



PRODUÇÃO DE α -AMILASE POR *Bacillus amyloliquefaciens* VR002 UTILIZANDO RESÍDUO AGROINDUSTRIAL COMO FONTE DE CARBONO

Yasmin Bitencourt Alves¹
Carlos Eduardo de Souza Teodoro²

Reciclagem e Gerenciamento de Resíduos

Resumo

O Brasil é um país que apresenta uma economia voltada para atividade da agroindústria, produzindo quantidades significativas de resíduos do processamento industrial de produtos, animais, e de atividades agrícolas, onde, muitas vezes, não têm uma aplicação direta. Os microrganismos conseguem reaproveitar esses subprodutos para produzir outras substâncias, como as enzimas, que são muito procuradas e utilizadas em diferentes setores industriais, com alto valor agregado. As amilases são enzimas responsáveis por fazer a quebra da molécula de amido, sendo que as α -amilases são consideradas uma das enzimas industriais mais importantes e muito utilizada em diversos setores. O objetivo deste trabalho foi otimizar o cultivo da bactéria *Bacillus amyloliquefaciens* VR002 para produção de α -amilase, utilizando resíduos agroindustriais como fonte de carbono. Neste sentido, foram avaliados diferentes resíduos agroindustriais, tempo de incubação, concentração da fonte de carbono e pH inicial do meio de cultivo, visando obter as condições ótimas de cultivo para obtenção máxima de α -amilase. Foi determinado o tempo de 24h como melhor para a incubação do microrganismo, sendo que o bagaço da laranja apresentou maior produção da enzima α -amilase, em relação aos demais resíduos agroindustriais selecionados. A concentração ideal foi de 1% e o pH inicial ótimo foi de 7,0.

Palavras-chave: Endoamilases; Biotecnologia de Microrganismos; Bagaço de Laranja; Otimização de Meio de Cultura.

¹ Aluna do Curso de mestrado em Tecnologia Ambiental, Universidade Federal Fluminense – UFF – Volta Redonda/RJ; ybitencourt@id.uff.br.

² Prof. Dr. da Universidade Federal Fluminense – UFF – Volta Redonda/RJ; Programa de Pós-graduação em Tecnologia Ambiental; carlostedoro@id.uff.br.



INTRODUÇÃO

Existem preocupações ambientais, sociais e econômicas relacionadas à gestão dos resíduos agrícolas produzidos diariamente. A grande quantidade desses resíduos evidencia a necessidade de tratamento adequado para seu descarte, devido ao potencial de poluição que apresentam para os recursos hídricos e o solo (ANDRADE et al, 2021).

O Brasil, sendo um país com uma economia fortemente baseada na agricultura, gera quantidades significativas de resíduos da agroindústria. Esses resíduos incluem subprodutos resultantes do processamento industrial de produtos agrícolas e animais, bem como resíduos provenientes de atividades agrícolas. Embora muitas vezes esses resíduos não tenham uma aplicação direta e sejam considerados sem valor econômico, eles contêm compostos como açúcares, fibras, proteínas e minerais, que podem ser usados como fontes alternativas de nutrientes em substituição a fontes sintéticas em processos biotecnológicos (SANTOS et al, 2018).

Os microrganismos possuem a habilidade de utilizar esses resíduos e transformá-los em produtos de grande importância para a indústria. Um exemplo são as enzimas, que estão sendo cada vez mais aplicadas em diversos setores industriais. Essa crescente aplicação se deve principalmente às vantagens operacionais que essas enzimas oferecem, como a capacidade de reação específica e alta eficiência de conversão (FREITAS et al., 2018). Em larga escala, elas têm sido utilizadas na indústria têxtil (celulases), detergentes (proteases e lipases), alimentos e bebidas (amilases, pectinases, proteases e celulases), couro (proteases e lipases) e na alimentação de ruminantes (fibrolíticas) (DENTI et al, 2022).

