

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS - UFAM
PROGRAMA MULTIINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA - PPGBIOTEC

Produção e caracterização da α -amilase produzida por *Priestia koreensis* em
Escherichia coli

Manaus
2026

LÍVIA MIYUKI TAKAHASHI

Produção e caracterização da α -amilase produzida por *Priestia koreensis* em
Escherichia coli no sistema operon lac

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa
Multi-Institucional de Pós-graduação em Biotecnologia
da Universidade Federal do Amazonas, como requisito
para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Dr. Edson Júnior do Carmo

Co-orientador: Dr. Spartaco Astolfi Filho

MANAUS

2026

Ficha Catalográfica

Elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

T136p Takahashi, Livia Miyuki
 Produção e caracterização da -amilase produzida por *Priestia koreensis* em
 Escherichia coli / Livia Miyuki Takahashi. - 2026.
 85 f. : il., color. ; 31 cm.

 Orientador(a): Edson Junior do Carmo. Coorientador(a): Spartaco Astolfi
 Filho.
 Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Amazonas, Programa de
 Pós-Graduação em Biotecnologia, Manaus, 2026.

 1. -amilase. 2. *Priestia koreensis*. 3. *Escherichia coli*. 4. expressão
 heteróloga. 5. operon *lac*. I. Carmo, Edson Junior do. II. Astolfi Filho,
 Spartaco. III. Universidade Federal do Amazonas. Programa de
 Pós-Graduação em Biotecnologia. IV. Título

LÍVIA MIYUKI TAKAHASHI

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA α -AMILASE PRODUZIDA POR *PRIESTIA*
KOREENSIS EM *ESCHERICHIA COLI*

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Aprovada em: 21/07/2026

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Edson Junior do Carmo
Presidente
Universidade Federal do Amazonas

Prof. Dr. Lanna Lobo de Araújo
Membro Titular
Universidade Federal do Amazonas

Prof. Dr. Edmar Vaz de Andrade
Membro Titular
Universidade Federal do Amazonas

AGRADECIMENTOS

A Deus, a quem agradeço todos os dias.

A meus pais por me permitirem seguir os meus sonhos.

Bachan e dichan (in memorian), que cruzaram continentes para chegar neste país atrás de uma vida melhor. Nada foi em vão.

Aos meus orientadores, Prof. Dr. Spartaco Astolfi-Filho e Prof. Dr. Edson Júnior do Carmo por terem me guiado por todo esse caminho. Obrigada pelas dúvidas tiradas, conselhos de laboratório e contribuições.

Ao Gustavo por me apoiar em todos os momentos, que eu seja agraciada por você até o fim.

Aos membros do CAM, Dina, Paulo, Júlio, Elza, Samanta, Diego e Michele que me ajudaram, tiraram infinitas dúvidas e me aconselharam em todos os momentos.

Aos meus amigos do Núcleo de Biologia Sintética do Amazonas, que sempre fazem o dia a dia se tornarem mais leves e divertidos. Cout, Taynah, Anna e Letícia, que possamos ver o NUSY se tornar tudo aquilo que trabalhamos e sonhamos para construir.

Aos meus amigos, Augusto, Patrik, Fábio, Julianne e Vinícius. Obrigada pelos anos de amizade. Que sejam eternos.

A CAPES por disponibilizar os recursos para que este trabalho pudesse ser feito.

A UFAM por fornecer o local de trabalho e material para o trabalho.

“We’ll live through the long, long days, and through the long, long nights. We’ll patiently endure the trials that fate send our ways.”

- Ryusuke Hamaguchi.

