (rio Solimões) e os isolados 178, 147 e 175 (rio Mamori).

5.4 Abordagem molecular para identificar as UFC's

5.4.1 Extração e amplificação do gene rRNA 16S pela PCR

Subsequentemente ao estudo da atividade enzimática qualitativa e a caracterização morfológica das bactérias isoladas do ecossistema aquáticos, foram escolhidos as UFC's 147, 178, 100, 148 e 175, para prosseguir com as análises.

Na figura 4, se observa o DNA total extraído e a massa estimada de DNA de cada amostra dos isolados dos sistemas aquáticos dos rios Negro, Solimões e Mamori, além do perfil eletroforético em gel de agarose 0,8% do DNA total dos isolados bacterianos.

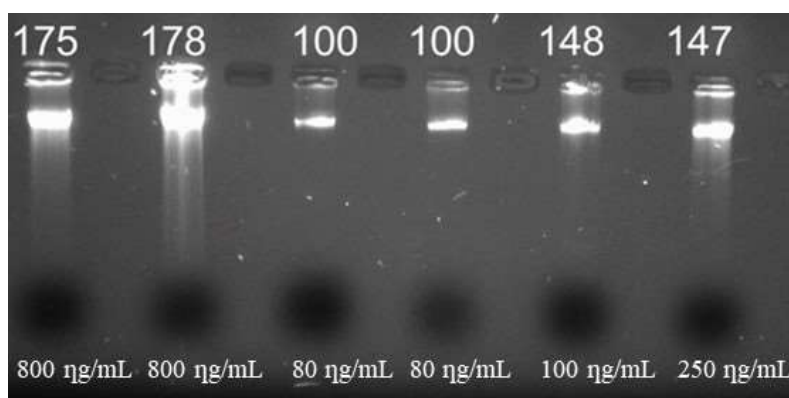


Figura 4: Perfil eletroforético da extração de DNA total das UFC's isoladas dos sistemas aquáticos dos rios Negro, Solimões e Mamori. Isolados 100 (rio Negro), isolado 148 (rio Solimões) e os isolados 178, 147 e 175 (rio Mamori).

Após a extração e quantificação do DNA total das UFC's isoladas, foi montada a PCR para a amplificação do gene rRNA 16S. Conseqüentemente, se visualiza o resultado da

amplificação do gene rRNA 16S pelo perfil eletroforético dos amplicons de tamanho de 500 pares de bases e a massa de DNA estimada em 100 ng/μL (Figura 5).

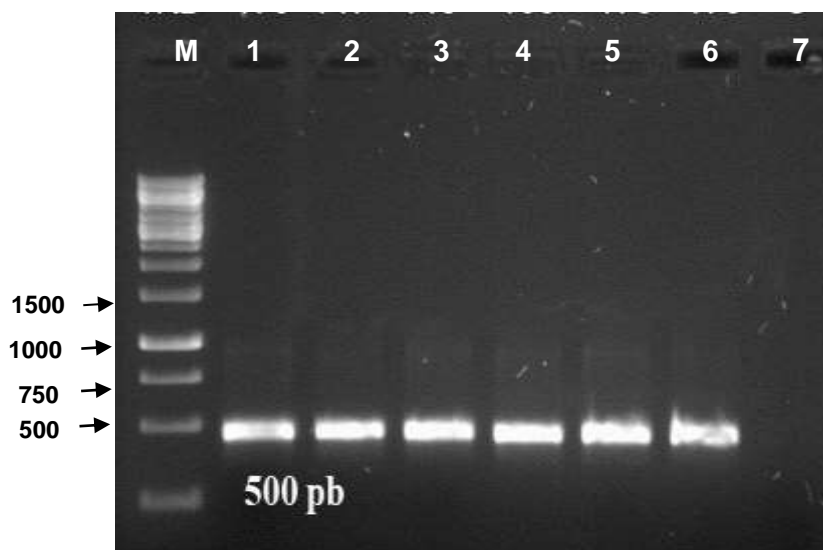


Figura 5: Perfil eletroforético de Amplicons de 500 pb do gene rRNA 16S em gel de agarose 0,8% das UFC's isoladas bacterianas dos rios Negro, Solimões e Mamori. M, marcador molecular de tamanho de 1 Kb; Canaleta 1, isolado 175 (rio Mamori); Canaleta 2, isolado 147 (rio Mamori); Canaleta 3, isolado 148 (rio Solimões); Canaleta 4, isolado 100 (rio Negro); Canaleta 5, isolado 178 (rio Mamori); Canaleta 6, isolado 178 (rio Mamori) e Canaleta 7, controle negativo da Reação em Cadeia da Taq-DNA polimerase (PCR).

5.4.2 Sequenciamento do gene rRNA 16S

Os dados brutos foram analisados pelo Software PHRED que gerou a tabela de qualidade e nomeou as bases nitrogenadas. O resultado do sequenciamento do gene rRNA 16S das UFC's dos ecossistemas aquáticos dos rios Negro, Solimões e Mamori, são mostrados na figura 6A e 6B, que revela o número de bases totais da sequência (comprimento), a qualidade maior de 20 que corresponde 1 erro em cada 100 bases lidas, a cor verde corresponde a alta qualidade das sequências e a cor vermelha representa a baixa qualidade das sequências. Na figura 6A foi desconsiderado as sequências F01.ab1 e F02.ab1 pela baixa qualidade (cor vermelha), logo após, foi refeito o sequenciamento das duas *Read* com o resultado satisfatório para prosseguir o trabalho da tese (figura 6B).

Quality table of: *Rogério_Seq_04022016.zip*

Number of Reads: 10

Read number	Total of bases	# Bases with quality > 20	# Bases with quality > 30	% Vector	> 100 bases & quality > 20
11_C02.ab1	742	238 (32%)	186 (25%)		Ok
9_A02.ab1	647	343 (53%)	315 (49%)		Ok
6_F01.ab1	758	2 (0%)	0 (0%)		No
1_A01.ab1	613	297 (48%)	241 (39%)		Ok
13_F02.ab1	644	303 (47%)	269 (42%)		Ok
14_F02.ab1	849	14 (2%)	0 (0%)		No
3_C01.ab1	1021	1 (0%)	0 (0%)		No
10_B02.ab1	652	223 (34%)	183 (28%)		Ok
2_B01.ab1	630	34 (5%)	13 (2%)		No
5_F01.ab1	636	254 (40%)	221 (35%)		Ok
Total	7192	1709 (24%)	1428 (20%)		No: 4 Ok: 6

Quality table of: *Seq_rogerio%20(2).zip*

Number of Reads: 2

Read number	Total of bases	# Bases with quality > 20	# Bases with quality > 30	% Vector	> 100 bases & quality >
63_C08.ab1	1005	659 (66%)	579 (58%)		Ok
64_H08.ab1	987	731 (74%)	694 (70%)		Ok
Total	1992	1390 (70%)	1273 (64%)		No: 0 Ok: 2

Figura 6: Quality table (PHRED) dos dados brutos do sequenciamento do gene rRNA 16S dos isolados dos rios Negro, Solimões e Mamori.

5.4.3 Identificação molecular (gene rRNA 16S)

O resultado da identificação molecular, para a espécie *Bacillus Koreensis* isolado do rio Mamori, foi visualizado a porcentagem parental de 99% de identidade do isolado 147, 99% de identidade do isolado 178 e 92% de identidade do isolado 175. Com a sequência de DNA do gene rRNA 16 do isolado 148 do Rio Solimões foi possível identificar o *Bacillus nealsonii* com 92% de identidade. Além de, 96% de identidade para a identificação da espécie *Paenibacillus barcinonensis* do isolado 100 do rio Negro.

5.4.4 Filogenia dos isolados bacterianos dos ecossistemas aquáticos da Amazônia com o uso do gene rRNA 16S

A confirmação do parentesco, foi através dos cálculos de proximidade genética das sequências do gene rRNA 16S dos isolados dos rios Mamori e Negro, com as sequências do gene rRNA 16S das espécies encontradas no banco de dados NCBI. Além da, construção de árvores filogenéticas com o algoritmo Neighbor-Joining.

O resultado da análise filogenética (figura 7), demonstrou a formação de um grupo parental taxonômico de *Bacillus koreensis* (strain BR030 – NR_043084.1) do banco de dados (NCBI) com as unidades taxonômicas operacionais do rio Mamori (147_RM e 178_RM), bem como, a visualização de 100% de similaridade na formação dos nós interno

e externo da árvore filogenética (Neighbor-Joining), além do resultado da proximidade genética entre as sequências do gene rRNA 16S dos táxons analisadas.

Como também, foi observado pela análise filogenética (Neighbor-Joining) (figura 7) dos táxons obtidos do banco de dados, (NCBI) *Paenibacillus silvae* strain DB13031(NR_156836.1) e *Paenibacillus polymyxa* strain DSM36 (NR_11773332.2) com a unidade taxonômica operacional do rio Negro (100_RN). Visto que, o resultado da análise filogenética demonstrou que a proximidade parental entre os táxons do gênero *Paenibacillus* foram de 100%, visualizados na árvore filogenética entre o nó interno e externo do grupo parental das espécies analisadas.

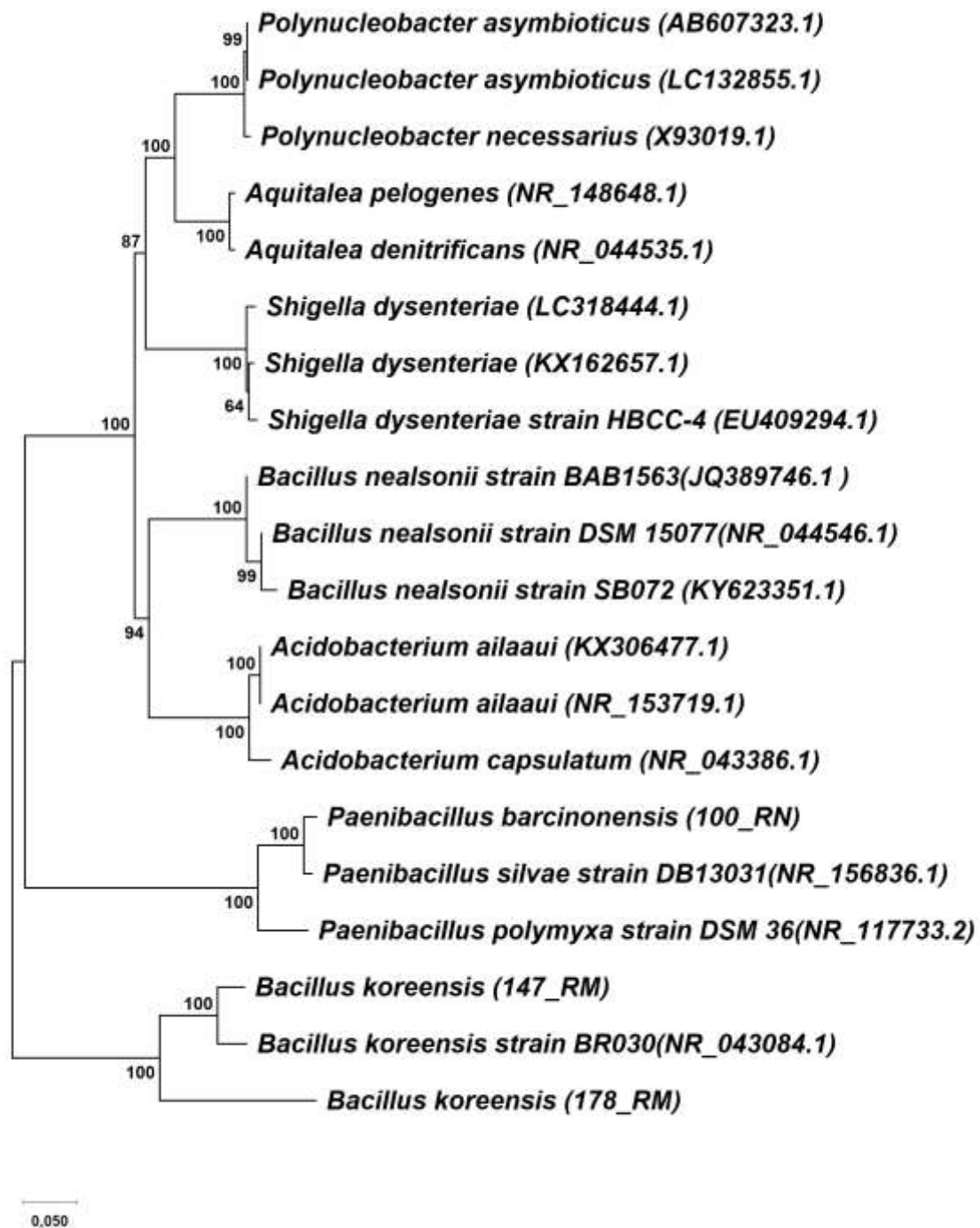


Figura 7: Dendrograma filogenético (Neighbor-Joining) das sequências de DNA do gene rRNA 16S dos isolados dos rios Negro (100_RN) e Mamori (178_RM e 147_RM), e com as sequências do gene rRNA 16S das espécies encontradas e obtidas do banco de dados NCBI. O alinhamento e a matriz de distância foram calculados com o algoritmo p-distance, com bootstrap teste de 500 repetições.

5.5 Desenho de iniciadores, amplificação do gene da alfa amilase (Amy) e sequenciamento

Na figura 8, se observa o resultado da amplificação do gene Amy (alfa amilase) dos isolados dos rios Mamori (147, 178 e 175) identificados de *Bacillus koreensis*, isolado do rio Solimões (148) identificado de *Bacillus nealsonii* e isolados do rio Negro (100) identificado de *Paenibacillus barcinonensis*, bem como, se visualiza Amplicons de tamanho de 1500 pares de bases pelo perfil eletroforético, com o uso dos iniciadores NV1A e NV2A. Além de, Amplicons de 750 pb, com o uso de iniciadores NV1C e NV2B.

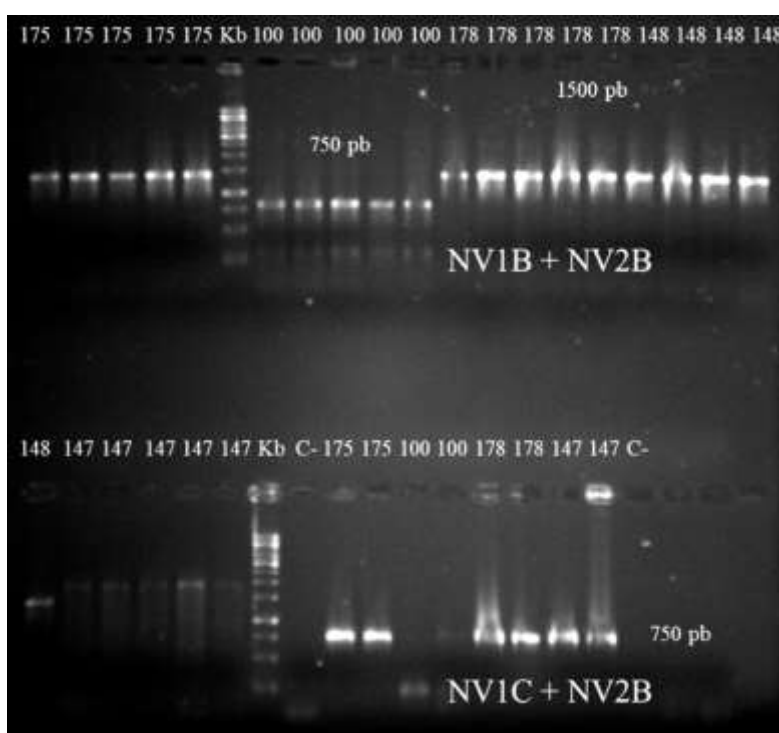


Figura 8: Perfil eletroforético da amplificação do gene Amy (alfa amilase) dos isolados dos ecossistemas aquáticos da Amazônia. Isolados do rio Mamori (147, 178 e 175), isolados do rio Solimões (148) e isolado do rio Negro (100). Marcador molecular de tamanho de 1 Kb (Kb), controle negativo (C-) para a PCR.

Com o auxílio dos iniciadores foi possível sequenciar o gene da alfa amilase (Amy) dos isolados dos rios Mamori, Solimões e Negro. Como resultado, obtivemos 10 seqüências do gene Amy (dados brutos, Apêndice B). Posteriormente, foi utilizado o programa PHRED para analisar as seqüências do gene Amy e o resultado obtido da qualidade das sequencias, foi visualizado pela Quality table (Apêndice K), e com a ferramenta CAP3, foi obtida a seqüência *consenso* de 1318 pb (apêndice F) pelo alinhamento das seqüências do gene Amy do *Bacillus koreensis*.

Posteriormente, a sequência de DNA *consenso* do gene Amy do *Bacillus koreensis* isolado do rio Mamori, foi analisada pela ferramenta de bioinformática BLAST (NCBI), e obtivemos como resultado 95% de identidade com a sequência de DNA do gene Amy do *Cytophaga* sp. Além da, análise da sequência de aminoácido do gene Amy pela ferramenta de bioinformática blastx (NCBI), e foi obtido 99% de identidade com a sequência de aminoácido do gene Amy do *Bacillus koreensis*.

Portanto, o resultado do sequenciamento do gene Amy dos isolados bacterianos do sistema aquático do rio Mamori (Apêndice D), foi fundamental para a análise filogenética, bem como, a confirmação o parentesco das espécies identificadas nos sistemas aquático da Amazônia.

5.6. Estudo filogenético do gene Amy do *Bacillus koreensis* (sequência de DNA)

O parentesco do isolado do rio Mamori, foi analisado, através dos cálculos de distancia genética entre as sequências de DNA do gene Amy e as sequências do gene Amy depositadas no banco de dados (NCBI) de espécies bacterinas.

O resultado obtido na figura 9a, demonstra a formação do nó externo e interno com 100% de proximidade genética entre as sequências de DNA do gene Amy do isolado do rio Mamori Amy_178 e identificado como *Bacillus koreensis* e a sequência de DNA do gene Amy do *Bacillus koreensis* (WP_053403806.1) obtida do banco de dados NCBI.

O resultado obtido pela análise da sequência de aminoácidos do gene Amy do isolado do rio Mamori Amy_178 (RM_seq.aa) e identificado como *Bacillus koreensis*, com as sequências de aminoácidos dos gene Amy das espécies de *Bacillus koreensis* (WP_053402350.1), (K0043440.1) obtida do banco de dados NCBI. Bem como, foi observado a formação do nó interno e externo com 100% de proximidade genética entre os taxons analisado. Além de, se visualizar um nó externo com 100% de proximidade genética com o grupo irmão das espécies de *Bacillus koreensis* (WP_053403806.1) e (K0037366.1) obtidas do banco de dados (NCBI). Ainda mais, se visualiza a proximidade genética das sequências de aminoácidos do gene Amy dos isolados do rio Mamori com as sequências depositadas no banco de dados NCBI analisadas, de tal forma que, divergirom do mesmo ancestral em comum.

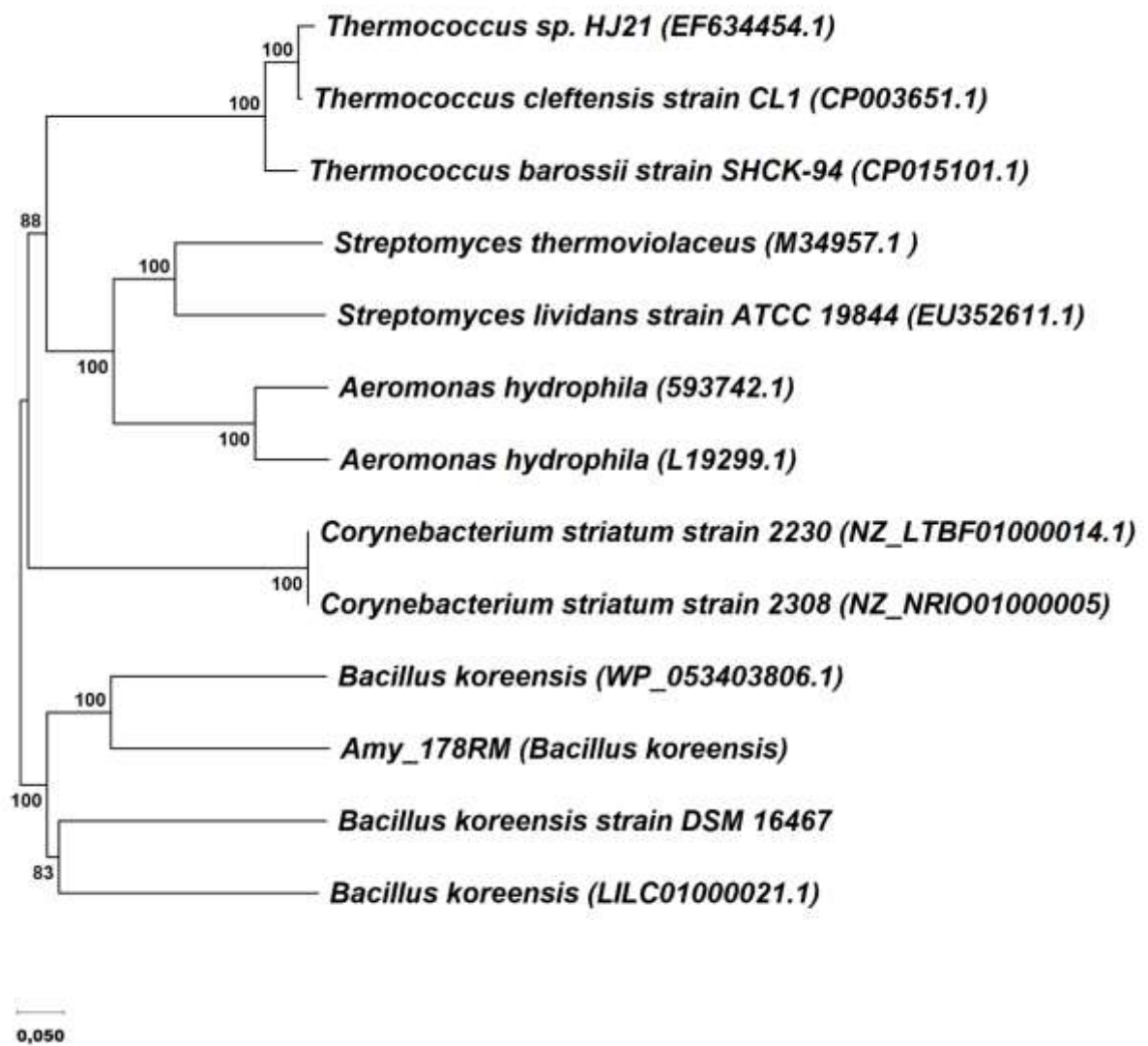


Figura 9a: Dendograma filogenético (Neighbor-Joining) das sequências de DNA do gene *Amy* dos isolados do rio Mamori - *Amy_178* (RM_*Bacillus koreensis*), e com as sequencias de DNA do gene *Amy* das várias espécies encontradas e obtidas do banco de dados NCBI. O alinhamento e a matriz de distância foram calculados com o algoritmo p-distance, com bootstrap teste de 500 repetições.