As amilases são enzimas responsáveis por quebrar os amidos, que são polissacarídeos e açúcares complexos. Sua principal função é converter esses polissacarídeos em açúcares menores, como dextrinas, maltose e moléculas de glicose. As enzimas amiloíticas α e β desempenham um papel crucial nesse processo, transformando o amido em açúcares fermentáveis (BAMFORTH, 2017).



As α -amilases são consideradas uma das enzimas industriais mais importantes, sendo amplamente utilizadas em diversas indústrias, como a produção de maltodextrinas, panificação, álcool, detergentes, têxteis e na fabricação de cerveja (OLIVEIRA, 2017). Essas enzimas desempenham o papel de catalisadoras de reações, atuando nas macromoléculas de amido, como a amilose (cadeia linear de amido dos grãos), assim como na amilopectina (cadeia ramificada dos grãos), degradando-as em açúcares menores (SAMMARTINO, 2015).

Entre as α -amilases bacterianas mais relevantes na indústria, destacam-se aquelas secretadas pelo gênero *Bacillus*. Dentro desse gênero, as espécies mais frequentemente utilizadas na produção comercial de α -amilase são *B. amyloliquefaciens*, *B. stearothermophilus*, *B. subtilis* e *B. licheniformis* (CARVALHO, 2008).

A produção industrial de enzimas constantemente enfrenta limitações devido aos custos dos substratos usados no cultivo dos microrganismos. Estima-se que cerca de 30 a 40% dos custos envolvidos na produção estejam relacionados ao meio de cultura utilizado para o crescimento dos microrganismos. Dessa forma, é de suma importância buscar a otimização desse processo visando a redução dos custos de produção, e uma alternativa economicamente viável, é aproveitar resíduos agroindustriais (CARVALHO 2008).

O objetivo deste trabalho foi otimizar o processo de produção da α -amilase secretada por *Bacillus amyloliquefaciens* VR002, testando diferentes resíduos como fonte de carbono.

METODOLOGIA

O presente trabalho foi desenvolvido no laboratório de Biotecnologia da Escola de Engenharia Industrial Metalúrgica de Volta Redonda da Universidade Federal Fluminense (EEIMVR - UFF).

Microrganismo e ensaios analíticos

O microrganismo utilizado para o estudo foi a bactéria *Bacillus amyloliquefaciens* VR002 previamente isolada de amostras de solo coletadas na cidade de Volta Redonda – RJ.

Meio de cultura e condições de crescimento inicial



EXTREMOS CLIMÁTICOS: **IMPACTOS ATUAIS** E RISCOS FUTUROS

Para produção de α -amilase foi utilizado o meio de cultura contendo a seguinte composição: 4g/L KH_2PO_4 , 4g/L Na_2HPO_4 , 0,2g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,001g/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,004g/L $\text{FeSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e H_2O destilada para 1L.

As investigações iniciais foram conduzidas usando a metodologia de fator único por vez para facilitar melhorias incrementais. Neste sentido, o pH do meio, a concentração das fontes de carbono e o tempo ideal de cultivo foram ajustados de acordo com os testes realizados e os resultados obtidos.

As fontes de carbono passaram por processo de secagem e depois foram moídos e peneirados para diminuir o tamanho das partículas a serem colocadas nas amostras, sendo constituídas por frascos de Erlenmeyer de 250mL contendo 50mL do meio de cultura, 1% das fontes de carbono, com pH inicial ajustado para 7,0. Os frascos contendo o meio de cultura adicionado das fontes de carbono foram esterilizados em 121 C° durante 15 minutos, sendo posteriormente inoculadas com cultura de *Bacillus amyloliquefaciens* VR002. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Determinação da atividade enzimática

Para a remoção das células, a cultura bacteriana foi centrifugada a 10.000rpm por 10 minutos a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante livre de células (extrato bruto enzimático) foi utilizado para a dosagem de atividade enzimática.