RESUMO

As α -amilases são enzimas amplamente usadas nas indústrias têxtil, farmacêuticas e biocombustíveis devido a capacidade de hidrolisar as ligações α -1,4 do amido. Para atender as demandas industriais, é requerida uma produção em alta escala e neste contexto a expressão heteróloga se tornou uma alternativa para aumento da produção enzimática e com o auxílio da Tecnologia do DNA Recombinante, as enzimas recombinantes vem ganhando protagonismo. Este trabalho teve como objetivo a produção e caracterização físico-química da α -amilase - *Priestia koreensis* clonada em *Escherichia coli* JM110, utilizando o vetor de expressão pDMU 02 sob o controle do operon *lac*. A produção da α -amilase foi confirmada por formação de halos de degradação do amido e realização de ensaios de atividade enzimática pelo método iodométrico de FUWA. A concentração de 0,3 mM de IPTG proporcionou maior produção enzimática após 10 h de cultivo. A caracterização físico-química revelou temperatura ótima de 50° C, pH ótimo igual a 6 e termoestabilidade, mantendo elevada atividade amilolítica por até 60 min entre 50 e 80° C, com redução progressiva após prolongada incubação a 100° C. A cromatografia de troca iônica em coluna HiTrap Q FF não promoveu purificação da enzima, indicando baixa interação da α -amilase com a resina. A análise cinética revelou K_m aparente de 1 mg/mL e V_{max} aparente de 434,78 U/mL, indicando alta afinidade da enzima pelo substrato. A α -amilase apresenta propriedades compatíveis para aplicações biotecnológicas e industriais.

Palavras-chave: α -amilase; *Priestia koreensis*; *Escherichia coli*; expressão heteróloga; operon *lac*; caracterização enzimática.

ABSTRACT

α -Amylases are enzymes widely used in the food, textile, pharmaceutical, and biofuel industries due to their ability to hydrolyze starch α -1,4-glycosidic bonds. To meet industrial demands, heterologous expression has emerged as an alternative for increasing enzyme production, and recombinant enzymes are gaining prominence with the aid of recombinant DNA technology. This study aimed to produce and characterize an α -amylase from *Priestia koreensis* cloned into *Escherichia coli* JM110, using the pDMU 02 expression vector under the control of the *lac* operon. α -Amylase production was confirmed by the formation of starch degradation halos, and enzyme activity assays were performed using Fuwa's iodometric method. An IPTG concentration of 0.3 mM resulted in the highest enzyme production after 10 hours of cultivation. Characterization revealed an optimal temperature of 50°C, an optimal pH of 6, and good thermostability, with the enzyme retaining high amylolytic activity for up to 60 minutes between 50°C and 80°C, though activity progressively declined after prolonged incubation at 100°C. Ion-exchange chromatography using a HiTrap Q FF column failed to purify the enzyme, indicating a weak interaction between the α -amylase and the resin. Kinetic analysis revealed an apparent K_m of 1 mg/mL and an apparent V_{max} of 434.78 U/mL, indicating high substrate affinity. The α -amylase exhibits properties suitable for biotechnological and industrial applications.

Keywords: α -amylase; *Priestia koreensis*; *Escherichia coli*; heterologous expression; lac operon; enzymatic characterization.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação das duas partes de uma enzima.....	15
Figura 2: Principais usos das enzimas na Medicina.....	17
Figura 3: Estrutura da amilose.....	19
Figura 4: Estrutura da amilopectina.....	20
Figura 5: Gráfico de Michaelis –Menten.....	24
Figura 6: Gráfico de Linewear-Burk.....	25
Figura 7: Mapa do vetor pUC19.....	29
Figura 8: Esquema das regiões de um operon.....	32
Figura 9: Funcionamento de um operon.....	32
Figura 10: Esquema de funcionamento do operon lac.....	34
Figura 11: Mapa do vetor pDMU 02.....	38
Figura 12: Mapa do vetor pBSK-AMYKOR.....	38
Figura 13: Análise eletroforética.....	49
Figura 14: Perfil da digestão.....	50
Figura 15: Perfil eletroforético e placas com clones recombinantes.....	51
Figura 16: Análise da expressão em placas.....	52
Figura 17: Análise da expressão em meio líquido.....	53
Figura 18: Curva de calibração do amido.....	55
Figura 19: Velocidade da reação.....	56
Figura 20: Temperatura ótima.....	57
Figura 21: pH ótimo.....	60
Figura 22: Termoestabilidade.....	63