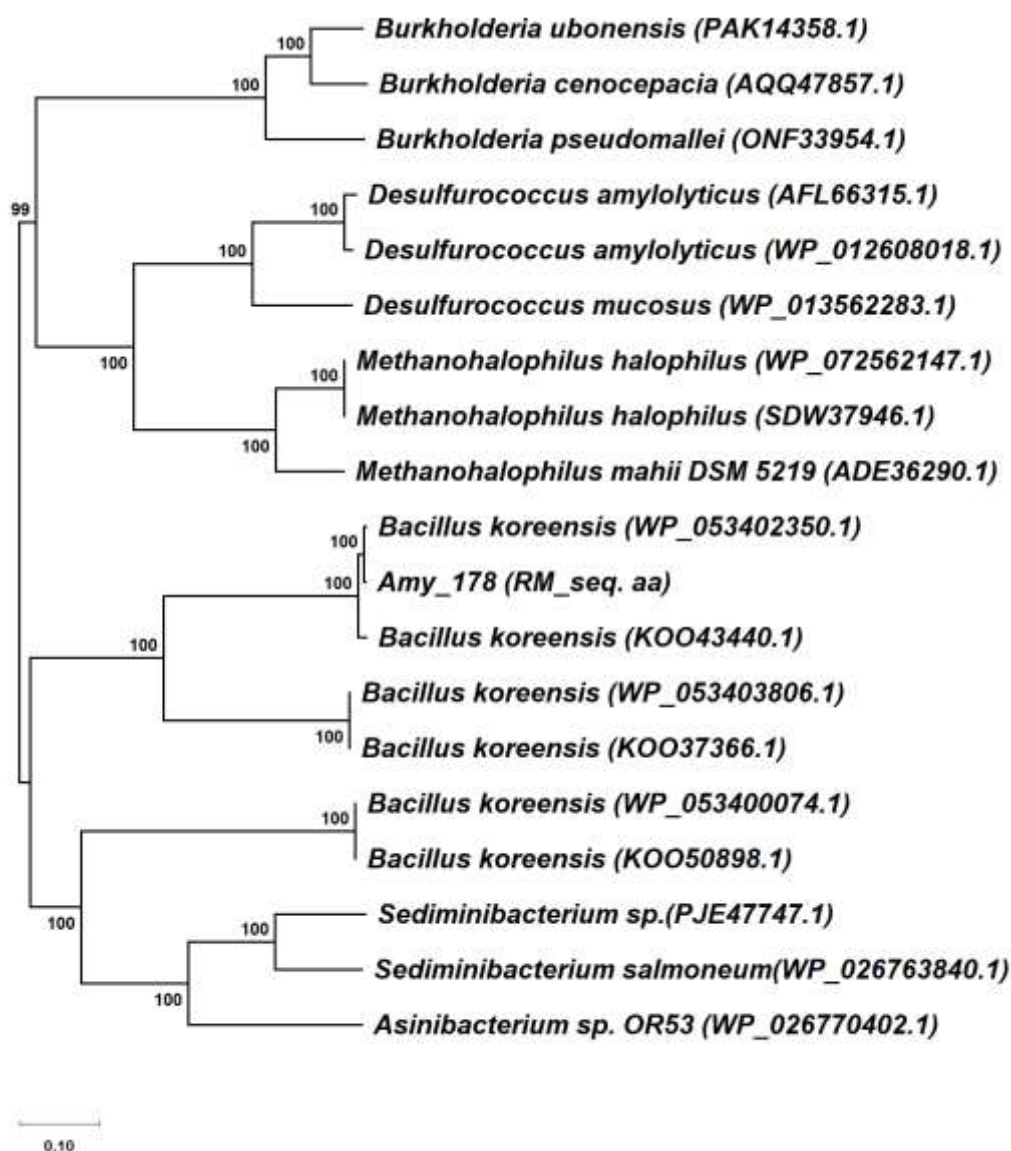


Figura 9b: Dendograma filogenético (Neighbor-Joining) das sequências de aminoácidos do gene *Amy* do isolado do rio Mamori - *Amy_178*(RM_seq. aa), e com as sequencias de DNA do gene *Amy* das várias espécies encontradas e obtidas do banco de dados NCBI. O alinhamento e a matriz de distância foram calculados com o algoritmo p-distance, com bootstrap teste de 500 repetições.

5.7 Otimização da sequência para a síntese química do gene *Amy* do *Bacillus koreensis* isolados no rio Mamori

Após a predição da sequência *consenso* do gene *Amy* e o alinhamento, esta foi traduzida para a sequência de aminoácidos visualizado na tabela 5. A região do peptídeo

sinal na sequência *consenso* de aminoácidos foi determinada e a posição de clivagem do peptídeo sinal foi identificada entre os aminoácidos 34 e 35 (AKA-A). Posteriormente, no desenho da sequência *consenso* de DNA do gene Amy do *Bacillus koreensis* isolado do rio Mamori foram incluídos os sítios de restrição das enzimas *NdeI* e *BamHI* nas extremidades da sequência de DNA. Subsequentemente, foi desenhado o gene da alfa amilase (*Amy*) e desenho do gene (*Amy*) da alfa amilase denominado de AMYKOR foi enviado para síntese química e recebemos o gene AMYKOR ligado ao vetor pBSK (apêndice J).

Tabela 5: Sequência de aminoácido do gene Amy do *Bacillus koreensis* (rio Mamori).

Identificação da sequência	Sequência de aminoácido
Sequência de aminoácidos do gene Amy do <i>Bacillus koreensis</i> isolado do rio Mamori	MKKKWKRSR FAAITMFSTL LLVPSLAQPK EAKAA TTNGT MMQYFEWYVP NDGQQWNRLR TDAPYLSSVG ITAVWTPPAY KGTSQADVGY GPYDLYDLGE FNQKGTVRTK YGTKAELKSA VNTLHSNGIQ VYGDVVMNHK AGADYTENV AVEVNPSNRN QETSGEYNIQ AWTGFNFPGR GTTYSNFKWQ WFHFDGTDWD QSRSLSRIFK FRGTGKAWDW EVSSENGNYD YLMYADIDYD HPDVVNEMKK WGVWYANEVG LDGYRLDAVK HIKFSFLKDW VDNARAATGK EMFTVGEYWQ NDLGALNNYL AKVNYNQSLF DAPLHYNFYA ASTGGGYDM RNILNNTLVA SNPTKAVTLV ENHDTQPGQS LESTVQPWFK PLAYAFILTR SGGYPSVFIG DMYGTKGTTT REIPALKSKI EPLLKARKDY AYGTRDYID NPDVIGWTRE GDSTKAKSGL ATVITDGGG SKRMYVGTSN AGEVWYDLTG NRTDKITIGS DGYATFPVNG GSVSVWVQQ

5.8 Transformação genética da DH5 α para a clonagem dos vetores pBSK-AMYKOR e o vetor pDMU01-EG17, minipreparação de plasmídeos, construção do vetor de clonagem

5.8.1 Transformação genética da DH5 α pelos vetores pBSK-AMYKOR e pDMU01-EG17 e a minipreparação do DNA plasmidial

A DH5 α foi transformada geneticamente com o vetor pBSK-AMYKOR por eletroporação, da mesma forma, o vetor pDMU01-EG17, posteriormente a seleção das células bacterianas transformadas geneticamente e recombinantes em meio de crescimento

LB sólido e seletivo, e logo após, foram semeadas em meio de cultivo LB líquido e subsequente a incubação foi extraído o DNA plasmidial e estimada a massa dos vetores pBSK-AMYKOR de 200 $\eta\text{g}/\mu\text{L}$ e o pMDU01-EG17 de 300 $\eta\text{g}/\mu\text{L}$.

5.8.2 Construção do vetor de expressão genética do gene AMYKOR

A construção do vetor de expressão genética pDMU01-AMYKOR, foi confirmada pela análise de restrição qualitativa, com as enzimas *NdeI* e *BamHI* (figura 10). Como resultado, temos fragmentos de DNA do vetor pDMU01, e do gene AMYKOR, observado no gel de agarose 0,8%.

Por meio da, análise eletroforética em gel de agarose 0,8%, foi possível observar o fragmento linear de DNA de tamanho de 4500 pb (figura 10, canaletas 2 e 4), que corresponde a um único sitio de restrição utilizado pela enzima de restrição. Bem como, se visualiza duas bandas de DNA com tamanho de 3000 pb e a outra com tamanho de 1500 pb (figura 10, canaletas 6 e 8), à medida que, se utiliza duas enzimas de restrição.

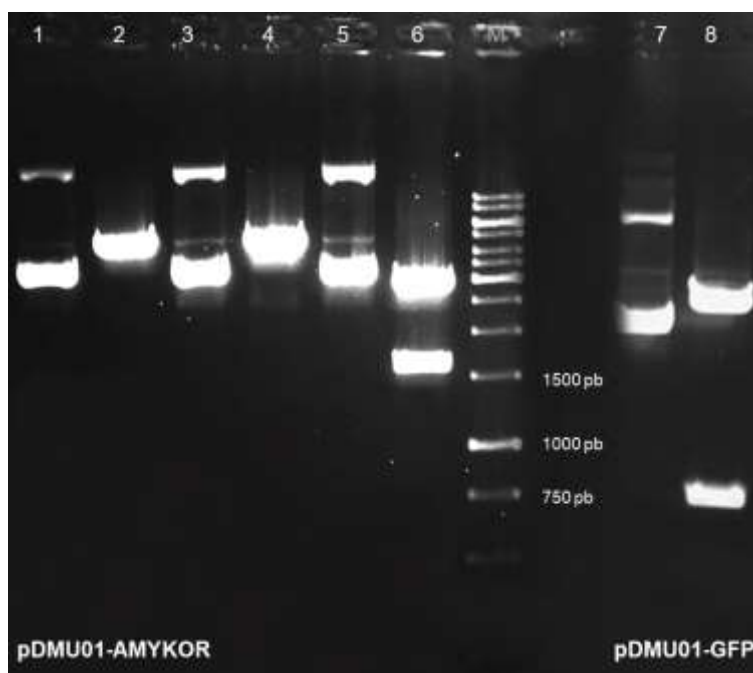


Figura 10: Análise eletroforética da digestão do vetor pDMU01-AMYKOR e o vetor pDMU01-GFP com as enzimas de restrição *NdeI* e *BamHI* em gel de agarose 0,8% corado com Brometo de Etídio. 1, ausência de enzima; 2, presença da enzima *NdeI*; 3, ausência de enzima; 4, presença da enzima *BamHI*; 5, ausência de enzima; 6, presença das enzimas *NdeI* e *BamHI*; M, Ladder de 1kb; 7, ausência de enzima e o 8, presença das enzimas *NdeI* e *BamHI*.

5.9 Estudo da regulação da expressão do gene AMYKOR

O resultado da regulação da expressão genética visualizado na figura 11, demonstra que as colônias recombinantes têm tamanho diferente, além da, confirmação da expressão genética e atividade da alfa amilase pela presença de halos de degradação do amido entorno das colônias, observados após a revelação com vapor de iodo.

Logo, se observou na placa 2 (ausência de glicose 1% e IPTG 1mM), as 20 colônias com presença de halo degradação do amido, entretanto, foi observado na colônia 16 uma diferença de diâmetro de halo de degradação do amido, quando comparada com os demais diâmetros dos halos entorno das colônias analisadas da placa. Subsequentemente, foram visualizados na placa 4, as colônias 4, 8, 10 e 17 (presença de IPTG 1mM e ausência de glicose 0,5%) com o diâmetro do halo de degradação superior as demais colônias da placa analisada. Visto que, a placa 3 (presença de glicose 0,5% e IPTG 1 mM), com as 20 colônias, se verificou halos de degradação do amido ao redor das colônias analisadas. De tal foram que, o melhor resultado da expressão genética da enzima alfa amilase e a secreção ao meio extracelular, foi a condição de ausência de glicose 0,5% e a presença de IPTG 1 mM. Por consequência, da análise dos resultados de expressão e a atividade qualitativa da alfa amilase, foi utilizado a condição de 1mM de IPTG, para prosseguir com o trabalho da Tese.

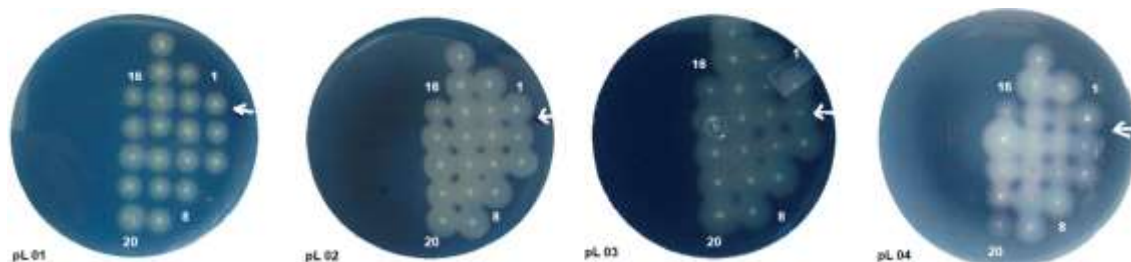


Figura 11: Perfil da atividade enzimática qualitativa da alfa amilase recombinante com a utilização de amido 1% no meio LB, além da presença ou ausência de glicose 0,5%, e IPTG 1 mM no estudo da regulação da expressão genética do gene AMYKOR;

pL 01 - presença de glicose 0,5% e ausência de IPTG 1 mM.

pL 02 - ausência de glicose 0,5% e IPTG 1 mM.

pL 03 - presença de glicose 0,5% e IPTG 1 mM.

pL 04 - ausência de glicose 0,5% e presença de IPTG 1 mM.

5.10 Expressão genéticas quantitativa do gene AMYKOR da enzima alfa amilase

Para determinar a atividade e a unidade de enzima por mililitro, foi utilizado a equação da reata $y = 0,0617x + 0,0268$ (figura 12), para o calculado do amido residual, e

posteriormente, o produto da reação enzimática, por meio da subtração do amido inicial pelo amido residual, determinado com a equação da reta.

Após a transformação da DH5 α F'Iq com o vetor de expressão pMDU01-AMYKOR, e posteriormente, quando atingiu a absorbância de 0.7, foi adicionado 1 mM de IPTG e o resultado é observado na figura 13. Logo, se visualiza o perfil do crescimento celular em função do tempo na fase exponencial, antes da indução da expressão genética, e após a indução com IPTG, se visualiza a primeira e segunda hora no platô. Em seguida, a curva se inclina ao longo do tempo, e posteriormente, se observa o perfil de redução de células bacterianas, em decorrência da inclinação da reta, bem como, a morte celular, após as duas horas de indução.

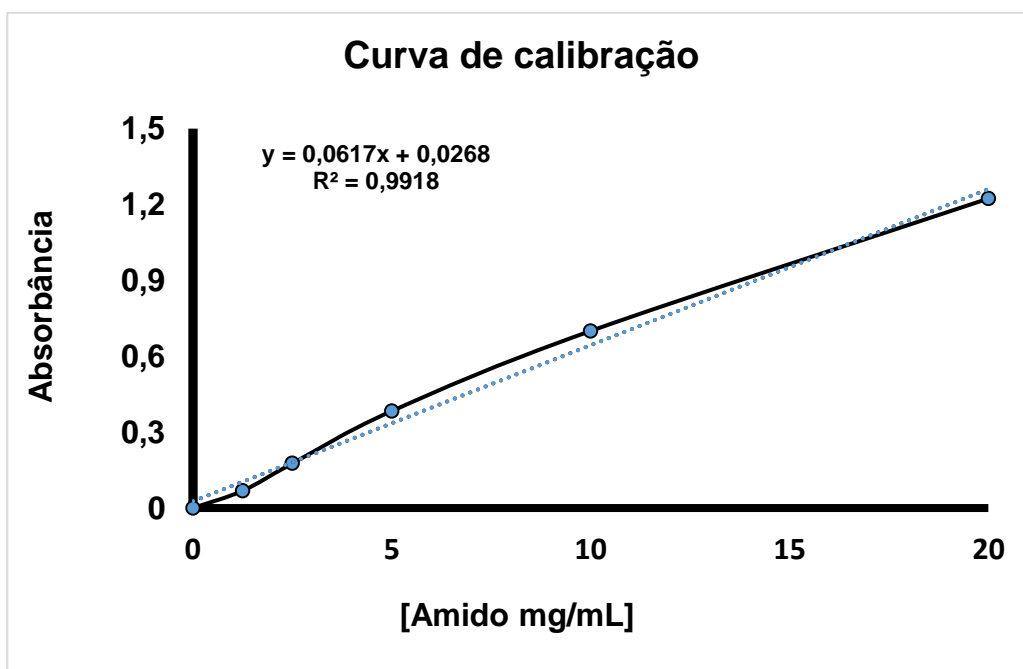


Figura 12: Curva de calibração de amido corado com solução FUWA.

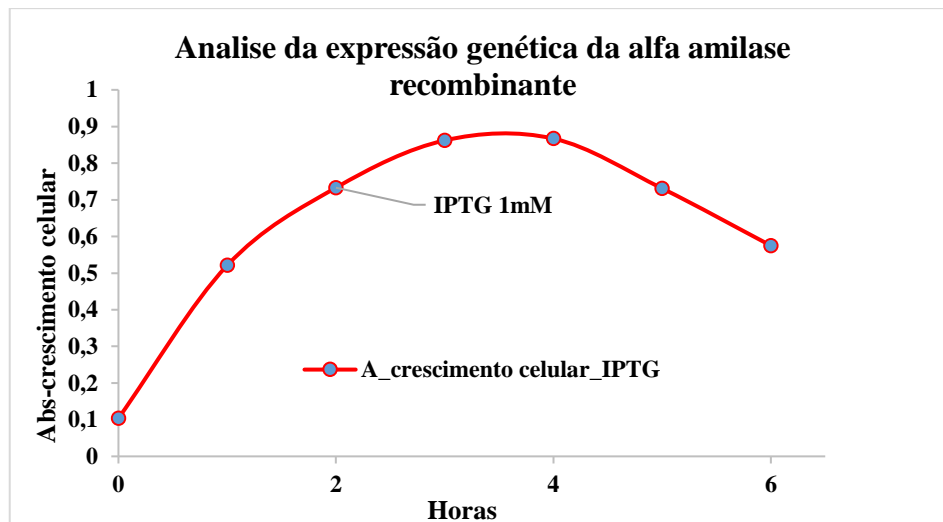


Figura 13: Curva de crescimento da DH5α F'Iq e a expressão da alfa amilase recombinante com indutor da expressão do operon lac 1mM de IPTG e a Glicose 0,5%.

5.11 Estudo comparativo da atividade dextrinizante da alfa amilase do extrato enzimático do *Bacillus koreensis* precipitada (etanol 50%), e a alfa amilase recombinante (AMYKOR) precipitada (etanol 50%). Velocidade inicial das reações enzimáticas da alfa amilase precipitada com etanol 50%. Variação de pH e temperatura nas reações enzimáticas da alfa amilase precipitadas com etanol 50%. Determinação da velocidade máxima e km das reações enzimáticas da alfa amilase precipitadas.

5.11.1 Velocidade da reação enzimática da alfa amilase precipitada do *Bacillus Koreensis*

O estudo da velocidade da reação enzimática de primeira ordem (fase exponencial) da alfa amilase do *Bacillus koreensis* precipitada com etanol 50%, foi fundamental para a determinação da concentração de enzimas pela reação enzimática, de modo que, as concentrações de 20 µL e 30 µL de alfa amilase foram rápidas na conversão do substrato em produto, mas as concentrações de 5 µL e 10 µL da alfa amilase foram reações enzimáticas lentas e a concentração 15 µL de alfa amilase foi ideal para reação enzimática, visto que, a reação enzimática foi intermediária entre as reações enzimáticas rápida e a lenta na hidrólise do amido 1%, nesse sentido, a concentração de 15 µL enzima alfa amilase é necessária para prosseguir com os estudos de caracterização da atividade enzimática da alfa amilase (figura 14), além da determinação do tempo de reação de 3 minutos, portanto, foi mantido a temperatura de 60 °C, tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 6 e 1% de amido.

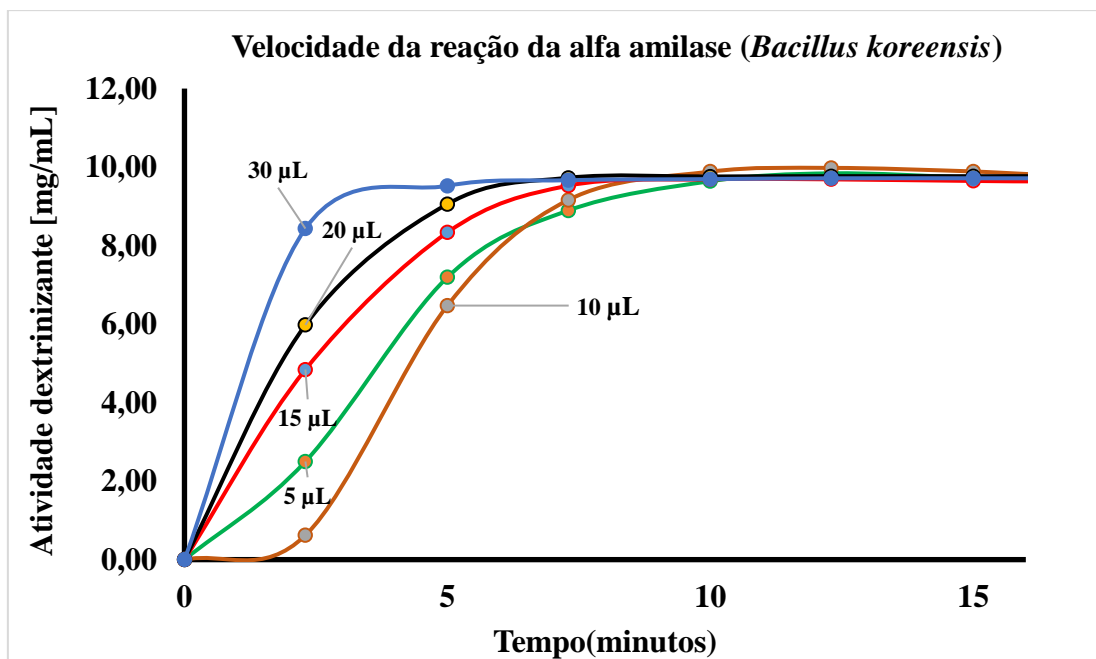


Figura 14: Velocidade inicial da Alfa amilase do *Bacillus koreensis* precipitada com etanol 50% do extrato enzimático.