A atividade de α -amilase foi determinada incubando-se 0,25 mL de extrato bruto enzimático e 0,5 mL de solução de amido na concentração de 1% e incubadas a 45 °C por 30 minutos. Após este período a reação foi paralisada pela adição de 0,75 mL de ácido dinitrossalicílico, e, em seguida, aquecida em banho-maria a 100°C por 5 minutos. As amostras resultantes foram resfriadas à temperatura ambiente e sendo adicionado 5,5 mL de água destilada. A coloração desenvolvida foi aferida em espectrofotômetro, utilizando comprimento de onda de 540 nm. A metodologia utilizada foi aplicada de acordo com Coca (2019) com modificações.

Para a quantificação da atividade enzimática foi elaborado uma curva padrão com concentrações conhecidas de glicose, construída medindo-se a absorbância da solução em espectrofotômetro



utilizando comprimento de onda de 540 nm.

Resíduos agroindustriais como fonte de carbono para produção de α -amilase

A determinação da melhor fonte de carbono foi realizada incubando-se *Bacillus amyloliquefaciens* VR002 em meio de cultura contendo 1% dos seguintes resíduos: farelo de milho, farelo de soja. Bagaço de malte, casca de aipim, casca de batata e bagaço de laranja. As amostras foram retiradas nos intervalos de 6, 12, 24, 36 e 48h, a fim de identificar o melhor tempo de incubação da bactéria para a produção da enzima.

Efeito da concentração de resíduo como fonte de carbono na produção de α -amilase

Com o melhor resíduo determinado, foram realizados testes para identificar a concentração ideal para a produção da enzima. A bactéria foi cultivada nas concentrações de 0,5%, 1% e 2% sob temperatura de 35°C e com agitação de 150 rpm durante 24h.

Efeito do pH inicial do meio de cultura na produção de α -amilase

A bactéria foi cultivada em meio de cultura com os valores iniciais de pH 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0 para verificar o efeito do pH inicial do meio de cultura na produção da enzima amilase. Os valores de pH do meio foram ajustados com HCl ou NaOH (1 mol.L⁻¹) antes da esterilização.

Análise estatística

Os resultados obtidos nos experimentos foram analisados pelo programa estatístico SISVAR com análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey com grau de significância de 5% em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial, com quatro repetições.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A bactéria *B. amyloliquefaciens* VR002 foi cultivada em meio de cultura contendo diferentes resíduos agroindustriais como substrato, na concentração de 1% e nos tempos de 6, 12, 24, 36 e 48 h.

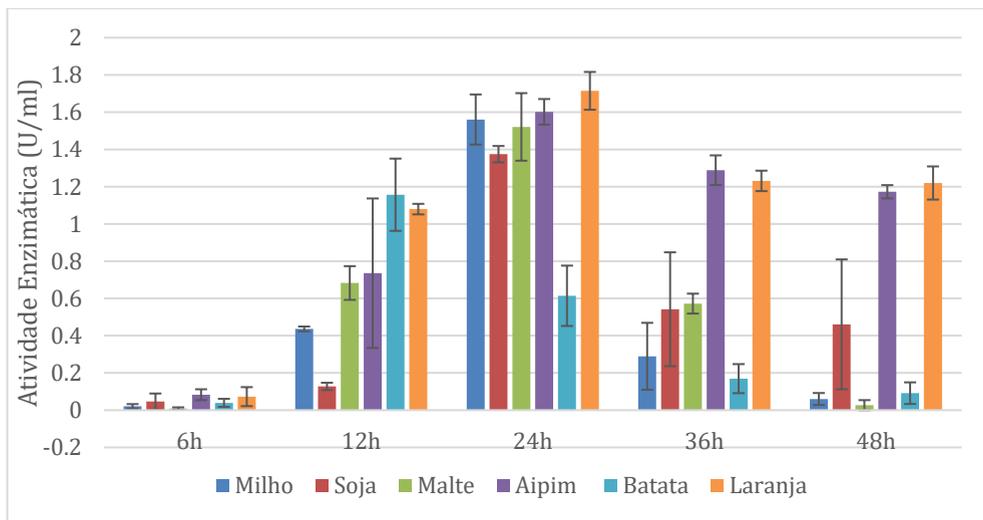


EXTREMOS CLIMÁTICOS: **IMPACTOS ATUAIS** E RISCOS FUTUROS

As condições de cultivo foram 35 °C, pH 7,0 e 150 rpm. Os resultados obtidos foram apresentados na figura 1 e a análise de variância apresentada na tabela 1.