Figura 23: Gel SDS-PAGE.....	65
Figura 24: Perfil cromatográfico.....	67
Figura 25: Gel SDS-PAGE da cromatografia.....	68
Figura 26: Michaelis-Menten.....	70
Figura 27: Linewear-Burk.....	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características das endoamilases e exoamilases.....	23
Tabela 2: Sistema utilizado para ligar o vetor pDMU 02 com o inserto AMYKOR.....	43
Tabela 3: Concentrações de amido e água destilada para construção da equação da reta.....	46
Tabela 4: Concentrações de amido, tampão e extrato enzimático para construção da curva de reação da enzima.....	47
Tabela 5: Concentrações de amido, tampão e extrato enzimático para reações enzimáticas.....	47
Tabela 6: Valores de K_m e V_{max}	70

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	15
2.1 Enzimas.....	15
2.2 Hidrolases.....	18
2.3 Hidrólise do amido.....	19
2.4 Amilases.....	22
2.5 Cinética enzimática.....	23
2.6 Tecnologia do DNA Recombinante.....	26
2.7 Expressão heteróloga em <i>Escherichia coli</i>	27
2.8 Vetores de expressão.....	29
2.9 Regulação da expressão gênica bacteriana.....	31
2.10 Operon <i>lac</i>	33
3. OBJETIVOS.....	38
3.1 Objetivo Geral.....	38
3.2 Objetivos Específicos.....	38
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
4.1 Linhagem bacteriana.....	39
4.2 Plasmídeos utilizados.....	39
4.2.1 pDMU02.....	39
4.2.2 pBSKAMYKOR.....	40

4.3 Transformação genética da bactéria JM110 com os vetores pBSKAMYKOR e pDMU 02.....	41
4.4 Extração plasmidial e digestão enzimática.....	42
4.5 Construção do vetor pDMU02-AMY.....	42
4.6 Seleção das colônias recombinantes.....	43
4.7 Avaliação da expressão sob diferentes concentrações de IPTG.....	44
4.8 Expressão da α -amilase recombinante.....	44
4.9 Precipitação com acetona.....	45
4.10 Estudo da atividade enzimática.....	45
4.11 Velocidade da reação.....	46
4.12 Determinação da temperatura ótima.....	47
4.13 Determinação do pH ótimo.....	47
4.14 Termoestabilidade.....	48
4.15 SDS-PAGE.....	48
4.16 Cromatografia de troca iônica.....	49
4.17 Cinética enzimática.....	49
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
5.1 Transformação genética e extração plasmidial.....	50
5.2 Ligação do vetor recombinante.....	52
5.3 Seleção das colônias recombinantes.....	52
5.4 Avaliação da expressão sob diferentes condições de indução.....	54

5.5 Determinação da atividade enzimática.....	56
5.6 Velocidade da reação da α -amilase.....	57
5.7 Avaliação da temperatura ótima da α -amilase.....	58
5.8 Avaliação de pH ótimo da α -amilase.....	60
5.9 Termoestabilidade da enzima.....	63
5.10 SDS-PAGE.....	66
5.11 Cromatografia de troca iônica.....	68
5.12 Cinética enzimática.....	70
6.CONCLUSÕES.....	73
7. PERSPECTIVAS.....	74
8. REFERÊNCIAS.....	76

1. INTRODUÇÃO

As enzimas são moléculas produzidas por organismos vivos que atuam como catalisadoras de reações bioquímicas específicas, auxiliando na maioria dos processos necessários para a sobrevivência celular. Estima-se que elas catalisam cerca de 4000 reações de diferentes importâncias biológicas (Notin, 2024).

Desde a Antiguidade, as enzimas vêm sendo utilizadas em suas formas naturais na produção de linho, couro e diversos alimentos. Contudo, foi com o desenvolvimento da Tecnologia do DNA Recombinante que ocorreram avanços significativos, permitindo o aprimoramento da expressão, do funcionamento e do design dessas moléculas. Como consequência, seu uso em diversas áreas, como a medicina e a indústria tornou-se cada vez mais comum (Gurung et al, 2013).