5.11.2 Variação de pH das reações enzimáticas da alfa amilase do precipitado *Bacillus koreensis*

O estudo da variação de pH da reação enzimática da alfa amilase precipitada com etanol 50% do *Bacillus koreensis*, foram realizadas com as variações entre 2 a 10 unidade de pH em reações enzimáticas dextrinizante da alfa amilase, de tal forma que, o pH 2 e 3 influenciou na redução da atividade enzimática, mas as unidades de 4, 9 e 10 de pH foram indutoras intermearias da reação enzimática, e as unidades 5, 6, 7 e 8 de pH foram indutoras elevadas da reação dextrinizante da alfa amilase, sendo que, o pH 6 foi escolhido por induzir efetivamente a atividade da alfa amilase (figura 15), nesse sentido, as condições reacionais, tais como, a concentração de enzima alfa amilase, substrato, tempo e temperatura não foram modificadas.

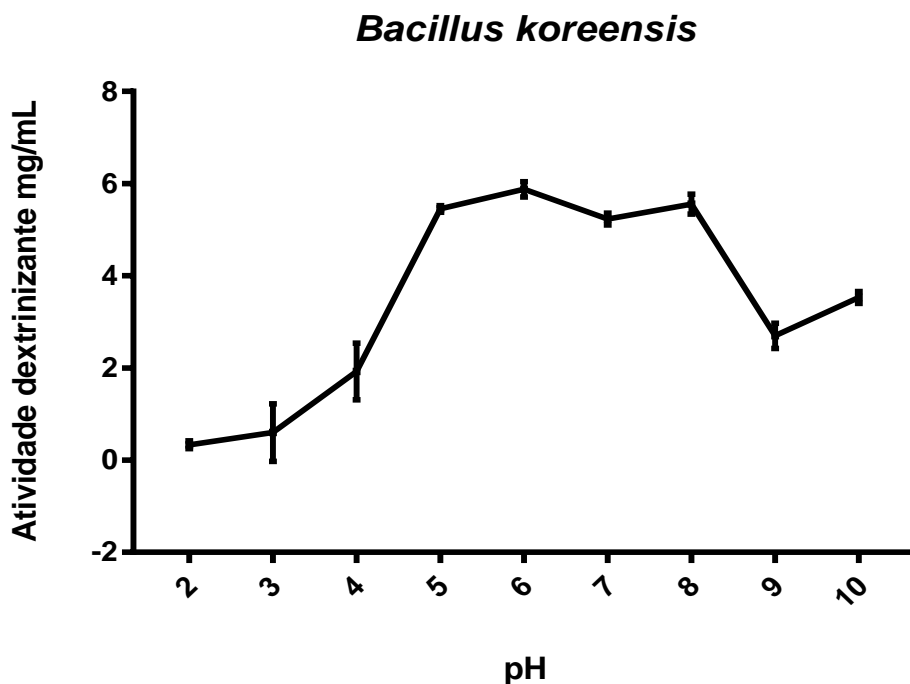


Figura 15: Alfa amilase do *Bacillus koreensis* precipitada com etanol 50% e variação de pH. Foi determinado o desvio padrão médio por reação enzimática.

5.11.3 Variação de Temperatura da reação enzimática da alfa amilase precipitada com etanol 50% do *Bacillus koreensis*

A determinação das condições térmicas ideais para a reação dextrinizante da alfa amilase do *Bacillus koreensis* precipitada com etanol 50 %, foram executadas com a variação térmica entre 0 a 100 °C para a atividade dextrinizante da alfa amilase, bem como, se observou que as condições térmicas de 0, 10 e 20 °C induziram pouco a atividade enzimática, mas se visualizou que as condições térmicas de 40, 50, 90 e 100 °C foram indutoras intermediárias da atividade dextrinizante da alfa amilase, e as condições térmicas de 60, 70 e 80 °C foram indutoras elevadas da atividade enzimática da alfa amilase, nesse sentido, se considerou que a condição térmica de 60 °C, foi satisfatória para prosseguir com o trabalho de Tese (figura 16). Portanto, não se alterou as condições de: concentração da alfa amilase, pH, substrato e tempo de reação.

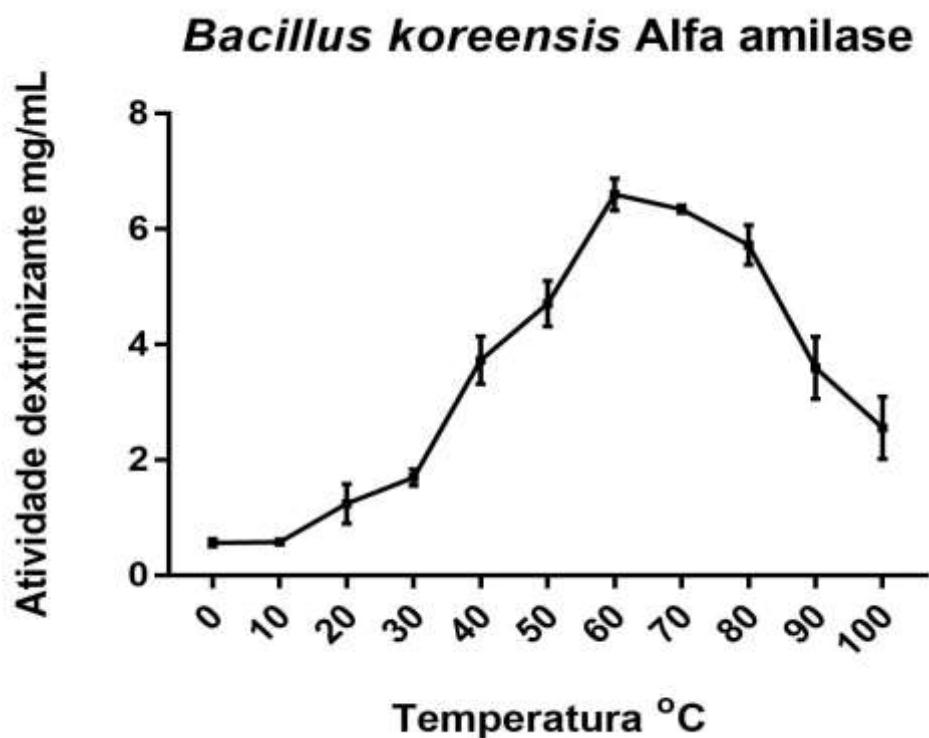


Figura 16: Alfa amilase do *Bacillus koreensis* precipitada com etanol 50% e variação de temperatura. Foi determinado o desvio padrão médio por reação enzimática.

5.11.4 Cinética enzimática Michaelis-Menten da alfa amilase do *Bacillus koreensis* precipitada com etanol 50% (K_m e velocidade máxima)

O estudo da cinética da velocidade inicial aparente da reação enzimática da alfa amilase do *Bacillus koreensis* precipitada com etanol 50%, foi executada com a variação da concentração de substrato entre 0 a 20 mg/mL (amido – fécula de mandioca) (figura 17), e a velocidade da reação diminui, à medida que, aumenta a concentração de substrato, subsequentemente é formando o complexo [ES] até atingir o platô (reação enzimática de segunda ordem) e o grau máximo de saturação do sitio catalítico da enzima alfa amilase. Nesse sentido, o complexo [ES] passa pelo estágio de baixa energia livre de ativação, e a enzima convertendo o substrato do complexo [ES] em enzima livre e produto [E+P]. Portanto, não foi alterado as condições pré-determinadas de pH, temperatura, tempo e a concentração da alfa amilase.

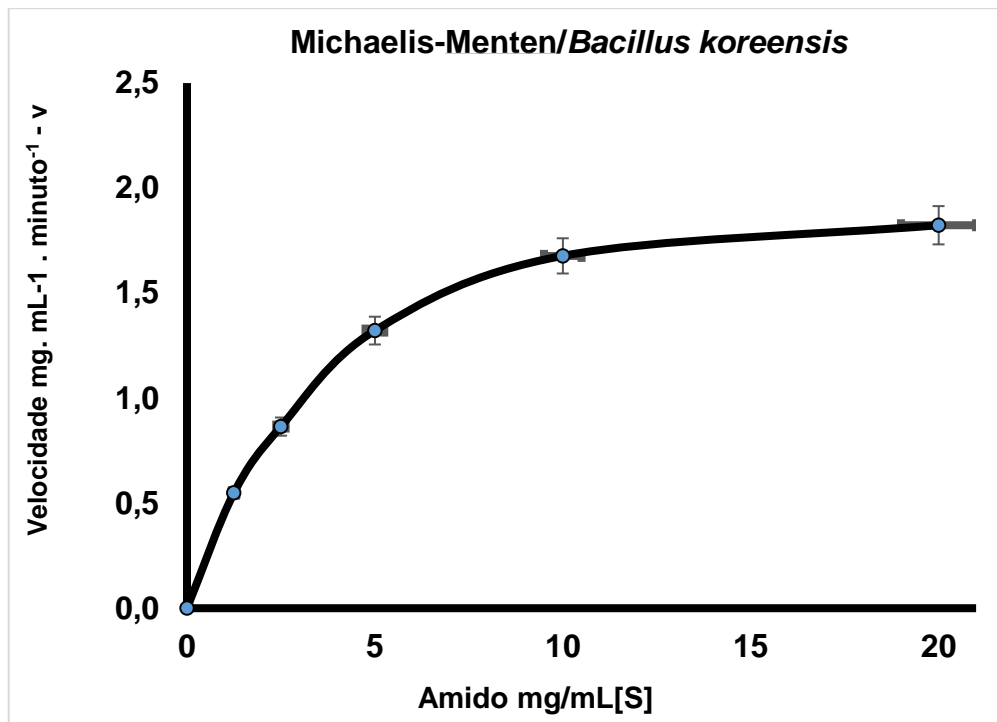


Figura 17: Michaelis-Menten da reação enzimática da alfa amilase precipitada com etanol 50% do *Bacillus koreensis*. Foi determinado o desvio padrão médio por reação enzimática.

O duplo recíproco da atividade dextrinizante da alfa amilase precipitada com etanol 50% do *Bacillus koreensis*, foi determinado com a transformação matemática da equação de Michaelis-Menten de ambos os lados (X e Y), obtendo como resultado, o diagrama do duplo recíproco ($1/v$ e $1/[S]$) (figura 18), e a afinidade da enzima alfa amilase aparente com o substrato se determinou pelo resultado de K_m de 4,0 mg/mL, além da, velocidade máxima aparente de 2,3 mg . mL⁻¹ . minuto⁻¹, com o uso da equação da reta de $Y = 1,778 \cdot X + 0,4415$ do duplo recíproco.

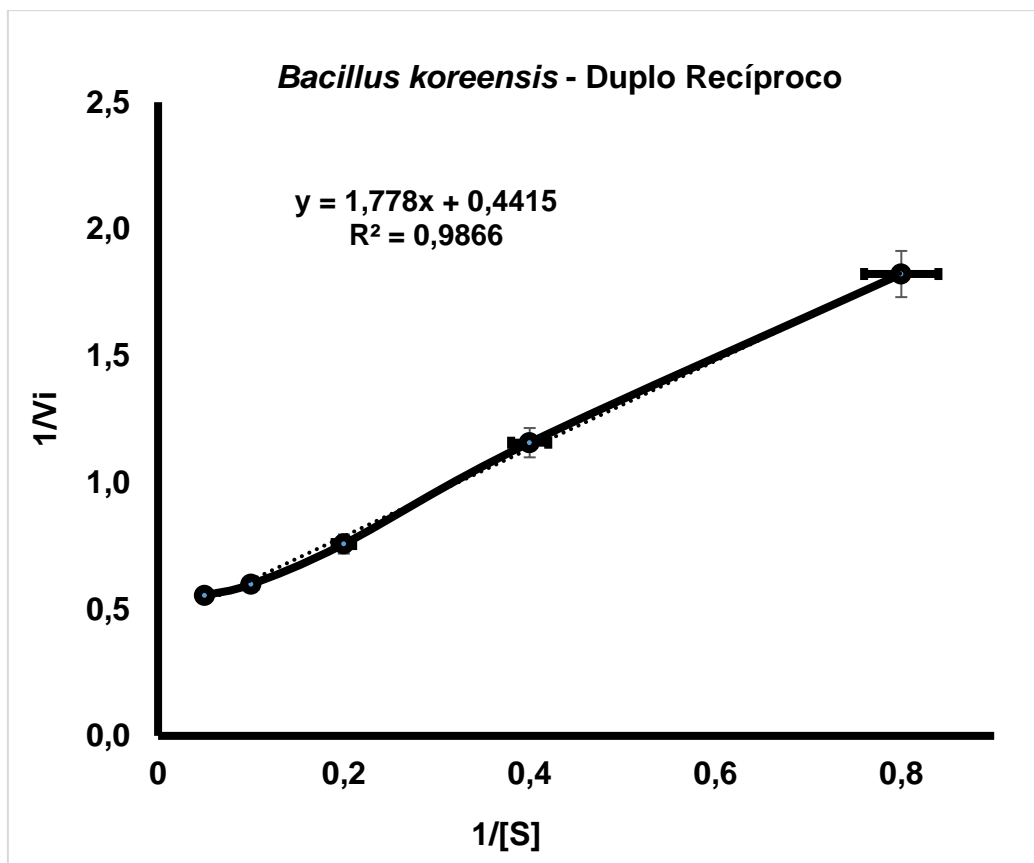


Figura 18: Duplo Recíproco da atividade enzimática da alfa amilase precipitada com etanol 50% do *Bacillus koreensis*. A cada reação enzimática foi determinado o desvio padrão médio.

5.12 Velocidade da reação enzimática da alfa amilase precipitada com etanol 50% do sistema de expressão genética pDMU01-AMYKOR

A velocidade da reação enzimática de primeira ordem (fase exponencial da reação) da alfa amilase recombinante precipitada com etanol 50%, foi estudada com o propósito de determinar a concentração da alfa amilase necessária para a hidrólise do amido e prosseguir com a análise dos parâmetros físico-químico ideais da enzima. O resultado observado na figura 18, demonstra que as concentrações utilizadas de 20 μL e 30 μL de alfa amilase por reações enzimática, elevaram a velocidade da reação, com efeito de rápida conversão do substrato em produto. As concentrações utilizadas de 5 μL e 10 μL de alfa amilase por reação enzimática, de fato, alterou a velocidade das reações enzimáticas e diminuição a hidrólise do amido, além da, concentração do produto obtido pela atividade enzimática. O resultado obtido da concentração 15 μL de alfa amilase utilizada para a reação enzimática, demonstrou que a velocidade inicial da reação enzimática da alfa amilase a 3 minutos produziu 4 mg/mL de dextrinas, bem como, o perfil da reação da alfa amilase a 5 minutos, se verifica na fase

exponencial da reta, visualizado no gráfico (figura 19), com o ângulo de inclinação da reta satisfatório e distante dos eixos Y e X do gráfico.

Nesse sentido, a concentração de 15 μL enzima alfa amilase são necessários para prosseguir com os estudos de caracterização da atividade enzimática da alfa amilase (figura 19), além da, determinação do tempo de reação de 3 minutos, portanto, foi mantido a temperatura de 60 °C, tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 6 e 1% de amido.

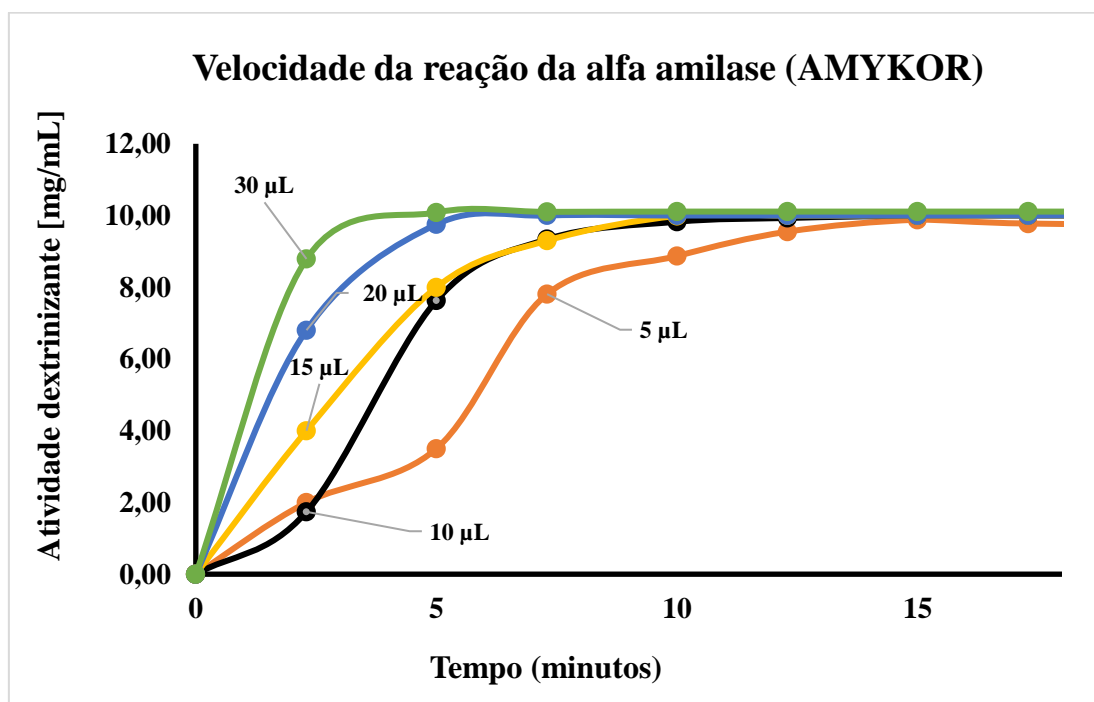


Figura 19: Perfil da velocidade inicial da atividade enzimática da alfa amilase recombinante (AMYKOR) precipitada com etanol 50%.

5.12.1 Variação do pH da reação enzimáticas da alfa amilase (AMYKOR) recombinante e precipitada com etanol 50%

A variação de pH para o estudo das condições reacionais da alfa amilase recombinante precipitada com etanol 50%, foram conduzidas com as variações entre 2 a 10 unidade de pH em reações enzimáticas dextrinizante da alfa amilase, de modo que, o pH 2 e 3 influenciou na redução da atividade enzimática, mas as unidades de 4, 9 e 10 de pH foram indutoras intermearias da reação enzimática, e as unidades 5, 6, 7 e 8 de pH foram indutoras elevadas da reação dextrinizante da alfa amilase, sendo que, a unidade 6 de pH foi determinado para prosseguir com o trabalho da Tese (figura 20), portanto, as condições reacionais da concentração de enzima alfa amilase, substrato (amido – fécula de mandioca 1%), tempo (3 minutos) e temperatura (60 °C) não foram alteradas.

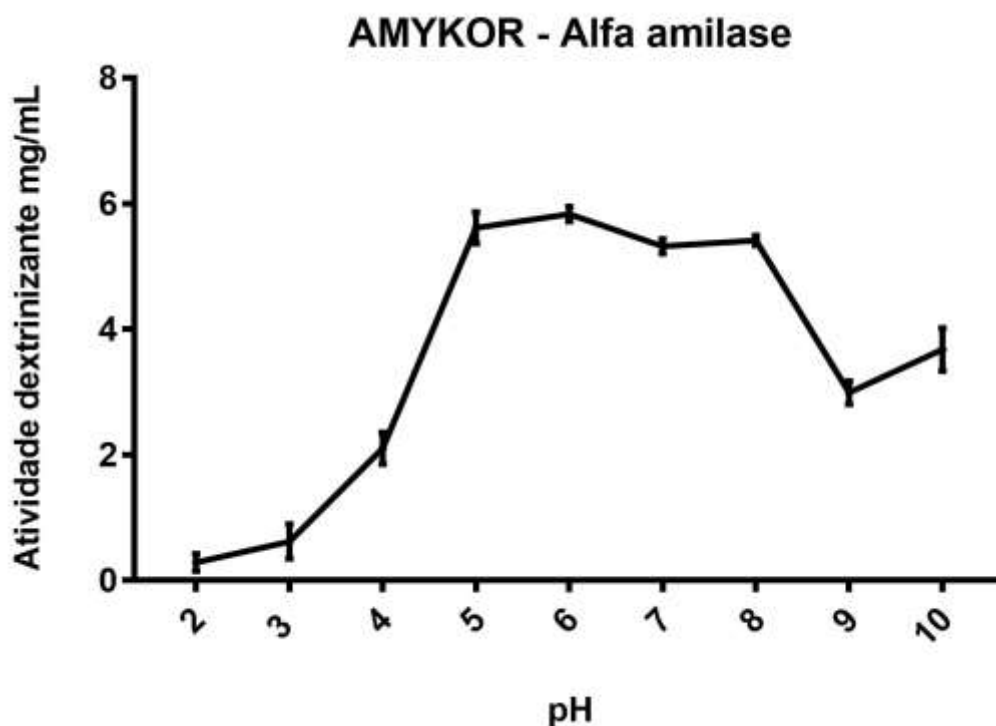


Figura 20: Alfa amilase recombinante (AMYKOR) precipitada com etanol 50% e variação de pH. Foi determinado o desvio padrão médio por reação enzimática

5.12.2 Variação da temperatura da reação enzimática da alfa amilase recombinante precipitada com etanol 50%

A determinação das condições térmicas ideais para a reação dextrinizante da alfa amilase recombinante precipitada com etanol 50%, foram executadas com a variação térmica entre 0 a 100 °C para a atividade dextrinizante da alfa amilase, visto que, as condições térmicas de 0, 10, 20 e 100 °C foram de baixa indução da atividade enzimática, mas as condições térmicas de 30, 40, 50, 80 e 90 °C foram indutoras intermediárias da atividade dextrinizante da alfa amilase, e as condições térmicas de 60 e 70 °C foram indutoras elevadas da atividade enzimática da alfa amilase, nesse sentido, foi considerado a condição térmica de 60 °C para prosseguir com o trabalho de Tese (figura 21). Assim sendo, não foi alterado as condições de concentração da alfa amilase (15 µL), pH 6, substrato (amido 1%) e tempo 3 minutos de reação.