Essa bactéria é muito utilizada em estudos envolvendo produção de enzimas. Bones (2021) avaliou a produção de amilase por *Bacillus amyloliquefaciens*, concluindo que a utilização dessa bactéria para a produção de amilase é uma alternativa viável, considerando que a bactéria produzida degradou 90% do substrato amido.

Figura 1: Produção da enzima α -amilase por *B. amyloliquefaciens* VR002 cultivada em diferentes resíduos agroindustriais. As barras representam o desvio.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2024.

Tabela 1: Análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey com grau de significância de 5%, realizado no programa Sisvar.



Média harmônica do número de repetições (r): 3
Erro padrão: 0,0723478039928828

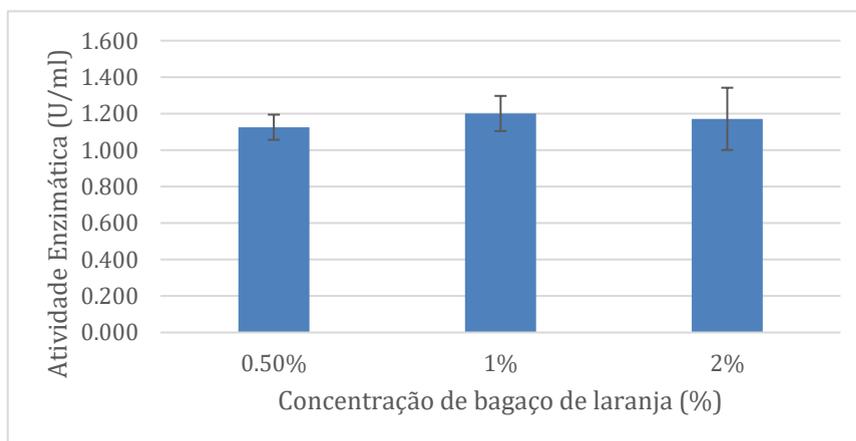
Tratamentos	Médias	Resultados do teste
BATATA	0.614247	a1
SOJA	1.374547	a2
MALTE	1.520940	a2
MILHO	1.560627	a2
AIPIM	1.601973	a2
LARANJA	1.714683	a2

Fonte: Elaborado pelo autor, 2024.

Considerando a Figura 1 pode-se observar que o tempo de cultivo influenciou diretamente na produção de α -amilase, todos os resíduos apresentaram melhor produção no tempo de 24h, definido-se o tempo de 24h como ideal para produção da enzima. De acordo com os resultados obtidos na análise de variância e na comparação de médias pode-se observar que entre os resíduos, somente a batata obteve valor estatisticamente diferentes dos demais, com resultado mais baixo. Dessa forma, o resíduo escolhido foi o bagaço de laranja, pelo fato dele sempre manter uma produção alta em todas as dosagens. Coca (2019) avaliou o desempenho da *B. amyloliquefaciens* para produção de α -amilase, testando diferentes parametros como tempo de cultivo, pH, temperatura, volume de inóculo, onde também obteve o valor ótimo de cultivo de 24h, com ph inicial ideal de 6,5, a 30°C e inóculo a 2%

Uma vez que o bagaço de laranja foi identificado como melhor fonte de carbono, foram testadas as concentrações de 0,5, 1, 2% para avaliar a melhor concentração para produção da enzima. Os resultados são representados na Figura 2 e foram analisados utilizando a ANOVA e comparação de médias pelo teste de Tuckey (5%), apresentados na tabela 2.

Figura 2: Produção de α -amilase por *B. amyloliquefaciens* VR002 cultivada em meio de cultura contendo bagaço de laranja como fonte de carbono em diferentes concentrações. As barras representam o desvio.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2024.

Tabela 2: Análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey com grau de significância de 5%, realizado no programa Sisvar.