De acordo com Niego (2023), as enzimas possuem o papel principal em diversos produtos biotecnológicos, são moléculas extremamente seletivas com uma grande variedade de atividades e podem ser classificadas de acordo com sua reação catalisadora. Podem ser divididas em 7 clases: oxirredutoras (catalases, lacases, gluco oxidases, etc), transferases (glicosiltransferase), liases (α -eacetolactato descarboxilase), isomerases (mutase, epimerase, glico isomerase), ligases (argininosuccinato), hidrolases (amilases, celulasas, lipases, pectinases) e translocases (ATP Sintase, Citocromo C Oxidase, Bomba de Sódio-Potássio (Na⁺/K⁺-ATPase)).

Com o advento da revolução industrial, a relação entre o ser humano e os recursos naturais tornou-se indissociável, porém a sua exploração vem causando diversas consequências, como a diminuição de cerca de 57% da fauna e da flora locais entre os anos de 1970 e 2012. Sabe-se que são consumidos aproximadamente 20% a mais dos recursos naturais do que a quantidade regenerada, o que resulta em uma escassez cada vez maior (Wiltgen, 2024).

É com a escassez dos recursos naturais e abuso de combustíveis fósseis que as hidrolases vem ganhando destaque, a hidrólise enzimática se tornou uma alternativa para obter combustíveis renováveis, ou seja, os dejetos orgânicos se tornaram essenciais para a sustentabilidade ambiental. Posoongnoen (2025) também discute o grande desperdício de alimentos e como eles podem ser usados como substratos para a produção das hidrolases. Em Wang et al (2015) relata-se a

expressão de uma amilase para facilitar a produção de biocombustível pela alga *Chlamydomonas reinhardtii*.

Descoberta em 1833, a amilase é uma enzima que catalisa a quebra do amido em açúcares. Está amplamente presente na saliva humana e no pâncreas, além de ser produzida por diversas plantas e microrganismos. As amilases produzidas por fungos, bactérias e leveduras tornaram-se de grande interesse industrial, principalmente por serem mais estáveis e de fácil manipulação, contribuindo de forma significativa para o avanço industrial nas últimas três décadas (Chandra et al, 2020).

As amilases podem ser divididas em três subclasses principais: α - β - γ -amilase. A α -amilase (EC 3.2.1.1) hidrolisa as cadeias glicosídicas α -1,4 internas do amido de forma aleatória. Trata-se da forma mais comum dessa enzima e é amplamente utilizada na produção de etanol, auxiliando na fermentação dos açúcares. A β -amilase (EC 3.2.1.2) catalisa as extremidades não redutoras, sendo responsável pelo amadurecimento das frutas, está presente nas sementes e é empregada na fermentação de bebidas alcoólicas. Por último, a γ -amilase ou glucoamilase (EC 3.2.1.3) cliva as ligações α -1,6 e α -1,4, apresentando aplicações nas áreas farmacêuticas e na indústria química (Pandey et al, 2000). Além destas, há ainda amilases desramificadoras que atuam clivando as ligações α -1,6 da ramificação do amido, como as enzimas pululanases (EC 3.2.1.41).

São proteínas obtidas a partir de diferentes espécies de microrganismos, contudo para o uso comercial é mais comum a utilização de α -amilase derivadas de bactéria do gênero *Bacillus*, como a *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens* e *Priestia koreensis*, devido à sua termoestabilidade, característica altamente desejável em enzimas comerciais (Gomes 2003). No entanto, os níveis de produção dessas proteínas são insuficientes para suprir as demandas comerciais, o que torna necessária a expressão recombinantes em vetores como a *Escherichia coli*.

A produção em alta quantidade da α -amilase pode ser realizada por meio da fermentação de microrganismos em meio líquido. Em Gutiérrez-Garcia, Alvarez-Guzmán & De Leon-Rodriguez (2020) a enzima produzida por *Bacillus megaterium* e expressa na parede celular da *Escherichia coli*, demonstrou melhoria da hidrólise do amido. Além disso, observa-se que a adição de amido no meio de cultura pode aumentar a produção da enzima, conforme relatado em Hassan et al (2018), que realizaram a clonagem, purificação e caracterização da enzima produzida por *E. coli* utilizando o carboidrato como substrato na fermentação.