AMYKOR - Alfa amilase

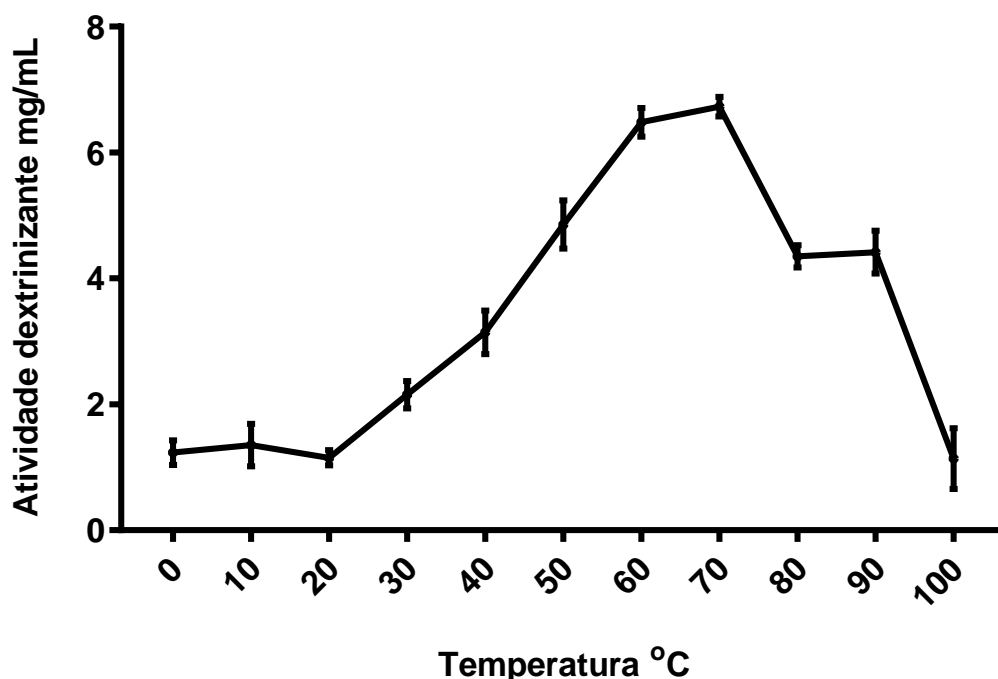


Figura 21: Alfa amilase recombinante (AMYKOR) precipitada com etanol 50% e variação de temperatura. Foi determinado o desvio padrão médio por reação enzimática.

5.12.3 Michaelis-Mentem da reação enzimática da alfa amilase precipitado AMYKOR

O estudo da cinética da velocidade inicial da reação enzimática da alfa amilase recombinante precipitada com etanol 50%, foi executada com a variação da concentração de substrato entre 0 a 20 mg (amido – fécula de mandioca) (figura 22), e inalterado as condições de pH, temperatura, tempo da reação enzimática pré-determinados. Dentro do contexto foi determinado a velocidade aparente da reação enzimática e se verificou a diminuição da velocidade da reação enzimática, a medida que, aumenta a concentração do substrato, conseqüentemente, é formando o complexo [ES] até atingir o platô (reação enzimática de segunda ordem) e o grau máximo de saturação do sitio catalítico da enzima alfa amilase, de modo que, o complexo formado [ES] passa pelo estagio de baixa energia livre de ativação, e a enzima convertendo o substrato do complexo [ES] em enzima livre e produto[E+P].

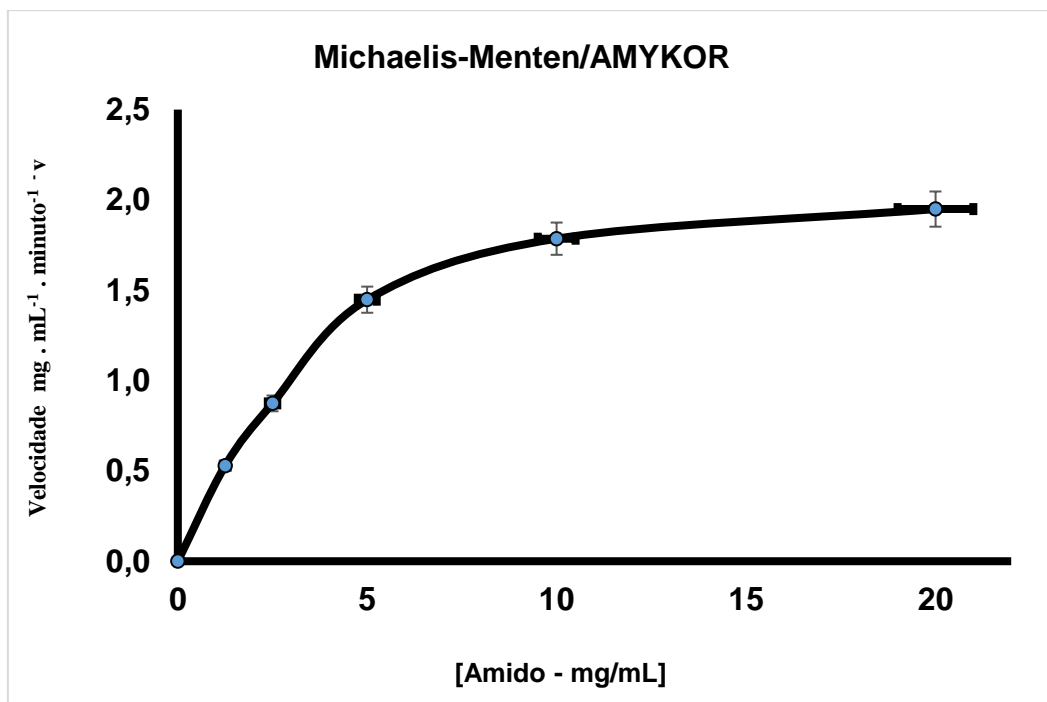


Figura 22: Michaelis-Menten da reação enzimática da alfa amilase recombinante (AMYKOR) precipitada com etanol 50% do *Bacillus koreensis*. Foi determinado o desvio padrão médio por reação enzimática.

O duplo recíproco da atividade dextrinizante da alfa amilase recombinante precipitada com etanol 50%, foi definido com a transformação matemática da equação de Michaelis-Menten de ambas os lados, e obtido como resultado, o diagrama do duplo recíproco ($1/v$ e $1/[S]$) (figura 23), e a afinidade da enzima alfa amilase aparente com o substrato foi calculado com o K_m de 4,8 mg/mL, além da velocidade máxima de 2,6 mg · mL⁻¹ · minuto⁻¹, com o uso da equação da reta do duplo recíproco de $Y = 1,8806 \cdot X + 0,3901$.

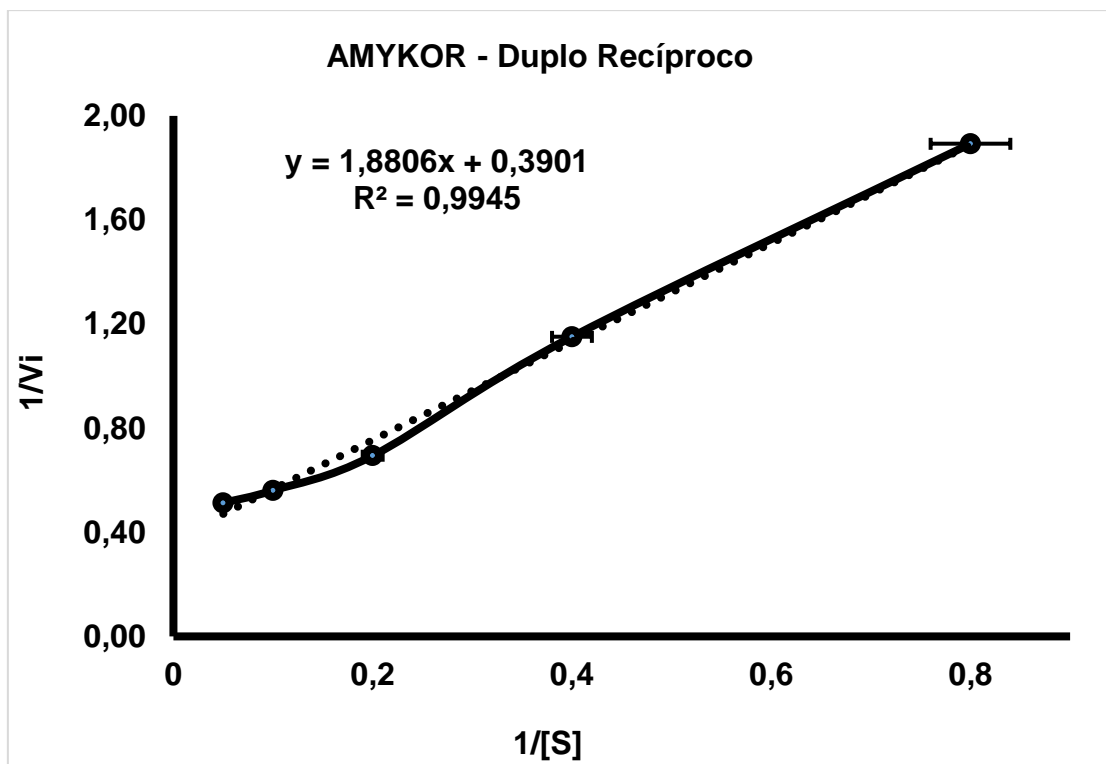


Figura 23: Duplo Recíproco da atividade enzimática da alfa amilase recombinante (AMYKOR) precipitada com etanol 50%. Foi determinado o desvio padrão médio por reação enzimática.

5.13 Comparação da quantidade de enzima por mL, após a precipitação com etanol 50% da alfa amilase recombinante e a alfa amilase do *Bacillus koreensis* selvagem e os parâmetros cinéticos da reação enzimática

O resultado da comparação da unidade de enzima por mililitros após a precipitação com etanol 50% da alfa amilase recombinante e a alfa amilase do *Bacillus koreensis* selvagem (tabela 6). Nesse sentido, obtivemos a concentração de 10 vezes da alfa amilase recombinante, após a precipitação com etanol 50% e a concentração de 10 vezes da alfa amilase do *Bacillus koreensis*, logo após a precipitação com etanol 50%. Portanto, foi observado nos resultados a mínima diferença entre as enzimas alfa amilase estudadas, em relação a pH, temperatura, a cinética enzimática (K_m aparente e Velocidade máxima aparente) das condições reacionais das enzimas (tabela 6).

Tabela 6: Parâmetros da atividade enzimática da alfa amilase recombinante e a alfa amilase do *Bacillus koreensis* selvagem, precipitadas com etanol 50.

	Alfa amilase recombinante	Alfa amilase do <i>B. Koreensis</i> selvagem
Parâmetros	Precipita 50% (etanol)	Precipitada 50% (etanol)
Unidade de enzima	106 Unidades de enzima/50mL	120 Unidades de enzima/50 mL
pH	5, 6, 7 e 8	5, 6, 7 e 8
Temperatura (°C)	60 °C e 70 °C	60 °C, 70 °C e 80 °C
Km	4,8 mg/mL	4,0 mg/mL
Velocidade máxima	2,6 mg⁻¹ . mL⁻¹ . minuto⁻¹	2,3 mg⁻¹ . mL⁻¹ . minuto⁻¹

6. DISCUSSÃO

6.1 Prospecção de bactérias com potencial dextrinizante (alfa amilase) dos ecossistemas aquáticos dos rios Negro, Solimões e Mamori

Os ecossistemas aquáticos que compõem a bacia hidrológica amazônica possuem características físico químicas distintas, tais como as massas de águas clara, branca e preta, as variações das concentrações de oxigênio, temperaturas, composição e concentração de matérias orgânicas e inorgânicas encontrados em suspensão e/ou dissolvidas nos corpos de água (Maslin *et al.*, 2000). Além disso, esses ecossistemas aquáticos abrigam populações de procaríotos pertencente ao domínio Bacteria e Archea, que compõem a comunidade de bacterioplâncton desempenhando uma série de importantes funções ecológicas relacionadas com a reciclagem e mineralização de nutrientes como o carbono, o nitrogênio e o fósforo, bem como integram em níveis tróficos, sendo litotrófico (molécula inorgânica) e as organotróficos (molécula orgânica) (Vermelho *et al.*, 2008). Ainda, várias enzimas que atuam em diversas vias bioquímicas e amplamente distribuídas na natureza, são responsáveis pela reciclagem do carbono encontrados nos ecossistemas aquáticos (Esteves, 2011). Dentre essas enzimas, as enzimas amilolíticas são capazes de hidrólise das ligações α -1,4-O-glicosídicas e ligações α -1,6-O-glicosídicas presente na composição estrutural do amido (Fukusumi *et al.*, 1988). A prospecção de bactérias com a potencialidade amilolítica no presente estudo, após o acesso a comunidade microbiana de ecossistema aquático do rio Mamori/AM, por meio de coleta, isolamentos de UFC's em meio seletivo e os ensaios enzimáticos qualitativo, foi verificado uma bioestimulação da comunidade bacteriana especializada na reciclagem do carbono orgânicos pelo isolamento de 763 UFC's obtidas do ecossistema aquático do rio Mamori. Essa bioestimulação da comunidade bacteriana encontrados no rio Mamori está relacionado com o descarte de resíduo amiláceo provenientes da produção de farinha. Assim, os dados do presente trabalho sugerem que existe uma viabilidade de produção de alfa amilase de isolados bacterianos dos ecossistemas aquáticos da Amazônia.

Oliveira *et al.* (2006) estudaram a atividade enzimática amilolítica dos Rizóbios isolados do solo Terra Preta de Índio em meio de cultivo YMA obtido a partir do cálculo do índice enzimático, onde demonstraram uma atividade positiva com a presença de halos incolores ao redor da colônia, indicando a hidrólise de amido. Já Nadim *et al.* (2015) relatam que a atividade da alfa amilase secretada em meio de cultivo sólido pelos fungos *Tuber maculatum* e *Tuber aestivum*, foi positivo para a formação de halos incolores ao redor das colônias, após a coloração dos meios de cultivo com vapor de iodo sublimado.

O fator limitante do screening da atividade amilolítica qualitativa e quantitativa dos isolados bacterianos dos ecossistemas aquáticos dos rios Negro, Solimões e Mamori, foi observado uma redução da expressão genética da alfa amilase ao longo do tempo que a bactéria permaneceu armazenada a – 80 °C. Entretanto, esse fator limitante não interferiu nos resultados do presente trabalho, uma vez que foi possível obter a alfa amilase do *Bacillus koreensis* selvagem em quantidade suficiente para as análises enzimáticas.

6.2 Identificação molecular dos isolados bacterianos dos ecossistemas aquáticos da Amazônia e a expressão genética da alfa amilase do *Bacillus koreensis* selvagem

O acesso à composição da comunidade bacteriana tem sido bastante estudado em diversos tipos de ecossistemas, utilizando a abordagem molecular com o uso do marcador DNA ribossomal 16S em análises filogenéticas e taxonomia bacteriana. O gene ribossomal 16S consiste em sequências codificantes de 1500 pb e são encontradas em quase todas as bactérias, muitas vezes, como uma família multigênica ou operons (Janda & Abbott 2007).

Neves et al., 2018 (processo de publicação) estudaram a comunidade de microorganismos do rio Negro por abordagem molecular (rRNA 16S) e registraram a predominância dos filos de Protobacterias, Actinobacteria, Bacterioidetes e Acidobacterias, bem como outros filos de baixa ocorrência no rio Negro. Peixoto et al. (2011) analisando os rios Negro e Solimões observaram uma maior diversidade e riqueza de espécies bacterianas, principalmente no rio Solimões.

Os isolados bacterianos com o potencial amilolítico representantes dos ecossistemas aquáticos dos rios Negro, Solimões e o Mamori no presente estudo, foram identificados molecularmente com o uso do marcador rRNA 16S, corroborando a presença das espécies *Bacillus koreensis* (rio Mamori), *Bacillus nealsonii* (rio Solimões) e o *Paenibacillus barcinonensis* (rio Negro). Ainda, análises de caracterização morfológica com auxílio de corantes e microscopia de luz, confirmou a identificação molecular dos isolados dos ecossistemas aquáticos da Amazônia.

No que diz respeito a expressão e caracterização enzimática, vários autores relatam a presença de enzimas amilolíticas em diversos microrganismos isolados de diferentes ambientes (Polizeli & Silva, 2016). Porém, ainda são incipientes estudos da expressão genética da alfa amilase da espécie *Bacillus koreensis* selvagem isolados de ambientes aquáticos da Amazônia, sendo fundamentais para o entendimento da atividade enzimática. No presente trabalho, foi realizada a expressão genética da alfa amilase da espécie *Bacillus koreensis* selvagem em meio líquido, sendo fundamental para o estudo da caracterização dos

parâmetros de hidrólise do amido (fécula de mandioca). Um fator limitante da caracterização da atividade enzimática foi a presença de um inibidor que interferiu parcialmente na atividade enzimática da alfa amilase de *Bacillus koreensis*, impossibilitando a análise da cinética da reação enzimática da alfa amilase, dos parâmetros de Km e da velocidade máxima. Visto que, o uso da precipitação com etanol 50 %, foi relevante nas análises dos parâmetros bioquímicos da atividade enzimática.

Sexana, *et al.*, (2006), isolaram 300 bactérias do solo com a finalidade de estudar a expressão genética da alfa amilase, variando a fonte de nitrogênio e encontrou 57 unidades de alfa amilase por mililitros utilizando a extrato de carne e peptona.

Rothstein *et al.* (1986) analisaram a expressão da alfa amilase termoestável em meio de cultivo líquido de *Bacillus licheniformis* isolados do ambiente, sendo caracterizada a atividade enzimática nas condições de 60 °C, tampão fosfato de sódio 50mM e pH 7. Bukhari & Rehman (2015) caracterizaram e purificaram da alfa amilase de *Bacillus subtilis* isolados de solo, demonstrando que o pH da atividade enzimática foi igual a 7.0 e a temperatura ideal para a atividade da enzima foi 37 °C. No presente estudo, observamos que a enzima alfa amilase selvagem de *Bacillus koreensis*, atua moderadamente em temperatura que varia entre 30 a 90 °C na hidrólise do amido.

Portanto, os microrganismos encontrados nos ecossistemas aquáticos da Amazônia, foram descritos por Lim *et al.* (2006) como uma nova espécie de *Bacillus koreensis*, isolaram do solo rizosférico da Coreia e classificado como nova espécie. Venkateswaran, *et al.*, (2003), isolaram da fábrica de equipamentos espaciais o *Paenibacillus barcinonensis*, classificado como nova espécie. Sánchez *et al.*, (2005) isolaram do rio Ebro o *Bacillus nealsonii*, classificado como nova espécie.

6.3 Construção do sistema de expressão genética (pDMU01-AMYKOR) e a expressão do gene da alfa amilase recombinante

A construção de sistema de expressão genética em organismos procariotos tem sido objeto de estudo importante na busca da otimização dos problemas relacionados aos processos de obtenção de proteínas (referencia). Entre os diversos sistemas de expressão heteróloga disponíveis, a bactéria *Escherichia coli* continua sendo um dos mais atraentes devido ao seu rápido crescimento em meio de cultura, sua genética já bem descrita e a disponibilidade de inúmeros vetores bacterianos e cepas mutantes (Baneyx, 1999).

O sistema de expressão pDMU01-AMYKOR foi construído no presente trabalho, utilizando um vetor de expressão geneticamente do gene Amy (alfa amilase). A modificação

genética foi realizada na região operadora que constitui o operon lac, gerando uma resposta de transcrição do gene Amy não regulada, conseqüentemente, a ocorrência de uma super expressão genética do gene Amy com a presença ou ausência de glicose e IPTG. Essa super expressão genética do gene Amy está relacionado ao código genético de muticópias, potencializando a super expressão do gene Amy, causando a obstrução dos canais periplasmático das células bacterianas transformadas geneticamente pela pDMU01-AMYKOR, em decorrência da alta concentração da alfa amilase recombinante. Por outro lado, quanto a quantidade de enzimas obtidas pela expressão heteróloga do gene Amy da alfa amilase recombinante foi relativamente baixa a concentração da enzima, levando em consideração a estimativa da concentração da enzima pela sua atividade, tornando-se necessário a precipitação da enzima com etanol 50%, bem como a remoção do inibidor da atividade enzimática. Assim, os dados obtidos no presente trabalho viabilizaram a expressão e caracterização da alfa amilase recombinante com a indução de IPTG 1mM.

Jube *et al.*, (1998) construíram um sistema de expressão genética utilizando o vetor de expressão pAN52 α 1B e por PCR amplificaram o gene Amy da alfa amilase, e após a expressão genéticas em *Aspergillus niger* e purificação por cromatografia de afinidade caracterizaram bioquimicamente a alfa amilase. Já Liu *et al.*, (2012), construíram um sistema de expressão genética pGAP9K- α -Amy, expressaram a alfa amilase em *P. pastoris* e caracterizaram bioquimicamente a alfa amilase.

Southgate *et al.*, (1993), construíram três sistemas de expressão genéticas tais como vetores pVS3, pVS6 e pSP2 com o gene Amy (alfa amilase), transformando em *Bacillus amyloliquefacies* e determinaram a unidade de enzimas pela atividade enzimática da alfa amilase intracelular e extracelular.

Lin *et al.*, (1997), analisaram e digeriram o DNA total da *Bacillus* sp. com a enzima de restrição construindo uma biblioteca. Esses autores obtiveram fragmentos de DNA que foram ligados nos vetores pPUC118, pTS917 e pTS404, selecionaram as colônias através da presença de halos claros ao redor da colônia, testaram as frações do sobrenadante, frações do periplasma, e frações do citoplasma celular, obtiveram a melhor condição na fração do periplasma com variação de 46 a 62% de atividade enzimática.

Puspasari *et al.*, (2012), amplificaram o gene *baqA* da alfa amilase e caracterizaram a enzima degradadora de amido do *Bacillus aquimaris* MKSC 6.2 através de estudo in silico e sua expressão em *Escherichia coli*, sugerindo a presença de uma nova α -amilase *baqA* degradante de amido, pertencente da nova subfamília GH13, uma vez que as enzimas amilolítica são capazes de digerir o amido cru diretamente.

Russell *et al.*, (1993), construíram vetor de clonagem pCR1e vetor de expressão pCXJ-PGK para a transformação de *Kluyveromyces lactis*. Emori *et al.*, (1990), construíram 4 genes da alfa amilase, modificando os aminoácidos em locais específicos do gene Amy, e obtiveram do vetor pNAT-PLK e pAM26 aproximadamente 299 unidades de alfa amilase por mililitros, sendo que o vetor pHY300PLK de baixo número de cópias (50 cópias de plasmídeos), expressou aproximadamente 10 Unidade de enzima por mililitros e porta a modificação quimera 3 do gene Amy.

Prasad *et al.*, (2014), amplificou o gene Amy, caracterizou a alfa amilase do isolado de *Bacillus* sp. Jorgensen *et al.*, (1997), amplificaram o gene da alfa amilase e cloraram no vetor pSJ1678 e caracterizaram bioquimicamente a alfa amilase recombinante.