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
0,5	1.124800	a1
2	1.171000	a1
1	1.200600	a1

Fonte: Elaborado pelo autor, 2024.

De acordo com os resultados obtidos na análise de variância e na comparação de médias pode-se observar que a variação das concentrações de fonte de carbono não influenciou na produção de α -amilase. Não foi observada diferença estatística entre as concentrações, sendo mantida a concentração de 1%.

Arifeen et al. (2024) encontraram resultados diferentes quando buscaram avaliar a biossíntese e otimização de amilase de *Bacillus sp.* isolado de amostras de solo utilizando resíduos agroindustriais como substrato, foram avaliados vários parâmetros, entre eles, a concentração de

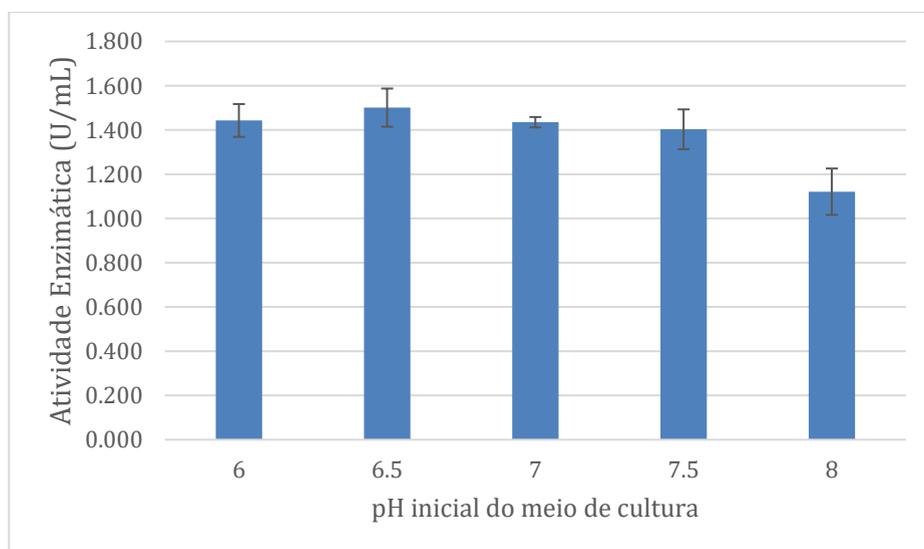


EXTREMOS CLIMÁTICOS: **IMPACTOS ATUAIS** E RISCOS FUTUROS

substrato, onde obtiveram que a maior atividade de amilase ocorreu em 2% de concentração de substrato.

Para determinação do pH ótimo para produção de α -amilase, foram testados os valores de pH: 6, 6,5, 7, 7,5 e 8. Os resultados estão representados na figura 3 e a análise de variância na tabela 3.

Figura 3: Produção de α -amilase por *B. amyloliquefaciens* VR002 cultivada em meio de cultura contendo 1% de bagaço de laranja, em diferentes valores iniciais de pH. As barras representam o desvio.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2024.

Tabela 3: análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey com grau de significância de 5%, realizado no programa Sisvar.

Treatamentos	Médias	Resultados do teste
E	1.122500	a1
D	1.405000	a2
C	1.437500	a2
A	1.442500	a2
B	1.502500	a2

Fonte: Elaborado pelo autor, 2024.



De acordo com os resultados obtidos na análise de variância e na comparação de médias pelo teste de Tukey 5% não são observadas diferenças estatísticas entre os pH 6 a 7,5, obtendo produção da enzima de forma eficiente nessa faixa. Teodoro e Martins (2000) avaliaram a produção de amilase por *Bacillus sp.*, onde identificaram o pH inicial ótimo de 7,0. Já Cordeiro et al. (2002), no estudo sobre a produção e propriedades da α -amilase de *bacillus sp.*, identificou como pH ótimo o valor de 7,5. Conforme os resultados obtidos, foi escolhido o pH de valor 7 como melhor para produção de α -amilase por *B. amyloliquefaciens* VR002.