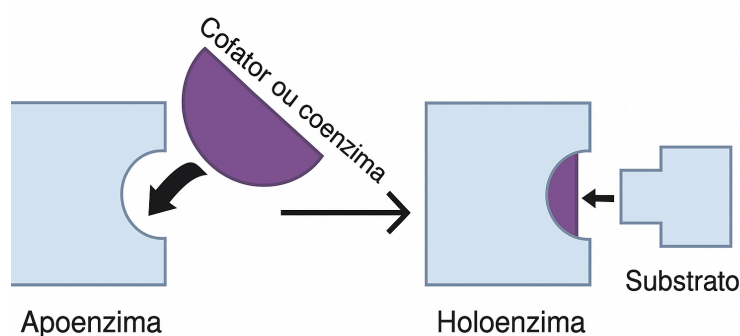
Neste contexto, este trabalho tem por objetivo produzir uma α -amilase em *Escherichia coli* utilizando um vetor recombinante contendo o operon *lac*, além de caracterizar as condições ótimas de atividade da enzima e determinar seus parâmetros cinéticos.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Enzimas

As enzimas são biomoléculas, majoritariamente de origem proteica, que atuam como catalisadores de reações bioquímicas, aumentando a velocidade das reações químicas em que o produto final é obtido. Algumas enzimas necessitam da associação com componentes não proteicos para exercer a atividade catalítica, elas vão ser compostas por duas partes: a proteína chamada de apoenzima, enquanto o componente não proteica é chamado de cofator, este podendo ser um íon metálico ou uma molécula orgânica conhecida como coenzima (Figura 1), as duas partes em conjunto formam a parte funcional de uma enzima chamada holoenzima (Sardar, 2015).

Figura 1 - **Representação das duas partes de uma enzima.** Apoenzima, parte proteica e cofator, parte não proteica. As duas partes juntas tornam-se holoenzimas.



Fonte: Motta, 2023.

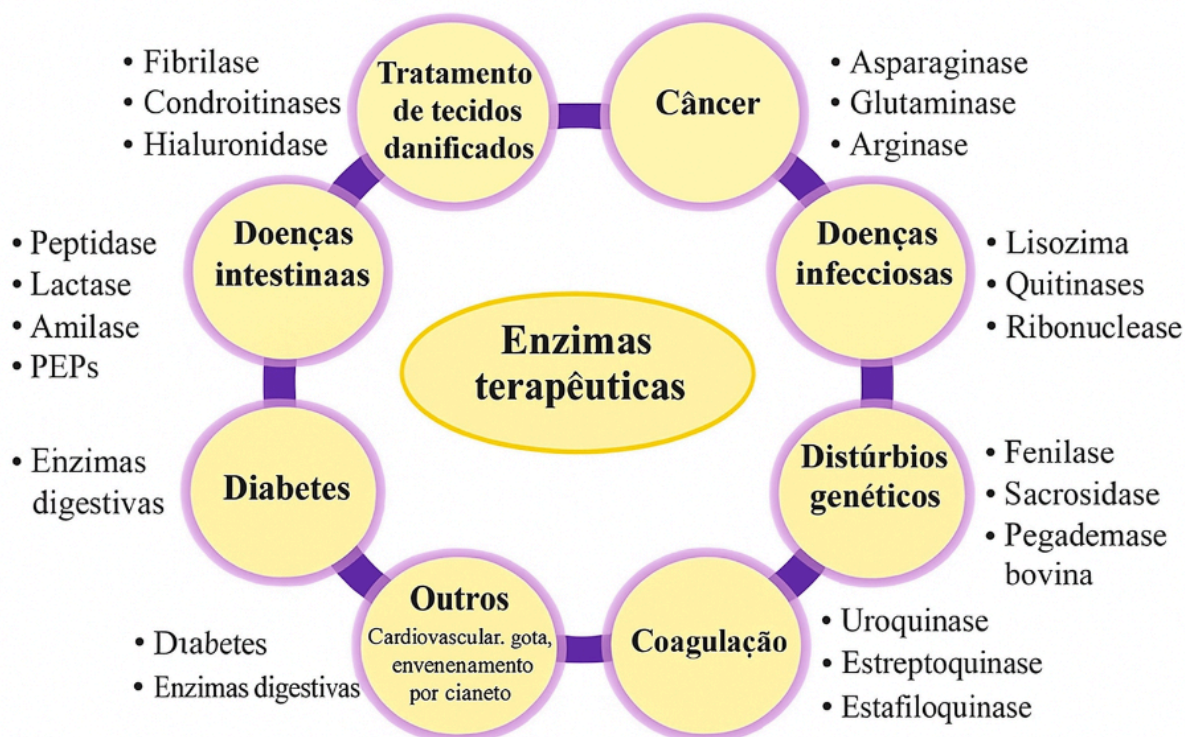
As enzimas podem ser produzidas pelos mais diversos microrganismos, incluindo bactérias, fungos filamentosos e leveduras, e ainda por plantas e animais, apresentando ampla diversidade de propriedades físico-químicas e mecanismos catalíticos, como hidrólise, oxidação, transferência de grupos químicos e redução. Além disso, destacam-se por sua elevada especificidade e eficiência catalítica. De acordo com Buller et al (2023), as enzimas são essenciais nos avanços acerca da síntese de moléculas orgânicas, visto que nos últimos anos houve um aumento de 20 vezes no número de sequências proteicas disponíveis, acelerando o descobrimento de diferentes enzimas com potencial aplicação biotecnológica.