6.4 Estudo comparativo da atividade da alfa amilase recombinante com a alfa amilase do *Bacillus koreensis* selvagem

No presente estudo, a caracterização bioquímica da alfa amilase recombinante e do *Bacillus koreensis* selvagem isolado do rio Mamori/AM com a indução da expressão genética do *B. koreensis* selvagem e a expressão genética pDMU01-AMYKOR, por meio do uso do indutor IPTG, revelaram que as condições utilizadas foram concordantes com as análises das atividades enzimáticas. A caracterização da alfa amilase de outros microrganismos obtidos por expressão heteróloga e análises enzimáticas do extrato bruto, demonstraram que a enzima obtida é a alfa amilase com as mesmas características bioquímicas apresentadas no presente estudo.

Biazus *et al.*, (2010) estudaram a purificação da alfa amilase de malte de milho pelo processo cromatográfico de absorção em leito expandido e fracionamento por etanol em diferentes concentrações, observando que o fator de purificação foi acima de 100 vezes a concentração da enzima. Lacks & Springhrom (1980), analisaram várias enzimas incluindo amilases, desidrogenases e proteases, revelando serem renaturáveis após eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS). Esses autores observaram que algumas enzimas pareciam recuperar a atividade enzimática mesmo após a ruptura de suas pontes dissulfeto, mas outras como proteases não poderiam devido serem compostas de subunidades idênticas que eram pouco renaturáveis.

Os valores encontrados na caracterização bioquímica da alfa amilase recombinante e a selvagem, evidenciam que as características das atividades enzimáticas, apontam para a paridade das condições de pH 6, temperatura 60 °C, além das condições da cinética das reações enzimáticas da alfa amilase recombinante com Km aparente de 4,8 mg/mL e

velocidade máxima de $2,63 \text{ mg}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{minuto}^{-1}$, bem como, as características da cinética das reações enzimáticas da alfa amilase selvagem com K_m de $4,0 \text{ mg/mL}$ e velocidade máxima de $2,3 \text{ mg}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{minuto}^{-1}$. De tal forma que, os resultados encontrados na literatura corroboram com os resultados obtidos no presente trabalho, de acordo com, Heitamnn, *et al.*, (1997), estudaram a cinética da atividade enzimática da alfa amilase três diferentes condições de amido de batata (insolúvel, solúvel e Zulkowshi) e determinaram os parâmetros de Michaelis-Menten de 1,4; 1,9 e 6 g/L. Marco, *et al.*, (1996) expressaram o gene da alfa amilase no vetor de expressão genética e caracterizaram a cinética da alfa amilase e descreveram o K_m de $3,845 \text{ mg/mL}$ em pH 6.0 e temperatura de $50 \text{ }^\circ\text{C}$. De fato, fica evidenciado que as enzimas estudadas no presente trabalho, são alfas amilases, visto que, a paridade nos resultados da atividade enzimática das enzimas alfa amilase recombinante e a alfa amilase do *Bacillus koreensis* selvagem.

7. CONCLUSÃO

O isolamento das bactérias dos ecossistemas aquáticos dos rios Negro, Solimões e Mamori, foi fundamental para a criação de uma coleção de isolados bacterianos com capacidade de hidrolisar o amido.

Desta totalidade de bactérias da coleção, foi possível identificar o *Bacillus koreensis* como bom produtor de alfa amilase, além da caracterização bioquímica da enzima.

O gene da alfa amilase selvagem do *Bacillus koreensis* foi utilizado como molde para desenhar o gene, que foi construído por síntese química e clonado e expresso em *E. coli*.

Parâmetros físico-químicos e cinéticos das enzimas nativa e recombinante foram determinados, e subsequentemente, comparados e observou-se a convergência dos resultados.

Verificou-se que tanto a alfa amilase natural como a recombinante apresentam temperaturas ótimas, pHs ótimos e parâmetros cinéticos similares. Esses parâmetros indicam que a enzima tem potencial para uso industrial.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Azevedo, F.D.A. & Farjalla, V.F., 2010. Biogeografia de microrganismos: padrões, dificuldades e Perspectivas. *Oecologia Australis*, 14(4): 839-852. DOI 10.4257/oeco.2010.1404.04.

Biazus, J.P.M., Santana, J.C.C., Souza, R.R., Tambourgi, E.B., 2010. Purificação de amilase de malte de *Zea mays*. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, 30(1):218-223, Jan-mar. ISSN 0101-2061.

Borém, A. & Giúdice, M. 2008. *Biotecnologia e Meio ambiente*. Viçosa, MG.

Bukhari, D.A. & Rehman, A., 2015. Purification and Characterization of α -Amylase from *Bacillus subtilis* Isolated from Local Environment. *Pakistan J. Zool.*, vol. 47 (4), pp. 905-911.

Cravo, M.S.; Xavier, J.J.N.; Dias, M.C.; Barreto, J.F., 2002. Características, uso agrícola atual e potencial das Várzeas no Amazonas, Brasil. *ACTA AMAZONICA*. 32(3):351-365.

Cruz, E.A., Melo, M.C., Santana, N.B., Franco, M., Santana, R.S.M., Santos, L.S., Gonçalves, Z.S., 2011. Produção de Alfa-Amilase por *Aspergillus niger* em Resíduos de Cascas de Mandioca. *UNOPAR Cient Biol Saúde*. 13(4):245-9.

Denardin, C.C. & Silva, L.P., 2009. Estrutura dos grânulos de amido e suas relações com propriedades físico-químicas. *Ciência Rural*, Santa Maria, V.39, n.3, p.945-954. ISSN 0103-8478.

Emori, M., Takagi, M., Mauro, B., Yano, k., 1990. Molecular cloning, nucleotide Sequencing, and Expression of the *Bacillus subtilis* (natto) IAM1212 α -amilase gene, which encodes an α -Amylase Structurally similar to but Enzymatically distinct from that of *B. subtilis* 2633. *Journal of Bacteriology*. Vol. 172, n9, p 4901-4908.

Esteves, F.A., 2011. *Fundamentos de limnologia*, 3. ed., Rio de Janeiro: Interciência, 2011. 826p.: il.; 25cm. ISBN 978-85-719327-271-5. Editora Interciência Ltda.

Fernandes Júnior, A.; Cereda, M.P., 1996. Influência do tempo de retenção hidráulica (TRH) sobre a fase acidogênica da digestão anaeróbia de manipueira. *Energia na Agricultura*, Botucatu, v.11, n.3, p.1-7.

Ferreira, J.F., Sbruzzi, D., Barros, K.V.G., Machado, I.S., Tambourgi, E.B., 2011. Purificação da enzima bromelina presente no curauá (*Ananos erectifolius* C.B.SMITH) Variedade roxa, por sistema vífásico aquoso PEG 4000/fosfato de potássio. *Resvista*

Brasileira de Produtos Agroindustriais, Campinas Grande, V.13,n2, p197-202. ISSN 1517-8595.

França-Santos, A., Alves, R.S., Leite, N.S., Fernandes, R.P.M., 2009. Estudo bioquímico da enzima bromelina do *Ananas comosus* (Abacaxi). *Scientia Plena*, V.5, n11, 111101.

Fukusumi, S., Kamizono, A., Horinouchi, S., Beppu, T. 1988. Cloning and nucleotide sequence of a heat stable amylase gene from an anaerobic thermophile, *Dictyoglomus thermophilum*. *Eur. J. Biochem.* 174:15-21.

Fuwa, H. 1954. A new method for microdetermination of amylase activity by the use of amylose as the substrate. *J Biochem (Tokyo)* 41, 583–603.

Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V.K., Chauhan, B., 2003. Microbial α -amylase: a biotechnological perspective. *Process Biochemistry.* 38, p. 1599-1616. Doi. 10.1016/S0032-9592(03)00053-0.

Hankin, L., & Anagnostakis, S.L., 1976. Solid media containing carboxymethylcellulose to detect C_x cellulase activity of micro-organisms. *Journal of general microbiology.* 98,109-115.

Heitmann, T., Wenzig, E. Mersmann, A. 1997. Characterization of three different potato starches and kinetics of their enzymatic hydrolysis by an α -amylase. *Enzyme and Microbial Technology.* 20:259-267.

Heylen, K., Ettwig, K., Hu, Z., Jetten, M., Kartel, B., 2012. Rapid and Simple Cryopreservation of Anaerobic Ammonium-Oxidizing Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, p.3010-3013. Doi. 10.1128/AEM.07501-11.

Jobling, S., 2004. Improving Starch for food and industrial Applications. *Current Opinion in Plant Biology*, Vol.7, pp.210-218.

Jorgensen, S., Vorgias, C.E., Antranikian, G., 1997. Cloning, Sequencing, Characterization, and Expression of an Extracellular α Amylase from the Hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus furiosus* in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 272, n26. Issue of June 27, pp. 16335-16342.

Juge, N., Svensson, Williamson, G. 1998. Secretion, purification, and characterization of barley α -amylase produced by heterologous gene expression in *Aspergillus niger*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 49: 385-392.

Lacks, S.A. & Springhorn S.S., 1980. Renaturation of Enzymes after Polyacrylamide Gel Electrophoresis in the Presence of Sodium Dodecyl Sulfate. *The Journal of Biological Chemistry.* Vol. 255, n.15, 10, pp.7467-7473.

Lacks, S.A., & Springhron, S.S. 1980. Renaturation of Enzymes after Polyacrylamide gel eletrophoresis in the presence of sodium dodecyl sulfate. The Journal of Biological chemistry. Vol 255, nº 15 (10), pp. 7467-7473.

Li, Z.W., Yin, H.X., Yi, X.P., Zhang, A.L., Luo, J.X., Zhang, T.Y., Fu, C.Y., Zhang, Z.H., Shen, J.C., Chen, L.P., 2012. Constitutive expression of barley α -amylase in *Pichia pastoris* by high-density cell culture.

Lim, J.M., Jeon, C.O., Lee, J.C., Ju, Y.J., Park, D.J. 2006. *Bacillus koreensis* sp. nov., a spore-forming bacterium, isolated from the rhizosphere of willow roots in korea. International jornal of systematic and evolutionary microbiology. V51(1), p.56-63.

Lima, L.A., Cruz Filho, R.F., Santos, J.G., Silva, W.C., 2014. Produção de protease colagenolítica por *Bacillus strearothermophilus* de solo Amazônico. Acta Amazônico, V.44(4). P403-410. Doi.org/10.1590/1809-4392201305074.

Lin, L.L., Hsu, W.H., Chu, W.S., 1997. A gene encoding for na alfa amylase from thermophilic *Bacillus* sp. strain TS-23 and its expression in *Escherichia coli*. Journal of Applied Microbiology. 82, 325-334.

Marco, J.L., Bataus, L.A., Valência, F.F., Ulhoa, C.J., Astolfi-Filho, S., Felix, C.R. 1996. Purification and characterization of a truncated *Bacillus subtilis* alpha-amylase produced by *Escherichia coli*. Appl Microbiol Biotechnol. Feb;44(6):746-52.

Maslin, M.A.; Durham, E.; Burns, S.J.; Platzmam, E.; Grootes, P.; Greig, S.E.J.; Nadeau, M-J.; Schleicher, M.; Pflaumann, U.; Lomax, B.; Rimington, N. 2000. Palaeoreconstruction of the Amazon River freshwater and sediment discharge using sediments recovered at site 942 on the Amazon fan. *Journal of Quaternary Science*.15(4): 419-434.

Monteiro, V.N. & Silva, R.N., 2009. Aplicação industrial da biotecnologia enzimática. Revista Processos Químicos/SENAI – Goiás. V.3, n.5, ano 3, jan/jun., p.9-23.

Moreira-Turcq, P.; Seyler, P.; Guyot, J.L.; Etcheber, H. 2003. Exportation of organic carbon from the Amazon River and its main tributaries. *Hydrological Processes*. 17: 1329-1344.

Nadim, M., Deshaware, S., Saidi, N., Abd-Elhakeem, M.A., Ojamo, H., Shamkh, S., 2015. Extracellular enzymatic activity fo tuber maculatum and tuber aestivum Mycelia. 5,523-530, <http://dx.doi.org/10.4236/aim.2015.57054>.

Neves, R.O., 2013. Caracterização da microbiota bacteriana da água do rio Negro em diferentes períodos sazonais. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas/UFAM. 92 f.: il. Color; 31 cm.

Oliveira, A.V., Oliveira, L.A., Andrade, J.S., Junior, A.F.C., 2006. Atividade enzimática de isolados de Rizóbio nativos da Amazonia Central crescendo em diferentes níveis de acides. *Ciência Tecnologia Alimento*, Campinas. 26(1):204-210.

Peixoto, J.C.C.; Leomil, L.; Souza, J.V.; Peixoto, F.B.S.; Astolfi-Filho, S. 2011. Comparison of bacterial communities in the Solimões and Negro River tributaries of the Amazon River based on small subunit rRNA gene sequences. *Genetics and Molecular Research*. 10 (4): 3783-3793.

Polizeli, M.L.T.M., & Silva, T.M., 2016. *Amilases Microbianas*. Edusp – Editora da Universidade de São Paulo. ISBN 978-85-314-1573-9.

Prasad, M.P. 2014. Caracterização of amilase gene in *Bacillus* species isolated from diferente soil samples. *International Journal of current microbiology and Applied Sciences*. V(3), nº 9, pp. 891-896. INSS: 2319-7706.

Puspasari, F., Radjasa, O.R., Noer, A.S., Nurachman, Z., Syah, Y.M., Maarel, M., Dykhuizen, L., Janecek, S., Natalia, D., 2012. Raw starch-degrading α amilase from *Bacillus aquimaris* MKSC 6.2: isolation and expression of the gene, bioinformatics and biochemical characterization of the recombinant enzyme. *Journal of Applied Microbiology*. V.(114), nº 1. pp. 108-120. <https://doi.org/10.1111/jam.12025>.

Rothstein, D.M., Devlin, P.E., Cate, R.L., 1986. Expression of α -Amylase in *Bacillus licheniformis*I. *Journal of Bacteriology*, Nov.p.839-842.

Russell, C., Jarvis, A., Yu, P.L., Mawson, J., 1993. Expression and secretion of wheat α -amylase in *Kluyveromyces lactis*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 40:306-308.

Said, S. & Pietro, R.C.L.R., 2014, *Enzimas como agentes biotecnológicos*, 2º Edição, Editora Legis Summa, Ribeirão Preto/SP. ISBN 978-85-904376-3-5

Sambrook, J., Russell, D.W., Sambrook, J. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

Sánchez, M.M., Fritze, D., Blanco, A., Sproer, C., Tindall, B.J., Schumann, P., Kroppenstedt, R.M., Diaz, P., Pastor, F.I.J. 2005. *Paenibacillus barcinonensis* sp. nov., a xylanase-producing bacterium isolado from a rice fiel in the Ebro River delta. *International Journal of systematic and evolutionary microbiologys*. Doi: 10.1099/ijs.0.63383-0.

Santana, R.S.M., Gonçalves, Z.S., Franco, M., 2012. Produção de amilase a partir da fermentação em estado sólido do farelo de cacau. *Enciclopédia Biosfera*, Centro Científico Conher – Goiânica, V.8, n14. p.1981-1987.

Santos, G.M.; Ferreira, E.J.G. 1999. Peixes da Bacia Amazônica. In: Lowe-McConnell, R.H. (Eds). Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais. *Editora da Universidade de São Paulo*, São Paulo, Brasil. p 345-349.

Saxena, R.K., Dutt, K., Agarwal, L., Nayyar, P., 2007. A highly thermostable and alkaline amylase from a *Bacillus* sp. PN5. *Bioresource technology*, 98. 260-265. Doi: 10.1016/j.biortech.2006.01.016.

Scussiato, L.A., Kunz, A., Viancelli, A., Amaral, A.C.A., Chini, A., 2014. Influência de diferentes métodos de criopreservação na recuperação da Atividade do processo Anammox. Trabalho apresentado no XLIII Congresso Brasileiro de Engenharia Agrícola – CONBEA.

<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/1014054/1/final7513.pdf>

[18/04/2018].

Silva, L.O.; 2015. Desenvolvimento sustentável e a Zona Franca de Manaus. *Constituição, Economia e Desenvolvimento: Revista da Academia Brasileira de Direito Constitucional*. Curitiba - PR, Vol. 7, n. 13, Julho a Dezembro, p.423-440.

Sioli, H. 1975. Amazon Tributaries and Drainage Basins. In F.B. Golley & E. Medina (eds): *Tropical ecosystems. Trends in Terrestrial and Aquatic Research*. Springer Verlag, New York, 199 – 213.

Sioli, H. 1976. A limnologia na região Amazônica Brasileira. *Anais do I Encontro Nacional de Limnologia e Pesca Continental*. 153 - 169.

Sioli, H. 1984. The Amazon and its main affluents: Hydrography, morphology of the river courses, and river types. Cap. 5 pp. 129 – 163. *The Amazon. Limnology and Landscape ecology of a mighty tropical river and its basin*. ISBN 90 – 6193 – 108 – 8. Dr. W. Junk Publishers, Boston, Lancaster. Printed in the Netherlands.

Sioli, P.H.; 1951. Alguns resultados e problemas de limnologia Amazônica. *Boletim técnico da Instituto Agrônomo do Norte*, n. 24, p. 1-44.

Soutgate, V.J., Stein, A.J.C., Pretorius, I.S., Vuuren, H.J.J., 1993. Expression and Secretion of *Bacillus amyloliquefaciens* α -Amylase by using the Yeast Pheromone α -Factor Promoter and Leader Sequence in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 59, n4, p. 1253-1258.

The Freedonia Group, Inc., 767 Beta Drive. Cleveland, OH. USA., p.8, *Enzymes. US Industry Study With Forecasts for 2019 & 2022*. (<https://www.freedoniagroup.com/brochure/32xx/3285smwe.pdf>) [16/04/2018].

Venkateswaran, K., Kempf, M., Chen, F., Satoni, M., Nicholson, W., Kern, R. 2003. *Bacillus nealsonii* sp. nov., isolated from a spacecraft-assembly facility, whose spore are γ -radiação resistente. International Journal of systematic and evolutionary microbiology. Doi: 10.1099/ijs.0,02311-0.

Vermelho, A.B., Bastos, M.C.F., Branquinha de Sá., 2008, Bacteriologia Geral. Editora Guanabara Koogan A.S., ISBN 978-85-277-1366-5.

APÊNDICE

Apêndice A

Apêndice A: Sequência do gene rRNA 16S dos isolados bacterianos dos ecossistemas aquáticos dos rios Negro, Solimões e Mamori.

Identificação	Sequência do gene rRNA 16S
>1_A01_ISO_147	<p>GTTCTCAAGGAACGGAAAGTCTGAGGTAGCACGCCGCGTGGATGATGTAG GTTTCGGATCGTAAACTCTGTTAGGGAAGAACAAGTATGAGAGTAA CTGCTCGTACCTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGTAACTACGTG CCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCGGAAATTATTGG GCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGG CTCAACCGTGGAGGGTCAATGGAACTGGGGAAGTGGAGTGCAGAAGAGG AAAGCGGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAAC ACCAGTGGCGAAGGCGGCTTTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAA AGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCTGGGTAGTCCCAA</p>
>9_A02_ISO_147	<p>TTCCGACTTTTTTCGCGCTCAGCGTCAGTTACGACCAGAAAGCCGCCTTCG CCACTGGTGTTCCTCCACATCTCTACGCATTTACCGCTACACGTGGAAT TCCGCTTTCCTCTCTGCACTCAAGTTCCCAAGTTTCCAATGACCCTCCA CGGTTGAGCCGTGGGCTTTCACATCAGACTTAAGGAACCGCTGCGCGCG CTTTACGCCAATAATTCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCG GCTGCTGGCAGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGT ACGAGCAGTTACTCTCATACTGTCTTCCCTAACCAACAGAGTTTACGA TCCGAAAACCTTCATCACTCAGCGCGGTGCTCCGTCAGACTTTTCGTC ATTGGGAAGATTCCCACTGCTGCTCCTCCCGTAGGAGTAGGCTCTCAA GGGAAAAAGTCAACGAACAACCCCGGGGGAAAAAAGGTTTGTACTA AACTTTGTGTTGGGGAAAAAATAAAAAAATTGGTCCATCCTTT GGGGTCCCTAACCAAAACCCCGGAAATTACGCGCCCCCCCCCGGAAA ACCTTAGGGGGAGAGGGTTCCCAAAAAATTGGGGGAAAAAACG</p>
>10_B02_ISO_148	<p>TTTCGCCCTTTTCGCGCCTCAGCGTCAGTTCAGAACCAGAAAGCCGCCTT CGCCACTGGTGTTCCTCCACATCTCTTTTTATGTCACCGCTACACGTG GAATTCGCTTTCCTCTTCTGCACTCAAGTTCCCAAGTTTCCAATGACCC TCCACGGTTGAGCCGTGGGCTTTCACATCAGACTTAAGGAACCGCTGCG CGCGCTTACGCCAATAATTCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTAC CGCGCTGCTGGCAGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGGTACCGTCA AAGGTACGAGCAGTTACTCTCATCTTGTCTTCCCTAACCAAGGTTT TCCAACCCGAAAACCTTCTTCCCTCACCCGGCGTTGCTCTCTTCAAACCT TNGATCCATTTGGGGAAAAATCCCAACCGACTGCTTCAACATACGAGGGG GAAAAACCCNACATACATATACCCATCAATTCGCGATAAGATTGACATA GCCAATTTTTTCTAGTCTTTTATCTTTTACCCTCAAACATACACATA TGTTCACTGTAACCTGCACTACAATGTTAGCCGCGACGCCAGAGTCAA TTCTACTATCTTTCGAATCACACATGGCATCCAAAATTCAGGGGGAT CC</p>
>2_B01_ISO_148	<p>TTTTCATAGGGCCAAAACCTGACGGAACAACGCCGCGTGGATGATGAAG GTTTTCGGATCGTAAACTCTGTAACCTTGGAAGAGGGAGAATGAGAGTA ACTGCTCGNACCTTGCCGTACTTAACCAGAAAGCCACGGTAACTACGT GCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGATTCGGCCCTAAT GGTGTAAGCTAGCATTGGAAGAGTCATAACCCGTAGGTTAAAGTCCACG GGTATCCCTATTAAGTCGTATAGGTAATGGTTTTATCCATCTGAGGT ATATTAATTATAATTTACTAATTTTCTTAAATCATTAGATATTATG ACGAACTGACTACTGCAAGAAAGTCAAAATCGTCTACTCCACCTCAGA CCCTGCAATACTTTGGTTGTAAATTTCTCTGTATCATCATTTATAT ATGGTTTAAATAGTCTTAGACACACTATGACTGTAGCGCAGCTAATAT CAGCTAGCAGTCTTATCTCTCACACTACATTCCTCTATATCTTACT GCTCTCTCTCTTTTGGGTGGTCCAAATGCTTCTCTCTTACTTCT ATTTTCACATATAGTACCCCGGAAATCA</p>