CONCLUSÕES

Os resultados indicam que as otimizações das condições de cultivo influenciaram positivamente na produção de α -amilase por bactéria *Bacillus amyloliquefaciens* VR002.

As condições ótimas de cultivo encontradas foram: 24h de incubação da bactéria, 1% de bagaço de laranja como fonte de carbono e pH do meio inicial do meio de cultura no valor de 7,0. Tais resultados demonstram importantes parâmetros para a continuidade da pesquisa, incluindo a otimização da temperatura de incubação e a agitação do meio de cultura, a fim de maximizar a produção da enzima e fazer sua purificação.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, P.M.; BRITO, N.N. Resíduos agroindustriais aplicados como material filtrante ao pós-tratamento de água residuária da produção de cosméticos. Revista Em Agronegócio E Meio Ambiente, v. 14, ed. 4, p. 1013-1024, jul. 2021.

ARIFEEN, S. et al. Biossíntese e otimização de amilase de *bacillus sp.* isolado de amostras de solo usando resíduos agroindustriais como substrato. Ecologia aplicada e pesquisa ambiental, v. 22, n. 4, p. 2927-2940, 2024.

BAMFORTH, C.W. Progress in brewing science and beer production. Annu Rev Chem Biomol Eng. v.8, p. 161-176, 2017.



BONES, U. A. Produção de amilase por *Bacillus sp.* utilizando resíduos agroindustriais. 2021. 67 f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Biotecnologia) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2021.

CARVALHO, R.V.; CORRÊA, T.L.R.; SILVA, J.C.M.; VIANA, A.P.; MARTINS, M.L.L. Optimization of culture conditions for the production of amylases by thermophilic bacillus sp. and hydrolysis of starches by the action of the enzymes. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 28, n. 2, p.380- 386, 2008.

COCA, B.C.C. Otimização da produção e caracterização de α -amilase produzida por *Bacillus amyloliquefaciens*. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Ambiental) – Universidade Federal Fluminense, Volta Redonda, 2019.

CORDEIRO, C. A. M.; MARTINS, M. L. L.; LUCIANO, A. B. Production and properties of alfa-amylase from thermophilic *Bacillus sp.* *Brazilian Journal of Microbiology*, [Internet], São Paulo, v.33, n. 1, p. 57-61, 2002.

DENTI, A.; POLINA, C.; VANZ, J.; BERNARDI, J.; RAISEL, L.; PALAVICINI, S.; FEIDEN, T.; BACKES, G. Enzimas e suas aplicações com ênfase na indústria de alimentos. *Revista Perspectiva*, v. 46, n. 175, p. 51-68, 2022.

FREITAS, P.R.; SOUTO, C.N.; ULHOA, C.J.; NASSAR, R.F.; PADUA, D.M.C.; MOTA, V.S. Efeito de enzimas amilolíticas de *Aspergillus Awamori* sobre a digestão do amido em bovinos. *Ciência Agrícola* v.16, n. 3 , p. 27-34, 2018.

OLIVEIRA, GAV de; SILVA, JMSF da. Equilíbrio químico e cinética enzimática da interação de α -amilase com compostos fenólicos encontrados em cerveja. *Química Nova*, [Internet], São Paulo, v. 40, n. 7, p. 726-732, ago. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170058>. Acesso em: 05 de set. 2024

SANTOS, P.S.; SOLIDADE, L.S.; SOUZA, J.G.B.; SAMPAIO, G.; JUNIOR, A.C.R.B; ASSIS,



F.G.V.; LEAL, P.L. Fermentação em estado sólido em resíduos agroindustriais para a produção de enzimas: uma revisão sistemática. *The Journal of Engineering and Exact Sciences*, v.4, n. 2, p. 181-188, 2018.

SAMMARTINO, M. Enzymes in brewing. *Master Brewers Association of the Americas*. v.52, n.3, p.156-164, 2015.

TEODORO, Carlos Eduardo de Souza; MARTINS, Meire Lelis Leal. Culture conditions for the production of thermostable amylase by *Bacillus sp.* *Brazilian Journal of Microbiology*, v.31, n.4, p.298-302, 2000.