A importância dessas biomoléculas também se reflete em seu impacto econômico. May (2019) relata que se tornaram protagonistas nas indústrias, estimou que o mercado global de enzimas industriais ultrapassaria U\$7 bilhões em 2023, impulsionado por aplicações nos setores como alimentício, agrícola, bio combustíveis, farmacêutico, têxtil, cosméticos e tratamento de resíduos. Entre as enzimas usadas industrialmente, aproximadamente 60% são produzidas por fungos, 24% de bactérias, 4% por leveduras e o 10% restantes são produzidas por plantas ou fontes animais. Os microrganismos destacam-se como as principais fontes produtoras devido ao alto rendimento, crescimento exponencial, baixo custo de produção, fácil otimização e melhoramento genético do vetor de produção (Singh et al, 2016).

Outra razão que contribui para crescente popularidade das enzimas em diversas áreas é a possibilidade de serem modificadas geneticamente para otimização de suas propriedades. Em Radley et al (2023) destaca-se os novos métodos de alteração proteica, significando que não há mais limitações das enzimas naturais, ou seja, as proteínas podem ser desenvolvidas com características específicas para determinadas aplicações e de acordo com as necessidades, incluindo uma maior especificidade de substrato, parâmetros cinéticos, aumento da tolerância de imobilização e estabilidade em diversas condições.

Além do uso industrial, as enzimas são muito importantes na área da saúde e farmacêutica. A L-Asparaginase, por exemplo, que hidrolisa o aminoácido essencial para as células cancerígenas L-Asparagina, é muito usada utilizada há quase 50 anos na quimioterapia de leucemia linfóide aguda em crianças, além de tratar a doença de Hodgkins, melanossarcoma e linfossarcoma (Vimal&Kumar, 2017). O tratamento para diabetes é outro que se beneficia dessas proteínas, já que o uso de lipases, proteases e amilases como suplementos na dieta são capazes de melhorar a digestão de açúcares, gorduras e proteínas, melhorando a circulação sanguínea, complicações renais e gastroparesis (Figura 2).

Figura 2 - Principais usos das enzimas na Medicina.



Fonte: Vimal&Kumar, 2019.

As enzimas também são empregadas na Terapia de Reposição Enzimática (TRE), em que há a administração de enzimas ausentes ou deficientes no corpo humano, muitas vezes causadas por distúrbios genéticos, como a doença de Gaucher que causa a diminuição da glicocerebrosidase e a fenilcetonúria, enfermidade causada pelo acúmulo do aminoácido fenilalanina no corpo (Ho&Christodoulou, 2014). De acordo com Maroto&Rini (2014), além de tratamentos, diversas enzimas são utilizadas como “marcadores enzimáticos”, conhecidos assim já que a alteração nas suas concentrações podem ser características clínicas de doenças. A lactato desidrogenase, por exemplo, é um marcador para doenças cardíacas e distúrbios musculares.