<p>>3_C01_ISO_175</p>	<p>CTTTGAAGTACTTCTTCAGAAAGGCGTCCGTCGACCCATCCGAGAGGGGCG CGGCGCGCTTCCACACGGTGGCTGAACTAAAGGATGGGTGCGGGGAGTT CCGAGAAAAAGGCAAAAGTCTGAAGGGAACAAACGCCGCGTTTATAGT AATGAAGAGTTATCCGGGATCGGAAAAACNTCAGACTCCCCCTTTTAGA GAGGGGGGANTCAACATCTTCAATANTNATGACATGCAAAACGAACTCA CTTAAACAGAAGCCAAAACAACACACATCGCACGCNCCACCCACTATA GATCCACGAAATGGTACGACCCAGCACTCAGCACATATAATCCCCAATAC TAACCCAGATCATCAATACACCACAAACCACCGTATCAAAATTACAANC TACCCCTTCACAATCCACCCACTACAAACTAACTTTTCAAACCCACTATA TCTCCACACTCTAATNGTAGTGCATTTGGCTCAAGCATACGGATGTGCT TAACTGAGTATTACTGAACATTACATAACAAACATCTCACCTCATACCCC CCACCGCCAGACACACACACCCCAACGACCAACACAAATAGAGGAGTGA GGCCTCTTGGGCATCATCCCGCCACGCCACAACGACCACTGTCCACAGCA TCCGCGAAGATCCATAGGAGCGCCGACGACAGTAAACCGNCTAGCAGC CATCAGGAAGCATTGTACAGCAGACAAACATGCAGACCAGCCAGCACCA AGCAGTACGACAAGCTATTCTATGAAGCGCACTTACCAGACCAGCCCA TGTAACCTCTCCACGAAATAGTACCAATGCGACTACCTATCAGTAATTGA GATCTTTTGTGATAGCAGATAAGTGCACGACACCCAAAACAGCGCGCG AAACCACTGCTGAACAGACATCGGCGAGAAAACAAAACGACCCCAACGTAT ACATAACAAGAACATCTTACACAACTACAGAACATCTCACAACTAAAA CTGCTATATAGACTATTAGAA</p>
<p>>11_C02_ISO_175</p>	<p>GATTATTACAAAATATTTTCTCACATTATGGTGGCTGGGGCGCCCCGG GGGTGCGNNTATGGGAGGAGGGGATTGATCCCGTCCCTTCCGCTCACGTGC TTTACGACCATAAGCCGCTTCGCCACTGGTGTCTCCACATCTCTATT TATTTACCCGCTACAGTGGAAATCCGCTTTCCTTCTGCACTCAAGTT CCCCAGTTTCCAATGACCCTCCACGGTTGAGCCGTGGGCTTTCACATCAG ACTTAAGGAACCCGCTGCGCGGCTTTACGCCAATAATTCGGACAACG CTTGCCACCTACGTATTACCGCGGTGCTGGCAGTAGTTAGCCGTGGCT TTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTACGAGCAGTTACTCTCATACTTGTCT TCCCCTAACACCCGACGTTTACCCATCCGAAAACTTCATTAATTAAGCG GGGGTGGCTCCGTTTCGAATTTCCGCCATTGGGGGAAGAATCTCCTTATT GCTGCCTCTCCGGAATGGGGGTACCCCGTACCACCCCCCTCTTCC TACAATCATTAACTACGATNTTCTATTTCCGGTTCTCTTTACCAGT CTCAATCTGGCTCCTCATCTACCCAGCCGGCCACGCTCCCCCACCTCT CCTCCCCTCCGTTCTCTCTAATCTCCCTAAATTTCTCTAATACANA ATCGTTACAAATAACACTTTTAATACATCATTTTCTAAAAA</p>
<p>>5_E01_ISO_178</p>	<p>ATTTGATGGGAAAAAATCTGAAGGTAGCACGCCCGCGTGTAGTGATGA AGGTTTTCGGATCGTAAACTCTGTGTAGGGAAGAACAGTATGAGAG TAACTGCTCGTACCTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGTAACTAC GTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTAT TGGGCGTAAAGCGCGCAGGCGGTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCA CGGCTCAACCGTGGAGGGTATTGAAACTGGGGAACCTGAGTGCAGAAG AGGAAAGCGGAATTCACCGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGG AACACCAGTGGCGAAGGGGCTTTCTGGCTGTAAGTACGCTGAAGCGC CAAAGCGTGGGAGCAAACAGGAATAATCCCTGGGAAGCCCATTTTTC NTTTTTTCTCTCGTTGTGTGCTTCTCCTCCTTTTTCTTCTTCTCCT TTTCTTCTCTGCGTTTTCTTTCTTCTTCTGCTCCCTCCTTCTCTCCC CCCTCCTCCCCCTCGGCTTTTTCCCTGGTCTTCTCCTGTTTCTTCT CTCCTTTGTTTTTTTTCTTCTGTTTTGTCTTCG</p>
<p>>13_E02_ISO_178</p>	<p>TCCCCGCTTTTGGCGCTCGGTTTCAGTTAAGACCAGAAAGCCGCTT CGCCACTGGGTGTTCTCCACATCTTACGCATTTACCAGCTACACGTGG AATTCGCTTTCTCTTCTGCACTCAAGTTCCCCAGTTTCCAATGACCCT CCACGGTTGAGCCGTGGGCTTTCACATCAGACTTAAGGAACCGCTGCGC GCGCTTACGCCAATAATCCGGACAACGCTTGGCACCTACGTATTACC GCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGGTACCGTCAA GGTACGAGCAGTTACTCTCATACTTGTCTTCCCCTAACAAACAGATTTT ACGATCCGAAAACTTCATCACTCACGGCGGTTGCTCCGTACAGCTTTC CGTCCATGCGGAGAATTTCTACTGCTCCTCCCGTAGGAATGGAAC CATCAAAGACAAAGCGTACAGACATNAATATAGTAGTAGGGTTCGACTGCG</p>

	<p>AGTCCAAACCTCCCCGCCCCGGCAACCACACCGCAATCATCGGTCTCCC AGGCACCACCCCCGAAGCACCCCAATCTCTCTCACCTCGTATCTTA TAGGTGTAATTGCCGGCTTCATCTCCGGCCCATCGACCCGACGC</p>
>6_F01_ISO_100	<p>ACCTCACGCACAACGACCGATAGAAGGGACCTAGGGACCCAAAACGGGGG CGACAAGCAGGGGAGGGAACGGGAATAGGGGAAGCCGACGGACAGCCGCG TGAGTGATGAGGTTTCGGACCTTAAAGCACCGTCCCCCTTAGAGGGGAA AGCACACGCCCCAGAAACAACAAACCCGAACCCCAACATTCCATCAAGAC CCACCCCCCCCCACCTGGAGGAACCCCAATGTGCCCAACCCAGAA ACCAGATCAAAGCAAAAACAACACCGCACCGAACGACCCAGGAGACATT CCACCAAAGCNCCCCGACCCCAACACACCCACCCCAACCAACCAACAC ACTTCCAGACACGCACCCCCCCCCCGCTTCCCGGGCGCCCGAACCC CCCACCAGCACCCCAACACGCCCCGCGCACTCCACCCACACGGGAA CGAACAACCCCTCTCGCGACACCGCTCCCCCCCTCCGCTCCGGTACG AACACGAGAACCCCGCGGGCCAAAAGAAAACAACACCCAGACCCAGCA ACCGGCCGTCTNCTGCTAATAAATAAAGTAAGAAGAAGCTAGAGA CGACGCGCGGCCACCGGACGCAACGCATGAACAGACCGCGCGCCCA GCACGCCCCCCACGGCCGAACATTAACAACCCGATCCACCCCTCTC ACTACTCCGCACACATCCACGCTCCACCACCAACCGCCAACGACCCAC CACCCCGC</p>
>14_F02_ISO_100	<p>AGTGCCGCGTCAGCGGGTATGACATATGCGGGAGTGAATGGATAACCNC ATCTGGGGCCGGCTTATGTTGGTTGGGGNINANTGCGCTTCGCATTGC GCCCTACGCCAGCTTACAGCCAGAAAGTCGGCTTCGCCACTAGGTGTA ACCTCCACATCTCTTTGGCATGGTCACCGCATACCACGTGGCAATTCCA CTTATCTCTTTCTGCACTCAAGACAAGCAGTATTCCAGATGCGATCCGG AAGTAGAGGACCTGAAAATAAAACATCTATAGATTCAAGAACCCCCACA ATGAGTGGATATAAGGTCCAAGCAAGCAAGCAGCTCGTACGGGCACT ACGGACACTGNCACCTAGCCGGGGGGCTCGCTNTCCAGCCCTCTATTA TATTTTATTGTTTTTTGAGTAAATCTCTTACCACCTTTCTACTATAAATA TCACACACAAAACNTCTACTGCCCCTTTTTCTACAATATGACATAGAA CAGGTGTCAATCAATATAACCTCGATAGCAATACCGCTTTCGCTCCAC GACTCTGTCTGCCGCTTACTCCGGCTCTCAATGCGCGTTCGCCGCGCA CGGCGCATCCCTCAGGAGCACTCTATCAGCGCCCACTNGCGTACAACCCA CCACTCTTCTACTGGATGTACGTATCGTCTGAGAAATATGGACTAACCA TCGCGCATCAAAATATAGAAAGGAGCACACGTTATCTCGCATCAGAAGC CACATCAAAATAAAAGATTTTTATCCCAACTACACAGCCAACCCAGA ACCTATAANACCACCTAGCGGTAGGACGAAATGAAATCTCCACGAATG</p>
>63_G08 - 100	<p>AACAATATCGAAGGGGGGGCAGGCGTGTCCGGAATTATGGGCGTAAAG CGCGCGCAGGCGGTATGTAAGTCTGGTGTTCCTTGGGGCTCAACCC GGATCGCACTGGAACTGCGTGACTTCAGTGCAGAAGAGGAGTGGAAAT TCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAAGTGGCG AAGGCGACTCTCTGGGTGTAACCTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGA GCAAAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCGTAAACGATGAATGCT AGGTGTTAGGGGTTTCGATACCTTGGTGCCGAAGTTAACACATTAAGCA TTCCGCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGG GGACCCGCACAAGCAGTGGAGTATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGAAG AACCTTACCAGTCTTGACATCAACTAACGAGGCAGAGATGCGTCAGGT GCCCTTCGGGGAAAGTTGAGACAGGTGGTGCATGGTTGTCTGCTCAGCTCGT GTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCACACGAGCGCAACCCCTTATATTTA GTTGCCAGCACTTCGGATGGCACTCTAAATAGACTGCCGGTGACAAAACC GGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGC TACACGTAATAAATGGCCGGGACAACGGGCAGTGAACCCGAGGTG GAACCCATCTAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGCGGGCTGCCACTCG CCCTGGCTGAAGTCCGGAATTGGTAGTAATCCGCGAATCCAGCATGGCCG GCGGTGAAATACTTTCCCGGGCTCTTTGGACCCCCCCCCCGCCCC CCCCCGAAAAGATTTTAAAAAACCCCCGAAAAAGTTGGGGGGGGGGG GGTTAACCCCCCAAGGGGAGACCCCGACCCCGCCCCCGCCCGAA AAAAG</p>
>64_H08 - 100	<p>CCACCACACTCATCTATCCACCTTCGGCGGTGGTCTTGGCGTTA CCCCACCGACTTCGGGTGTTAAAACTCTCGTGGTGTACGGGCGGTGTG TACAAGACCCGGAACGTATTACCGCGCATGTGATCCGCGATTACTA GCAATTCCGACTTATGACGGCGAGTTGACGCTGCAATCCGAACTGAGA</p>

	<p>CCGGCTTTTAGGATTGGTTCACCTCGCGGCTTCACTGCCCGTTGTACC GGCCATTGTAGTACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTG ACGTCATCCCCACCTTCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCTATTTAGAGTG CCCACCCGAAGTGTGGCAACTAAATATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGA CTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTG TCTCAACTTTCCCGAAGGGCACCTGACGCATCTCTGCCTCGTTAGTTGG ATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATA CTCCACTGCTTGTGCGGGTCCCCTCAATTCCTTTGAGTTTCAGTCTTGC GACCGTACTCCCCAGGGGAATGCTTAATGTGTAACTTCGGCACCAAGG GTATCGAAACCCCTAACACCTAGCATTTCATCGTTTACGGCGTGGACTACC AGGGTATCTAATCCTGTGTTGCTCCACGCTTTCGCGCCTCAGCGTCAGT TACAGCCCAGAGAGTGCCTTCGCCACTGGTGTCTCTCCACATCTCTACG CATTTCACCGCCTCAGTGGAATTCCTCTCTCTCTCTGCACTCCAG TTCCCGCAGTTTCCAGGGGCGAATCCCGGGTTTGAAGCCCCGGGGA ATTAATAACCCAAAAAATACTGGGAACCCCGCCCGGGCCGCGG GCGCCCTTTTTTACCCCCCCCCAAAAAAAAT</p>
--	--

Apêndice B

Identificação	Sequencia
<p>>1_ <i>Bacillus</i> <i>koreensis</i> strain DSM 16467, GenBank: LILC01000037.</p>	<p>1 atggaacgta atcacacgat gatacagttc ttgaaatgce atattgaagc agatggagag 61 cactggaacc acctaaaaga gtgggcacct gaattaaaga agcgaggaaat tgattcgggtg 121 tggattcccc ccatcaaaa ggcagaatct ccgcaagata ctgatgatgc tctctacgat 181 ttatacgatt tgggtgaatt tgatcaaaa ggagaacgac gaaccaata cggacaacaaa 241 gaagagctag aggaagccat taaagcctgt catgatcatg gaattaaagt gtatgtggat 301 gtagtaatga atcataaggc cgctgccgat gaaaccgaaa cattcaagt cattgaagta 361 gatcctaagc acegagaaac ggaaattcc gaaccgttg atatagaggg ctggacgaaa 421 ttaccttcc cgaaccgaga acagaagtat tcttcttca ctggaattt taatcacttt 481aacggaacag actttgatca gaagacagga aaaaagccg ttttctgat ttaggggaa 541 aacaaatcat ggaataaccg tgggatgac gaattggaa actatgatta ttgatgtt 601 gcgaacatcg attactaca cccagaagtc aaagaagaaa tgattaaatg gggaaaatgg 661ctacagaaacgcttgggtg cgacggatac agattagatg cgaacaaca tatcgaacac 721 cgctttggtg aatcattgt gaaggaaata acagacacag ctaaccgccc ttttatata 781 ttcggatgaat ttggaacaa cgattgcag gcttggagg aattctaaa taacgtcgtat 841 tatcagctcg attatttga tggatgctc cactacaatc ttcatgaggg ctctaaaatg 901 ggacgagatt ttgattaac gactatattc aatgatacac tegtcaaac gaatcctctc 961 caagccgta cgtttggga taacctgat tcacagcaa atgaatcct agaatcgtgg 1021 atagacgact ggttaagca aagcgcgat gccctcattt tactcgtgc tgacggctat 1081 ccttgctat ttacggaga ttactaggc attaacgggg acgagccgat agaaggaaag 1141aaagaagccatgatcctct gctttatgt cgtacgaga aagcacaagg cgacgacgat 1201 gattactttg atcatcaaa cacatcggc tgggttcgcc gaggaaatcga tgagatatca 1261ggctcaggggtgacgatc tctatcgaat ggtgaaaacg gtgaaaaag aatgttgggt 1321ggggaaaat gtcagggga agaaggaag gatctaccg gtaacgaga ggatacgatt 1381acaattgaagaagacgctt cgctacgttt ccagtaaacg gtggaagtgt ttccgttgg 1441 gctctcceta cagaagaata a</p>
<p>>2_ <i>Bacillus</i> <i>koreensis</i> strain</p>	<p>1 atggaacgta atcacacgat gatacagttc ttgaaatgce atattgaagc agatggagag 61 cactggaacc acctaaaaga gtgggcacct gaattaaaga agcgaggaaat tgattcgggtg 121 tggattcccc ccatcaaaa ggcagaatct ccgcaagata ctgatgatgc tctctacgat 181 ttatacgatt tgggtgaatt tgatcaaaa ggagaacgac gaaccaata cggacaacaaa 241gaagagctag aggaagccat taaagcctgt catgatcatg gaattaaagt gtatgtggat 301 gtagtaatga atcataaggc cgctgccgat gaaaccgaaa cattcaagt cattgaagta</p>

<p>DSM 16467 - alpha-amylase "WP_053403806.1"</p>	<p>361 gatcctaaccgaccgagaac gaaatttcc gaaccgtttg atatagaggc ctggacgaaa 421 ttaccttcc cgaaccgaga acagaagtat tcttcttca ctggaattt taactacttt 481aacggaacagactttgatcagaagacagga aaaaaagcgc tgtttcgcat tttaggggaa 541 acaaatcat ggaataaccg tgtgatgac gaattggaa actatgatta ttgatgttt 601gcgaacatcg attactcaca cccagaagtc aaagaagaaa tgattaaatg gggaaaatgg 661ctacaggaacgcttgggtcgcagggatac agattagatg cgaatcaaca tatcgcac 721cgtttgtgg aatcattgt gaaggaagta acagacacag ctaaccgccc ttttatata 781 ttcggtgaat ttggaaca cgaattgcag gcttggagg aattctaaa taacgcgat 841 tatcagctcg atttattga tgtgatgctc cactacaatc tcatgagcc ctctaaaatg 901 ggacgagatt ttgattaac gactatattc aatgatacac tctccaac gaatcctc 961 caagccgta cgtttgtgga taaccatgat tcacagccaa atgaatcctc agaactgtgg 1021 atagacgact ggttaagca aagcgcgat gcctcattt tactcgtgc tgacggctat 1081 ccttgcctat ttacggaga ttacttaggc attaacgggg acgagccgat agaagggaaag 1141aaagaagccatcgcctctc gctttatgct cgtactgaga aagcaccg cagcagcat 1201gattactttg atcatcaaa cacatcggc tgggttcgcc gaggaatcga tgagataca 1261ggctcagggctgcatcattctatcgaat ggtgaaaac gtgagaaaag aatgttgggt 1321gggaaaatcgtcaggggaaagaatggaaggatctaccg taatcaga ggatacatt 1381acaattgaagaagcgcctt cgtactgctt ccagtaaacg gtggaagtgt ttccgttgg 1441 gctctccta cagaagaata a</p>
<p>>3_ <i>Bacillus koreensis</i> strain DSM 16467 - 5WP_053400074.1 - NZ_LILC01000002 -</p>	<p>1 atgatttctc ctgcaagc aaacgctgc actgatcga aatggcagga cgaatgatg 61 tatttatta tggcgcacg cttaataac ggagatgaa aaaatgatg tgaatcaat 121ccggatgacc caaagccta tcatgcccgc gatccaag gaatcataga gaagctgat 181 tatataaag ataggggtt tacatgatt tggctgacgc ctatttcta taatgaacag 241 aaggataaccagcctactg gatccaagat ttttaagc tggacgagca ctttggctacg 301 atacaagactttaaaagt agtaaggaa gtcataagc gcgatatgaa ggtatttta 361 gattttagt ctaatcaca cggttatcag catccatgac taaaagacc ggcgaagaaa 421 gattgttcc atgaaaaga agacattgtg aactggaaca gtcaggatga gattgaaaac 481 ggatggctat acggtctcc ggatttgaat caagaaaac cagacgtaa gaagtattg 541 atcagcgg gcaaatggtg gattaaaaga acgatattg atggtatc tttgatac 601 gttcgcacg taccgaaaga attttgact gaattctcag aggaaatgaa gaaaacaaa 661 aaagatttt tcttattag agaagtttg aacagcgc cctgttatc ggcagaat 721 caaaaaatg gaattgatc gatggtgat tttctctat acgatcagct tacaacatc 781 tttcaaacg tagatgaac acagaaaac ttaattgcat cgtggaagc aaacaaagc 841 gctatcctc acccgtatt actcggaac tttctgata atcatgatac agagcgttt 901acgagacaag cactcgcg cataagcagta tctgtgacac gtacgaaat gggattaaca 961 tacttatac gggcacctgg tattccgatt gtctactacg gaactgaaat tacgttagat 1021 ggtggaag atcctgataa tcgacgatta atgaatttc aatcggaca ggaattagga 1081 gagtatgtg ggaactcgc agagctcgt cgaagcacc cgtctttaa aagaggaacg 1141 tttgattcca tttcgaaga gaatggaatg gctatttaca aacgaacgta taaaacgaa 1201 acgagcctg tagccattaa caatacatca aaaaatcagg tgggtgattt aaaagaagc 1261 tttgtcga aagaagaact acgagcctt ttagaatcgg atttgttcg accagatggt 1321 gatgtataca aattgtctgt aatcgggaa acggcaata tttatgtagt agcagacaaa 1381 tcaggattaa atattccgta tatcgtcgc atgtagcaa tatatgttc gttcattgct 1441 ttcttatatt ttgcagtaa acgtagaaga aaggcataa</p>
<p>>4_ <i>Bacillus koreensis</i> strain DSM 16467 scaffold4. GenBank:LILC0100 0037.1protein_id="KOO37366.1"</p>	<p>1 atggaacgta atcacacgat gatacagttc ttgaaaggatattgaagc agatggagag 61 cactggaacc acctaaaaga gttggcacct gaattaaga agcagggaat tgattcgggtg 121 tggattcccc ccatcaca aa ggcaagaatc ccgcaagata ctggatatgc tgtctacgat 181 ttatagatt tgggtgaatt tgatcaaaa ggagaacgac gaaccaata cggaaacaaa 241 gaagagctag aggaagccat taaagcctgt catgatcag gaattaacgt gtatgtggat 301 gtagtaatga atcataagc cgtcgcgat gaaaccgaaa cattcaagt cattgaagta 361 gatcctaacc accgagaac gaaatttcc gaaccgtttg atatagaggc ctggacgaaa 421 ttaccttcc cgaaccgaga acagaagtat tcttcttca ctggaattt taactacttt 481 aacggaacag actttgatc gaagacagga aaaaaagcgc tgtttcgcat tttaggggaa 541 acaaatcat ggaataaccg tgtgatgac gaattggaa actatgatta ttgatgttt 601 gcgaacatcg attactcaca cccagaagtc aaagaagaaa tgattaaatg gggaaaatgg 661 ctacagaaa cgttgggtg cgcagggatac agattagatg cgaatcaaca tatcgcac</p>

721	cgctttgtgg aatcattgt gaaggaagta acagacacag ctaaccgcc tttttatata
781	ttcgtggaat ttggaacaa cgatttcag gcttctgagg aattctaaa taacgtc gat
841	tatcagctcg atttattga tctgatgctc cactacaatc tcatgagcg cctaaaatg
901	ggcagagatt ttgattaac gactatattc aatgatacac tctccaac gaatcctc
961	caagccgta cgcttggga taacctgat tcacagcaa atgaatcct agaactgtgg
1021	atagacgact ggttaagca aagcgcgat gccctatt tactctgctc tgacggctat
1081	ccttcctat ttacggaga ttactaggc attaacgggg acgagccgat agaaggaaag
1141	aaagaagcca tcatcctct gctttatgct cgctacgaga aagcatcgg cgagcagcat
1201	gattacttg atcatcaaaa cacaatcggc tgggtcggc gaggaatcga tgagatca
1261	ggctcagggt gtcagtcac tctatcaat ggtgaaacg gtgagaaaag aatgttgg
1321	gggaaaatc gtcagggga agaattggaag gatctaccg gtaatcgaga ggatacatt
1381	acaattgaag aagacgctt cgctacgctt ccagtaaacg gtggaagtgt ttccgttgg
1441	gctctcccta cagaagaata a

Apêndice C

Apêndice C: Sequência do gene Amy do *Bacillus koreensis* depositada no Gene Bank (NCBI) e as posições de anelamento dos iniciadores e o local do peptídeo sinal.