Diante da ampla diversidade de aplicações, a pesquisa voltada para o desenvolvimento e ao aperfeiçoamento das aplicações enzimáticas cresce exponencialmente. Sua elevada especificidade, não formação de resíduos, altas taxas de conversão e compatibilidade com processos sustentáveis tornam essas biomoléculas fundamentais para a Biotecnologia moderna (Decol, 2021).

As enzimas são classificadas de acordo com o tipo de reação que catalisam, sendo divididas em diferentes classes. Entre elas, destacam-se as hidrolases, grupo

responsável pela catalisação de reações de hidrólise, e devido à sua ampla ocorrência na natureza e à grande importância biotecnológica, as hidrolases são parte de uma das classes enzimáticas mais usadas em aplicações industriais.

2.2 Hidrolases

A catálise biológica tem se destacado como uma alternativa sustentável aos processos químicos convencionais, contribuindo para um maior desenvolvimento de tecnologias mais eficientes e ambientalmente amigáveis. Nesse contexto, as hidrolases ganharam grande reconhecimento, principalmente devido à sua ampla aplicabilidade em diversos processos biotecnológicos e industriais (O'Connell et al, 2024).

As hidrolases constituem uma classe de enzimas que catalisam a clivagem de ligações por meio da adição de moléculas de água, que atuam como nucleófilos no processo de hidrólise. Essas enzimas desempenham um papel fundamental em diversos setores industriais, como farmacêuticas, agroquímicos e produção de compostos de alto valor agregado. São consideradas uma das classes mais diversas de enzimas, compreendendo cerca de 200 subclasses diferentes, que catalisam a hidrólise dos mais variados compostos e representam cerca de 75% das enzimas empregadas industrialmente (Shukla, Bendre&Gaikwad, 2022).

Em Kocabaş, Lyne&Ustunol (2022) destaca-se a importância das hidrolases, constando como são as enzimas mais utilizadas em processos de catálises biológicas industriais devido à sua elevada especificidade, ampla acessibilidade comercial, independência de cofatores e a capacidade de trabalhar em elevadas concentrações de substrato.

Entretanto, a eficiência dos processos que utilizam as hidrolases depende de diversos fatores operacionais, ou seja, ao trabalhar com essas enzimas é necessário se atentar a certos fatores. Entre os principais, estão o tipo de pré tratamento do substrato além da sua concentração e adsorção, termoestabilidade da enzima, tempo de reação da hidrólise, taxa de agitação, a possível inibição da atividade enzimática pelos produtos formados, condições de pH e temperatura do meio reacional (Aguilar et al, 2010).

Entre as principais hidrolases usadas na indústria destacam-se as proteases, amilases, pectinases e lipases. As lipases (E.C. 3.1.1.3) são enzimas hidrolíticas que catalisam a hidrólise dos triacilgliceróis e são amplamente utilizados na indústria na