Identificação	Sequência do gene da alfa amilase
>ALPHA-AMYLASE - BACILLUS KOREENSIS	<p>1 ^{5'}atgaaaaaga agtgaagaa gagaagtgc ttgcggcca ^{Pepsinal}ttacgatgtt tcaacctta</p> <p>61 ttattagtgc catcgcttc acagccaaaa gaggcaaaagg cggctacaac aaatggaacg</p> <p>121 ^{forward A1}atgatgcaat atttgaatg gtac ^{B1forward}gttcca aatgacggcc agcaatgga cggattgcgc</p> <p>181 accgatgctc cgtatttate aagcgttggc ataacagcgg ttggacgcc gcctgcatac</p> <p>241 aaaggaacaa gtcaagcaga tgttgatc ggaccgtacg attgtacga tctaggggaa</p> <p>301 ttaatacaaa aagcaccgt ggcacaaaag tacggaacga aagccgagtt aaaatccgct</p> <p>361 gttataacgc ttactcaaa cggatatacag gtttatggag acgtggtat gaaccataaa</p> <p>421 gcggggcgag actacacgga aaacgtaacg gcggttgaag taaatccgag caatcgaat</p> <p>481 caagaacgt ctgagaata taacattcaa gcgtggacgg gtttaactt cccgggacga</p> <p>541 ggaacgacgt acagtaatt taaatggcag tggttcact ttgacgggac ggactgggat</p> <p>601 caatcgagaa gcttgatgc aatcttaag tttaggggaa ccggaaggc gtgggattgg</p> <p>661 gaggtatcgt cagaaaacgg aaattacgat tattgatgt atgcagatat tgattacgat</p> <p>721 caccctgacg ttgaaacga aatgaaaaaa tggggcgat ggtacgaaa tgaagtgg</p> <p>781 ttgatggat accgct ^{Forward C1, Reverse C2}aga t gcg gtg aaa cat att aag t ttcatctt aaaagactgg</p> <p>841 gtggataatg cgcgtgcagc cactgaaaa gaaatgttta cggtaggaga gtactggcag</p> <p>901 aatgacctt gtcgctcaa caactatcta gcaaaggta attacaatca gtcgctatt</p> <p>961 gatgcaccgc tcaactaaa ttttatgcg gcatcaacgg gtggcgggta ttatgacatg</p> <p>1021 cgaatattt taaataatc gcttctgct tcaatcaa caaaagcgg aacgctcgt</p> <p>1081 gagaacctg atcacagcc ggtcaatca ttagaatcaa cggttcagcc ttggttaag</p> <p>1141 ccgttagcct atcgcttat ttaacgaga tctggcgggt atccatcgt attctatggc</p> <p>1201 gatatgtacg gaacaaaagg tacgacaaca cgcgaaatc cagcattgaa gtcgaaaatt</p> <p>1261 gaaccgttgc taaaagcag aaaagactat gcgtatgga cgcaactga ttatcagat</p> <p>1321 aatccagatg tgattggatg gactcgagaa ggagatagta caaaagcaaa atctggactt</p>

1381	gcaacggtca ttaccgacgg tctggcgga tcgaagcga tgtatgtgg aacatctaat
1441	gcgggagaag tctggtatga cctcacagga aatcgaacag ataaaattac gattggatca
1501	gatggtatg cgacgttc ^{Reverse B2c} tgtaaaccgg ggttctgtt ^{Reverse A2} ctgtatgggt tcagcagtaa ^{3'}

Apêndice D

Apêndice D: Dados brutos do sequenciamento do gene Amy dos isolados dos ecossistemas aquáticos dos rios Negro, Solimões e Mamori.

Identificação da sequência	Sequências de DNA do gene Amy
>175_F	AAATCGAACATCTGNATCCGATCGTAATTTTATCTGTTTCGATTTCCTGTG AGATCATAACCAGATTTCTCCCGATTAGACGTTCCACATACATTTCGTT CGATCCGCCAGGACCATCGGTAATGACCGTTGCAAGTCCAGATTTTGCTT TTGTAATATCCCCTTCTCGTGTCCATCCAATCACATCTGGGTTGTTCGATG TAATCACGCTGCGTACCGTACGCATAGTCTTTTCTCGTTTCAGCAATGG TTCAATTTTCGACTTCAATGCTGGAATTTCCCGTGTGTTCGTACCTTTTG TTCCGTACATATCGCCATAGAATAACGGATGGATAACCCGCCAGATCTCGTT AAAATAAACGCATAGGCTAACGGCTTAAACCAAGGCTGAACCGTTGATTC TAGTGATTGGCCCGGCTGTGTATCATGGTTCTCAACGAGCGTTACCGCTT TTGTTGGATTAGAAGCAACAAGCGTATTATTTAAAATATTTTCGCATGTCA TAATACCCGCCACCCGTTGATGCCGCATAAAAATTGTAGTGAAGCGGTGC ATCAAATAGCGACTGATTGTAATTAACCTTTGCTAGATAGTTGTTGAGCG CACCAAGGTCATTCTGCCAGTACTCTCCTACCGTAAACATTTCTTTTCCA GTGGCTGCACGCGCATTATCCACCCAGTCTTTAAGAATGAAAACCTTAAT ATGTTTCACCGCATCTAGGCGATATCCATCTAAGCCACTTCATTGGCAT ACCATAACGCCATTTTATTTTCTTTTACAACGTCCAGGATGATCGTA ATCCAATATCCTGCATTCTTTAAATTAATCGATATTTCCCGTTTTCCG GAACAATACCCTTCCAAAACCCCCACCCCTTTTCCCGGTTTCCCC CTTCAAAACCTTTAAAAAAATTTACCACAACCATAAAAAAGCCCTTTC CCCTCCCCGAATATTTTIGA
>175_R	AAATCGAACATCTGNATCCGATCGTAATTTTATCTGTTTCGATTTCCTGTG AGATCATAACCAGATTTCTCCCGATTAGACGTTCCACATACATTTCGTT CGATCCGCCAGGACCATCGGTAATGACCGTTGCAAGTCCAGATTTTGCTT TTGTAATATCCCCTTCTCGTGTCCATCCAATCACATCTGGGTTGTTCGATG TAATCACGCTGCGTACCGTACGCATAGTCTTTTCTCGTTTCAGCAATGG TTCAATTTTCGACTTCAATGCTGGAATTTCCCGTGTGTTCGTACCTTTTG TTCCGTACATATCGCCATAGAATAACGGATGGATAACCCGCCAGATCTCGTT AAAATAAACGCATAGGCTAACGGCTTAAACCAAGGCTGAACCGTTGATTC TAGTGATTGGCCCGGCTGTGTATCATGGTTCTCAACGAGCGTTACCGCTT TTGTTGGATTAGAAGCAACAAGCGTATTATTTAAAATATTTTCGCATGTCA TAATACCCGCCACCCGTTGATGCCGCATAAAAATTGTAGTGAAGCGGTGC ATCAAATAGCGACTGATTGTAATTAACCTTTGCTAGATAGTTGTTGAGCG CACCAAGGTCATTCTGCCAGTACTCTCCTACCGTAAACATTTCTTTTCCA

	<p>GTGGCTGCACGCGCATTATCCACCCAGTCTTTTAAGAATGAAAACCTAAT ATGTTTTACCCGCATCTAGGCGATATCCATCTAAGCCCACTTCATTGGCAT ACCATACCGCCATTTTTTTTATTTCTTTTACAACGTCCAGGATGATCGTA ATCCAATATCCTGCATTCTTTAAATTAATCGATATTTCCCGTTTTCCG GAACAATACCCTTCCAAAACCCCCACCCCCCTTTTCCCGGGTTTCCCC CTTCAAAACCTTTAAAAAAAATTTACCACAACCATAAAAAAGCCCCTTTC CCCTCCCCGAATATTTTGA</p>
>100_F	<p>TCGGAGAAATGTGGGGGTGGGGAAAAGTATTTGGAAGGGGAGGTTTCGNNT TTGTCCGTTNNTCCGGGNGGCNNGCNGTTCCTGTTGNNTTTTTCCCTGN NNGCGGCGTCTTCGGNGNGTGNNTGNNTTTCGCTTGGTGCGCGCCTT TGTNTCTTGTGCGGGTTCGCGCTTTGTGCTNTCTGCTTGGTGGGCGGGCG CGCGGCGCGTCTTTGGGGGGCCCTCCCCCGCTCTCCTGCGCTCGT TGGTCCC CGCGGGCGCCCGCGGCCTCCCTGCGGGGCGCCCGCTTGGT CGGGGGCCCCCTGCGGTTTGCCTGCGCGCCTTTTCGCCGCGGGCCTCGC GCTCCTCTTGNCGCCTGCCCTCCGGCGCTTCCCTGTGGCGGCCTGGCG GCCTGTTTCCGCCNCGTGCCGCTCTTTTCGGGCTGCCGTTCCGTGCCGC CTGCTGGCGCCGCTTTGCTTGTTTTGGTCTGTNTTCCCGTGTGGCC CCGTTTGTGTCCGCTGGCTCTTCTTGGTTGGTCCGCTCGGTTCCGCCGCT CCTCCTGGCTCCCCTTGTGGCGGGTGGTTCCTTGTTCCTGTCCGCTC CGCCGCCGCTCGTCTGGCTTCTTCCCGGGTCTCGTTGGTCCGGGGGT TTCGCGGTGTGCCCTGCGNGGGGTTTTCTCCTCGCCCGCTTGTGCCTC CCCCGGTGTGTGCCGGGCCCTGGGTTCCGCGTCCGTTCCCCGTGTGCG GCGTCCGGCCCGTTTGTTCGGGTTGCCCTGCTGGGTGGGGCTTTTTG GTTTACNNNN</p>
>148_F	<p>GCGTATGCGCACGGNATGCTCCGTATTTATCAAACATTGGGCATAACANG CGGTTTGGACGCCGCTGCATACAAGGGACACCTGTCAAGCGGATGTTGG ATACGGCCCTTACGATTTGTATGATCTAGGGGAATTTAATCAAAAAGGAA CCGTGCGTACAAAGTACGGAACGAAAGCCGAGTAAAATCCGCTGTAAAC ACGCTTCATTCAAACGGTATACAAGTTTATGGTGATGTAGT</p>
>148_R	<p>GGGTCCAATACATCTGAATCCGATCGTAATTTTATCTGTTTCGATTTCTG TGAGATCATAACCAGATTTCTCCCGCATTATACGTTCCACATACATTTCG TTCGATCCTCCGGGACCATCGGTAATGACCGTTGCAAGTCCAGATTTTGC TTTTGTACTATCTCCTTCTCGTGTCCATCCAATCACATCTGGGTTATCGA TGTAATCACGCTGCGTACCGTACGCATAGTCTTTTCTCGCTTTCAGCAAT GGTTC AATTTTCGACTTCAATGCTGGAATTTACGTTGTGCTACCTTT TGTTCCGTACATATCGCCATAGAATACGGATGGATAACCGCCAGATCTCG TTAAAATAAATGCATAGGCTAACGGCTTCAACCAAGGCTGAACCGTTGAT TCTAGTGATTGATCCAGGTACGAAAATGATTGCAACAAAAGGCTCGAGCC GATCTTGTAATGTAAGCACCACCCGAAAAGATTTAGTATATATAGTTGGGA TGTANAAAAAAGCAACCCCAATATACTGCACGCCAACTTCGGTTACG AAGATGATAAAAATAGCCAATCTTGAGATTAACAGTACGCTCCGCACTC TCATAAAGAAAAAAGGTATACGCCTTTCGCCTACTTCTCAACGAAAAA AATTTTAAATTTCTCAATGTCTTGAAAAGATTGGATAGCAAAAACCGCGCT TTGAAAAGACATGAAAAATTAATAAGTTTTTACGAAGGATAAAGGGGAT GGTCTAAAATTGTAATTTGGGATTTTCTTTTAGGCAAATTCCTTTTAA CGCCACAAGGTTTATTTTACTTTATTCTCGACAACCTTGGGGAAAG GGGAAAGAGGGGGGAGTAAACAAAACAAAAAATTTTTATGGGATAAAAATA GCCCCGATAAAAAAACA AAAAAGGGCCGGCCGGGAGGGAGATGTGTTGGAC CGGGCCAAGATATTT</p>
>148_F	<p>GCGTATGCGCACGGNATGCTCCGTATTTATCAAACATTGGGCATAACANG</p>

	CGGTTTGGACGCCGCTGCATACAAGGGACACCTGTCAAGCGGATGTTGG ATACGGCCCTTACGATTTGTATGATCTAGGGGAATTTAATCAAAAAGGAA CCGTGCGTACAAAGTACGGAACGAAAGCCGAGTTAAAATCCGCTGTAAAC ACGCTTCATTCAAACGGTATACAAGTTTATGGTGATGTAGT
>148_R	GGGTCCAATACATCTGAATCCGATCGTAATTTTATCTGTTCGATTTCTG TGAGATCATAACCAGATTTCTCCCGCATTATACGTTCCACATACATTTCG TTCGATCCTCCGGGACCATCGGTAATGACCGTTGCAAGTCCAGATTTTGC TTTTGTACTATCTCCTTCTCGTGTCCATCCAATCACATCTGGGTTATCGA TGTAATCACGCTGCGTACCGTACGCATAGTCTTTTCTCGCTTTCAGCAAT GGTTCAATTTTCGACTTCAATGCTGGAATTTACGCTGTTGTCGTACCTTT TGTTCCGTACATATCGCCATAGAATACGGATGGATACCCGCCAGATCTCG TTAAAATAAATGCATAGGCTAACGGCTTCAACCAAGGCTGAACCGTTGAT TCTAGTGATTGATCCAGGTACGGAAATGATTGCAACAAAAGGCTCGAGCC GATCTTGTAATGTAAGCACCACCCGAAAAGATTTAGTATATATAGTTGGGA TGTANAAAAAAGCAACCCCAATATACTGCACGCCAACTTCGGTTACG AAGATGATAAAAATAGCCAATCTTGAGATTAACAGTACGCTCCGCACTC TCATAAAGAAAAAAGGTATACGCCCTTTCGCTACTTCTCAACGAAAAA AATTTTAATTTCTCAATGTCTTGAAAAGATTGGATAGCAAAACCCGCGCT TTGAAAGACATGGAAAAATTAATAAGTTTTCACGAAGGATAAAGGGGAT GGTCTAAAATTGTAAAATTGGGATTTTCTTTTAGGCAAATTCCTTTTAA CGCCACAAGGTTTATTTTACTTTATTTCATTTCTCGACAACCTGGGGGAAG GGGAAGAGGGGGGAGTAAACAAAACAAAAAATTTTTATGGGATAAAAATA GCCCCGATAAAAAAACA AAAAAGGGCCGGCCGGGAGGGAGATGTGTTGGAC CGGGCCAAGATATTT
>178_F	CCTTCTCTCTAAAAAAGGGGGGGGGGGTGGGGGGGGGG GGGNNGGGGTCAACAAAAAAGGTTTTTTTTTTTTNN
>178_R	GGGTTCGGACATCCTNATCCGATCGTAATTTTATCTGTTCGATTTCTGT GAGATATAACCAGATTTCTCCCGCATTACATGTTCCACATACATTTCGCTT CGATCCGCCAGGACCATCGGTAATGACCGTTGCAAGTCCAGATTTTGCTT TTGTACTATCCCCTTCTCGTGTCCATCCAATCACATCTGGGTTGTCCATG TAATCACACTGCGTACCGTACGCATAGGCTTTTCTCGCTTTCACCAGCGG GTCAATTTTCGACCATAAAGCTGCCGTACTCCCCGGTGAAGTCCCCCAA ATAATTCACCCCAAAAAACCCCGCGAAAATATAGCATTCCAGCCTGAACC GGGTTAAAGCTCCCATACGATGAAGGATCAACCAAAGCTTAAATGGTA GATGGTTTGAGATGGACCGGGATGGACTTGCAGCAATCCAAAAAGCTTGA ATCGAATCTTTTAGGATAGGGGAACCCGAAAAAGGAGTGGTAAAAATAAT TTCTCATGTCAATAAAACGACGCCACCGAGTTAGATGCCGATTGAAAAT TGTCGGTGAAAGAGGCACACTGAAAATAGTAACCTGATTGGGAAAAAAT CGTGTGCGTAGGTGATCTTGGTAGATGAAGTCGAAGGTAATGCGGTGTC TCTCCCTCTATGTACGGGAAAAAATTTTTCTTTTCCCATGGCCTTGAA AAGACTGGGGTATGCATCAATGGTTTGTGAAAAAATCGGAGAAAAAAG AAAAATGGTTTACCAGGGCAGTCAAAGGACCAAGACAAAAATTGTATC CTCCGAACTGTCCCTTTGGAGAATAAACACAAAAACGGCCACAAGGTTTT TATTTTTAATTTTTCGGGTTTCAACCAAAGGTTGGAGGGGGAGGGGAG ATGGGTTTTAAAAAATCAAAAAAATTTTTTTTTTAAAAATAAGCCAA ATATTAATAAATAAATAAAGGTTGGGGGGGTATGGGAGTTTTTTTTT CCGCGCGGGGATATTTTT
>17_F	CCCCAATGCCAGGCGTTTCGTCGCGACTCCGGACAAACGGCCAGGCTCTGT GACTCCCTTGACCCAAACATATTGAATACTACAATGCCTAAGGCTAGCG CCGCCAGTGCCTCCCTCGACAAATATCCGTCGAGAAAACCTTGCATCACA

	<p>GGGTGAGCAGCGTACGCCCTTCCGCTTGCACAAGCCCCCTTTGGACC AAAGAGACTTTTTACGAAGATCAACGAGAGCAGAATCAAGAGCGCTGGTG TCATCAGCTTGCCAAACCGGTCAACCAGTTTGGACGGAGACAGACTAAAC CAAAAGACCAGCCCAAAAATACAAGGTATACAGGGCAAGTCCCACGGG CTGTGTCGCTGCGGTTTTCGGCAAAAAAGGCAGCATGCCATCTCATAAG CCAGACTTCCC GCCCGGAATGGCCAGGCCCGGTCCAATCGAGACGTAA ATAAGGAGTAGAAACAAGCTTGCAAAGAGCGGGGGACCCCGTGTGTGCGA CTCTTAAGTGCTACCGCGCTTGAAGAAGGATGCCACCCCAAAATGGC CGGGCCAACTGATGACAAAATAAAACCAGAAAAGAAAAGCCTTATCTGA TAAAGGGAACTTGACCAGGAATTGCGTGAAAAGGAAGAGTTTGGCGCA GCACTACCAACAAGGGAAAAAACCCATCGCAAATTGTATGACGGACTAA TTACCTTTTATGGGGACAGACCCATTTCCACTTAAACGGATTGCCGCCCT CCCGAAGATGGTTGGGGGAGGGGTACGGATACGGAGGCTGTTTTCAAGA AAAAAACCAAAAGGGAAAAGGGGAAAAGGGGAAATTTTCAAGGGGGTG AACTGAAATATCTACCGAGCTGGGAGGGGAAAAAAAAGTAGAACCTTAGT GAAAGAAAAATATAGAAAAAACGAGGCGACACGTCTAGTGTCTGCCCC TCTTTATGGCGGCGTCGGGAGTGGTTTATAACATATAAACTTCATACTAT TCAACC</p>
<p>>17_R</p>	<p>GGGGGGCGAGACAAGAAGAAAGAGGCAGAAACGCATCGTCATATGGAAG AAATTTCCCCTAGAGAAAGGTGAAGGGTGTAGACCCCTTAAAAGGGGGG GNNANNNGNNNGGGGNNNGNNNNNGGCCCTTTAAAAAGGGGGAGNAAA NNAAAAAAGGAGGGGGGAGGAAGAAAAAAGGAAAGAGGGGGGGGGG GGAGGAGAATCCAAAAAAGAAAAAGGGGAGGGGGGGGGGGAAGGAAA AAGAAAAAGAAAGGGGAGGGGGGGGGGAGAGAGAGAAGAAGAGGGGGG GAAAGAAAAGAGGGGGGAGAAAAAGAGAGGGGGGAAAAAAGGAGGGAA GAAAAAGAGGGGGGGGAAGGGGGGGGAGGGGGGGGGGAAGAAAAAAGA GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGAGAGAAAGAAAGAAAGAAAAGAAAAA AAGGGGGAGAGGAGGGAGGGAGGGGGGGGAAGGGGAGAGGGGAAGNAG GAGGAAAANGGAAGGGGGGGGGGAGAGAAAGGAGAAAGAGANGGAGGA AAGAAGAGGGAGGAGGGGGGAAGAAAAGAAAAAAGAAAGAGGGGGGGGAG AGAAAAGAAAGAGGGGGGGGGGGAAGAAAGGAGGAGGGGGGGGGGAGGG AGGGAGGGGAAGGAGGAAAAAAGGGAAGGAAAGGGGAGAGGGAGGAG GGGGAAGAGGAAAGGGGAGGGGGGGGAGGAANAGGGGAAGGAAGNAAGA AAAGAAAAGGGGAGGAGAGAAAAAGGAGGAGAAAGGGGAAAAGAGGGA GGAGAAGGAAGAGGAAAGAGGAAAGAAAAAAGGAAGAGAGAAGGAGAAG AAGAAAGGAAAGAAAAAGGGGGAAAAAGAGAGGAAGAGGGGGGGAGGGG GGGGGGGGGAGGGAAGGGGAAGAAGGAAAGGAAGAGAAAAAGAGGGGGG GGGGGGGGGAGGGGGGGGAAAGAAGGAGAAAAAAGAGGAGAGGAAG AAAGAGAAGGGAGAGGAGGGGGGGGAGGGANGAGAGGGGGGGGAGAAGGG GGGAGGGAGGGAGGAAGAAGAGAGAAGAGAAAGAGAGAAAAAGAAG</p>

Apêndice E

Reverse_NV2A	---TTACTGCTGAACCCATACAG-----
Reverse_NV2C	TTAATATGTTTCACCGCATCTAG-----
Reverse_NV2B	-AAACAGAACCC-CCGTTTACAG-----
Foword_NV1A	----ATGATGCAATATTTTGAATGGTAC
Foword_NV1C	-AGATGCGGTGAAACATATTAAG-----
Foword_NV1B	----GTTCCAAATGACGGCCAGC-----

*

Apêndice E: Alinhamento dos iniciadores

Apêndice F

Apêndice F: Sequência consenso do gene da alfa amilase do *Bacillus koreensis* isolado no ecossistema aquático do rio Mamori e amplificado com o uso dos primers NV1A e NV2A.

>AMY_ *Bacillus Koreensis*_RM

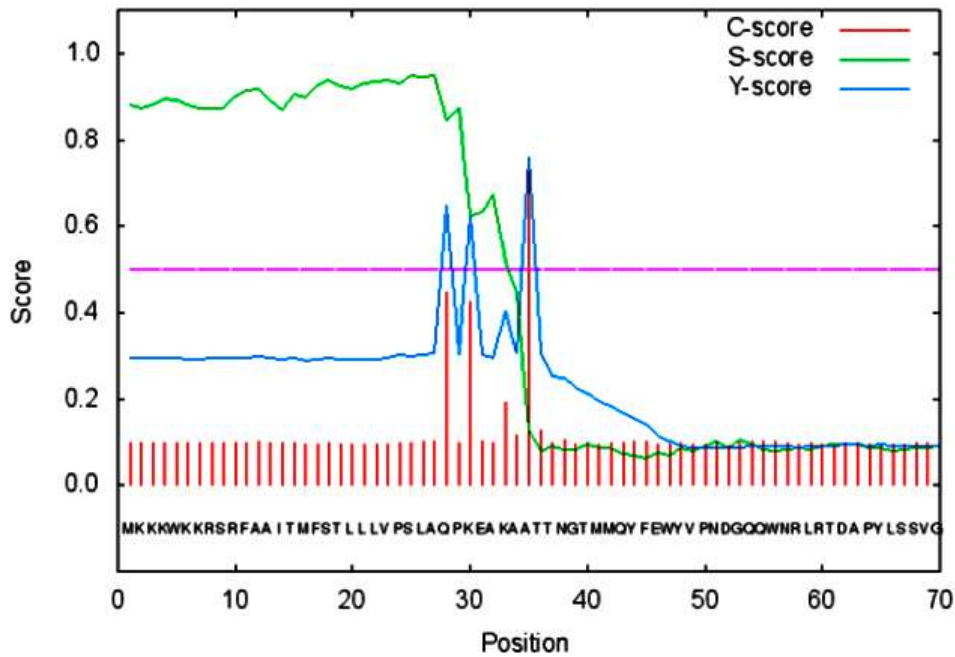
```
CTCCGATTTTATCAAAACATTGGGCATAACCAGCGGTTTGGACGCCGCTGCATACAAGGG
ACACCAGTCAAGCGGATGTTGGATACGGCCCTTACGATTTGTATGATCTAGGGGAATTTA
ATCAAAAAGGAACCGTGCGTACAAAGTACGGAACGAAAGCCGAGTTAAAATCCGCTGTTA
ATACGCTTCATTCAAACGGTATACAAGTTTATGGTGATGTAGTTATGAACCATAAAGCGG
GGGCGGACTACACGGAACCGTACCGCGGTTGAAGTAAATCCGAGCAATCGAAATCAAG
AAACGTCCGGAGAATATAACATTCAAGCGTGACCGGGTTAACTTCCCAGGACGAGGAA
CGACCTACAGTAATTTTAAATGGCAGTGGTTTCACTTTGACGGGACGGACTGGGATCAAT
CGAGAAGCTTGAGTCGAATCTTTAAGTTTAGGGGAACCGGAAAGGCGTGGGATTGGGAGG
TATCGTCAGAAAACGGAAATTACGATTATTTAATGTATGCAGATATTGGATTACGATCAT
CCTGGACGTTGTAAACGAAATGAAAAATGGGGCGTATGGTATGCCAATGAAGTGGGCTT
AGATGGATATCGCCTAGATGCGGTGAAACATATTAAGTTTTTCATTCTTAAAAAGACTGGGT
GGATAATGCGCGTGCAGCCACTGGAAAAGAAATGTTTACGGTAGGAGAGTACTGGGCAGA
ATGACCTTG-GTGCCTCAACAATACTAGCAAAGGTTAATTACAATCAGTCGCTATT
TGATGCACCGCTTCACTACAATTTTTATGCGGCATCAACGGGTGGCGGGTATTATGACAT
GCGAAATATTTTAAATAATACGCTTGTGCTTCTAATCCAACAAAAGCGGTAACGCTCGT
TGAGAACCATGATACACAGCCGGCCAATCACTAGAATCAACGGTTCAGCCTTGGTTTAA
GCCGTTAGCCTATGCGTTTATTTTAAACGAGATCTGGCGGGTATCCATCCGTATTCTATGG
CGATATGTACGGAACAAAAGGTACGACAACCGGAAATCCAGCATTGAAGTCGAAAAT
TGAACCATTGCTGAAAGCGAGAAAAGACTATGCGTACGGTACGCAGCGTGATTACATCGA
CAACCCAGATGTGATTGGATGGACACGAGAAGGGGATAGTACAAAAGCAAAATCTGGACT
TGCAACGGTCAATTACCGTGGTCTGCGGATCGAAGCGAATGTATGTGGGAACGTCTAA
TGCGGGAGAAATCTGGTATGATCTCACAGGAAATCGAACAGATAAAAATTACGATCG
```

Apêndice G

Apêndice G: Local do peptídeo sinal na sequência consenso traduzida para a sequência de aminoácidos do *Bacillus koreensis* isolados do rio Mamori, Amazônia.

```
# SignalP-4.1 gram+ predictions  
>Seq_conse_traduz_aa_Bk_Amaz
```

SignalP-4.1 prediction (gram+ networks): Seq_conse_traduz_aa_Bk_Amaz



```
# Measure Position Value Cutoff signal peptide?  
max. C 35 0.727  
max. Y 35 0.758  
max. S 25 0.950  
mean S 1-34 0.857  
D 1-34 0.796 0.450 YES  
Name=Seq_conse_traduz_aa_Bk_Amaz SP='YES' Cleavage site between pos. 34 and 35: AKA-A
```

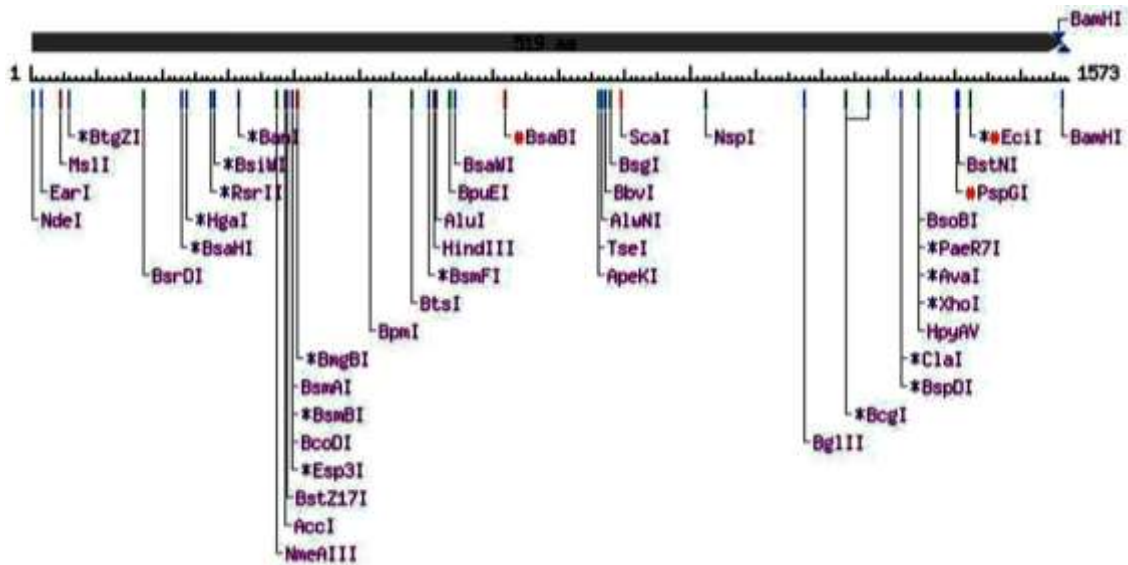

Apêndice H

Apêndice H: Sequência do gene consenso final do *Bacillus koreensis* isolado do rio Mamori para a síntese química.

Identificação	Sequência de DNA
<p>Sequência do gene <i>Amy</i></p> <p>Sítios de restrição</p> <p>NdeI (1) - CATATG</p> <p>BamHI (2) - GGATCCA</p> <p>Peptídeo sinal GCGGCT</p> <p>Códon de iniciação - ATG</p> <p>Stop códon - TAA</p>	<pre> > 5'GACATATGAAAAAGAAGTGAAGAAGAGAAGTCGCTTTGCGGCCATTACGATGTTTT CAACCTTATTATTAGTGCCATCGCTTGCACAGCCAAAAGAGGCAAAGGCGGCTACAACA AATGGAACGATGATGCAATATTTGAATGGTACGTTCCAAATGACGCCAGCAATGGA ACCGATTGCGCACCGATGCTCCGTATTTATCAAGCGTTGGCATAACAGCGGTTTGGACG CCGCTGCATACAAAAGGAACAAGTCAAGCAGATGTTGGATACGGACCGTACGATTTGT ACGATCTAGGGGAATTTAATCAAAAAGCACCCTGCGCACAAAAGTACGGAACGAAAGC CGAGTTAAAATCCCGCTGTTAATACGCTTCATTCAAACGGTATACAGGTTTATGGAGACG TGGTTATGAACCATAAAGCGGGGCGAGACTACCGAAAACGTAACGGCGGTTGAAGT AAATCCGAGCAATCGAAATCAAGAAACGCTGGAGAATATAACATTCAAGCGTGGACG GGTTTTAATCTCCGGGTACGAGGAACGACGTACAGTAATTTAAATGGCAGTGGTTTCA CTTTGACGGGACGGACTGGGATCAATCGAGAAGCTTGAGTCGAATCTTTAAGTTTAGGG GAACCGAAAAGGCGTGGGATTGGGAGGTATCGTCAGAAAACGGAAATTACGATTATTT GATGTATGCAGATATTGATTACGATCACCCCTGACGTTGTAACGAAATGAAAAATGGG GCGTATGGTACGCAATGAAGTTGGTTTGGATGGATACCGCCTAGATGCGGTGAAACAT ATTAAGTTTTCATTCTTAAAAGACTGGGTGGATAATGCGCGTGCAGCCACTGAAAAAGA AATGTTACGGTAGGAGAGTACTGGCAGAATGACCTTGGTGCCTCAACAATATCTAG CAAAGTTAATTACAATCAGTCGCTATTTGATGCACCGCTTACTACAATTTTATGCGG CATCAACGGGTGGCGGTATTATGACATGCGAAATTTTTAAATAATCGCTTGTGCT TCTAATCCAACAAAAGCGGTAACGCTCGTTGAGAACCATGATACACAGCCGGTCAATC ATTAGAAATCAACGGTTCAGCCTTGGTTTAAAGCCGTAGCCTATGCGTTTATTTAACGAG ATCTGGCGGGTATCCATCCGTATTCTATGGCGATATGTACGGAACAAAAGGTACGACAA CACGCGAAATTCAGCATTGAAGTCGAAAATTGAACCGTTGCTAAAAGCGAGAAAAGA CTATGCGTATGGTACGCAACGTGATTACATCGATAATCCAGATGTGATTGGATGGACTC GAGAAGGAGATAGTACAAAAGCAAATCTGGACTTGCAACGGTCAATTACCGACGGTCC TGGCGGATCGAAGCGAATGTATGTGGGAACATCTAATGCGGGAGAAGTCTGGTATGAC CTCACAGGAAATCGAACAGATAAAATTACGATTGGATCAGATGGTTATGCGACGTTTCC TGTAACGGGGTCTGTTTCTGTATGGGTTTCAGCAGTAAAGGATCCAC3' </pre>

Apêndice I

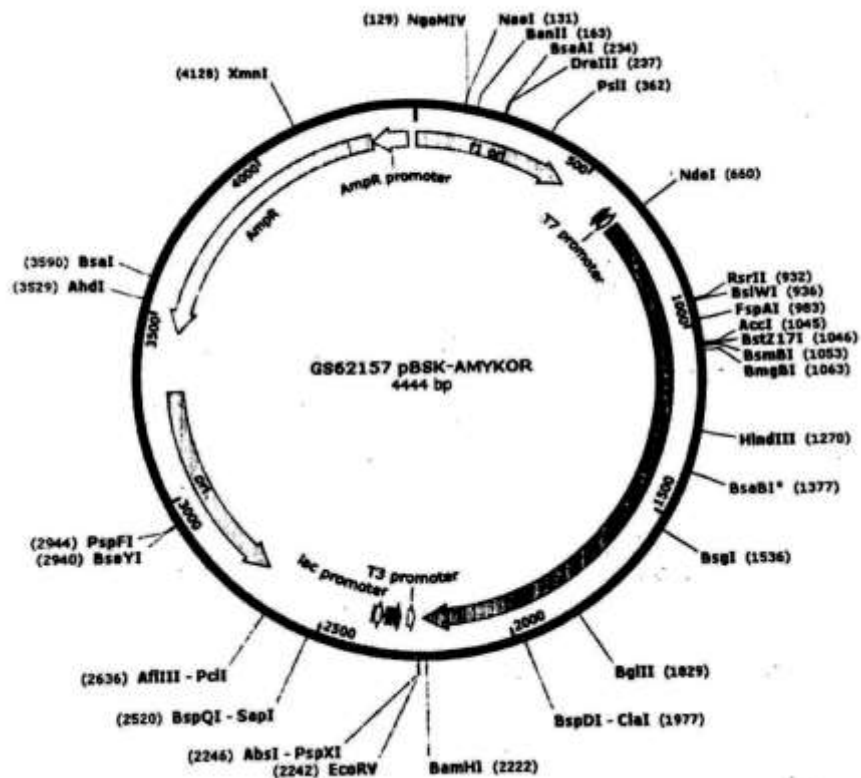
Apêndice I: Sítios de restrição na sequência consenso final do gene *Amy* do *Bacillus koreensis* isolado do rio Mamori.



Apêndice J

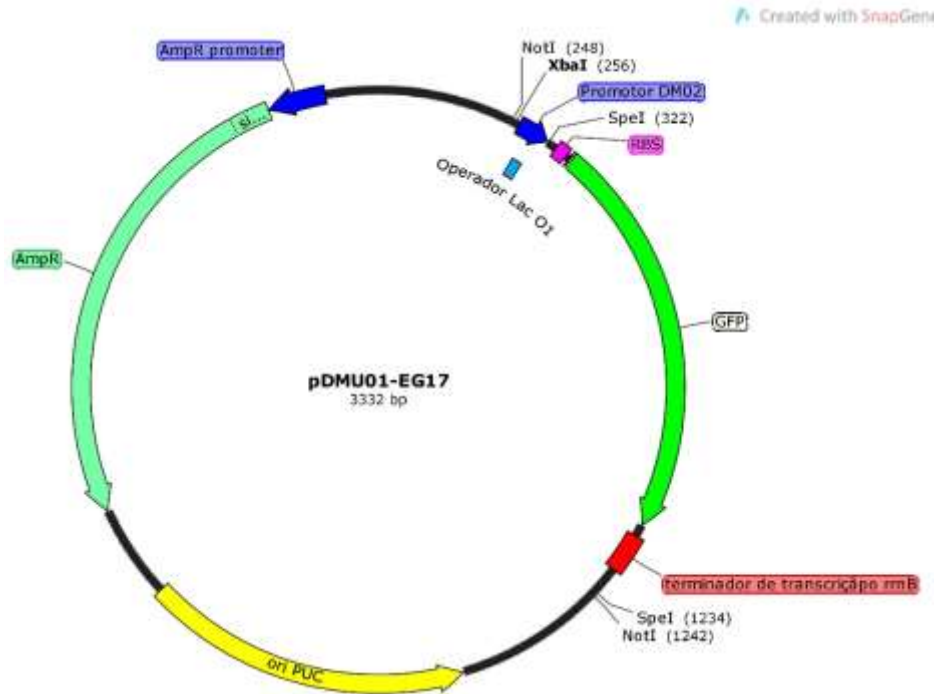
Apêndice J: Mapa do vetor pBSK com o gene sintético AMYKOR do *Bacillus koreensis* isolado do rio Mamori e o sítio de restrição das enzimas NdeI e BamHI.

Sequence chromatogram will be send by email.

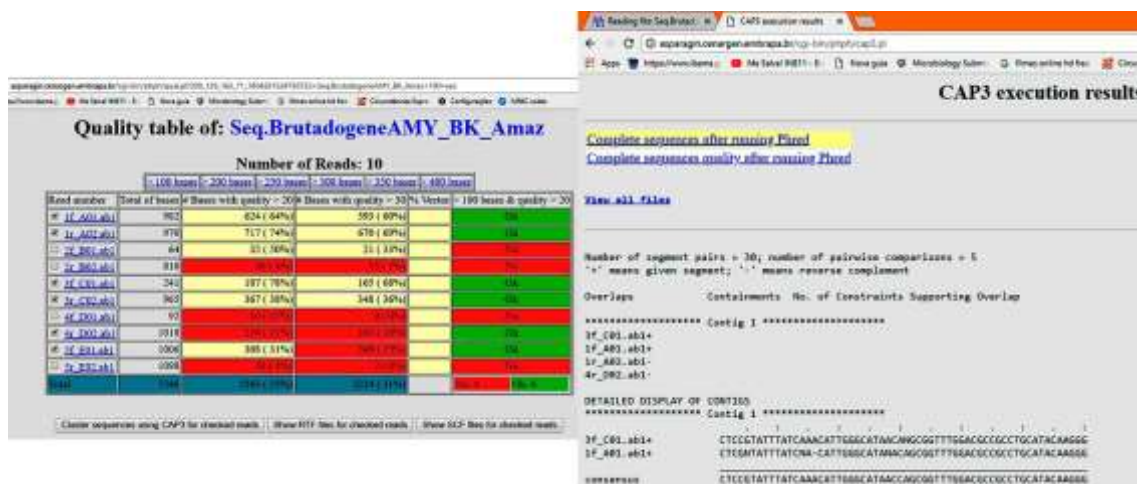


Apêndice K

Apêndice K: Mapa do vetor pDMU01-GFP com modificações e cedido pelo Prof. Dr. Spartaco Astolfi Filho para a expressão genética em DH5α F'Iq.

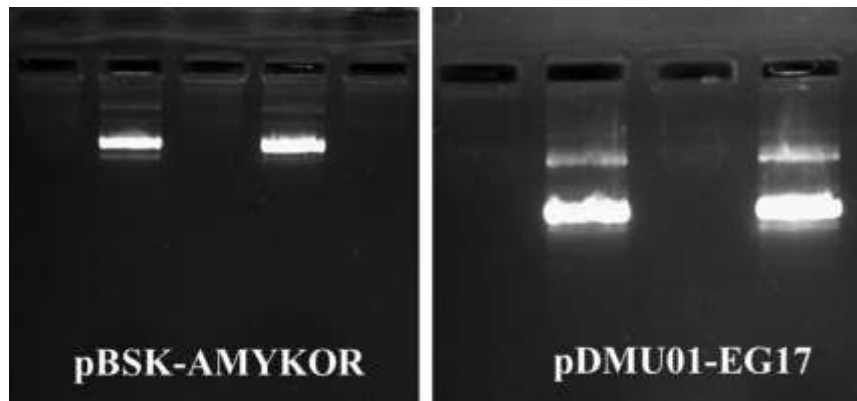


Apêndice L



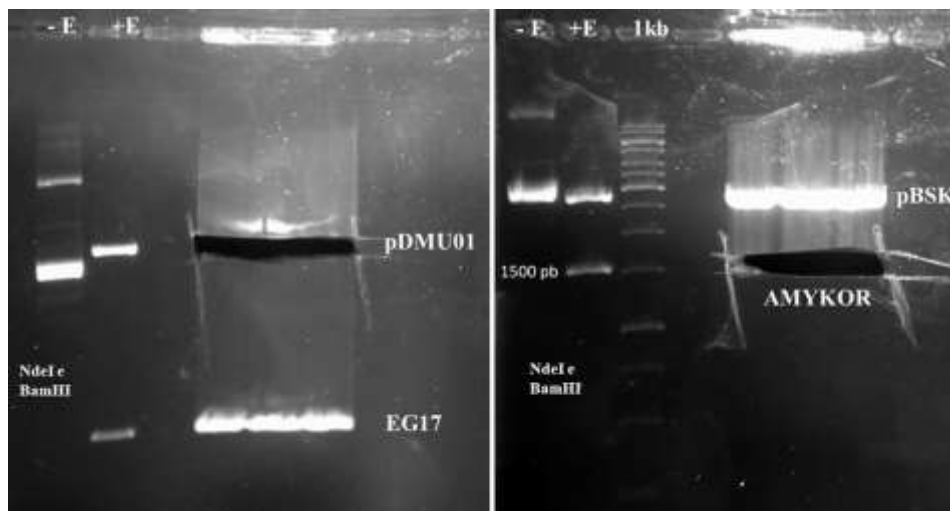
Apêndice L: Figura da análise do programa PHRED das sequências do gene AMY dos isolados dos rios Negro, Solimões e Mamori, além da, predição da sequência consenso do gene Amy do *Bacillus koreensis* pelo programa CAP3.

Apêndice M



Apêndice M: Perfil eletroforético da minipreparação do vetor pMDU01-AMYKO

Apêndice N



Apêndice N: Perfil eletroforético da digestão dos vetores pMDU01-EG17 (direita) e o pBSK-AMYKOR (esquerda). A excisão do vetor pDMU01 e do gene AMYKOR