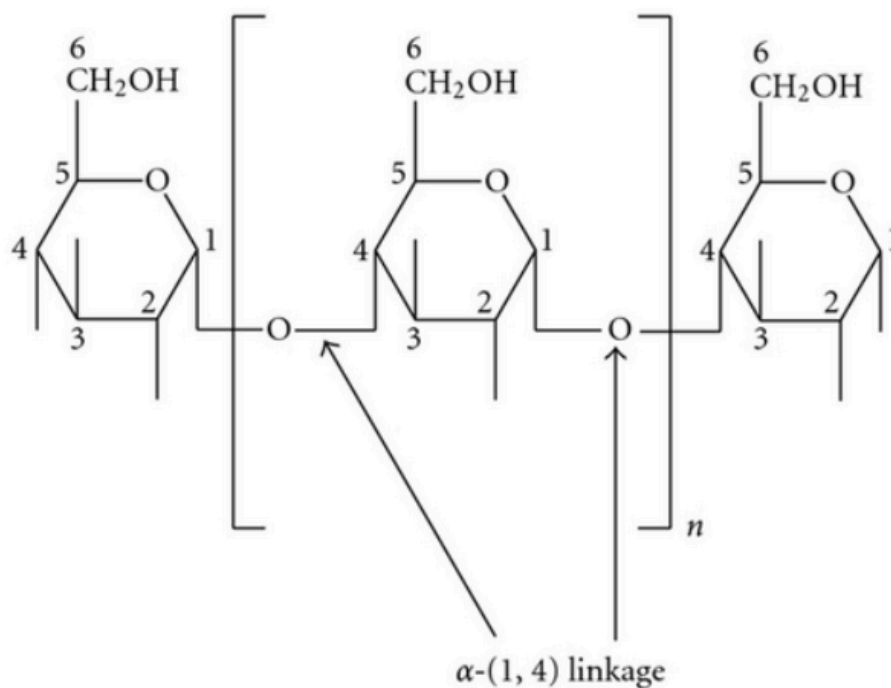
formulação de detergentes, manufatura de couro e papel, síntese de sedativos e outros fármacos. As proteases promovem a clivagem das ligações peptídicas de proteínas e peptídeos, sendo amplamente utilizadas na indústria alimentícia e de detergentes. As pectinases, por sua vez, desempenham papel importante no processamento de frutas e clarificação de sucos (Rodrigues et al, 2015).

Dentre as hidrolases de interesse industrial, as enzimas envolvidas na degradação do amido assumem um papel de destaque, devido à ampla disponibilidade do polissacarídeo e à elevada demanda dos produtos provenientes da sua degradação. Dessa forma, compreender a estrutura e características do amido, assim como os mecanismos envolvidos na sua hidrólise é fundamental para o estudo dos processos catalíticos desempenhados e importância da sua aplicação na indústria.

2.3 Hidrólise do amido

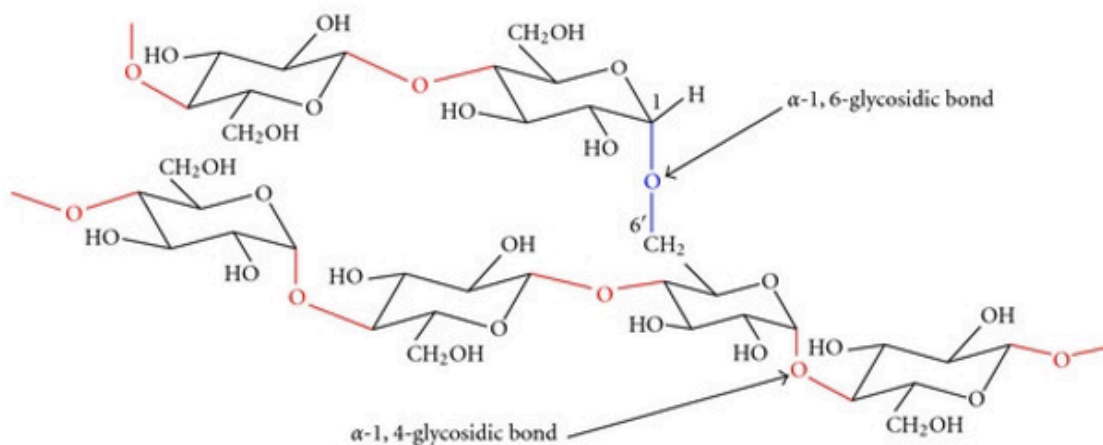
O amido é um dos polissacarídeos mais abundantes na natureza, sendo produzido pelas plantas no formato de grânulos insolúveis. Trata-se de um carboidrato polimérico composto de átomos de carbono, hidrogênio e oxigênio ($C_6H_{10}O_5$), e é uma mistura de dois polímeros com alto peso molecular: a cadeia linear (Figura 3), chamada de amilose - formada por unidades de α -D-1,4 - e a cadeia ramificada (Figura 4), nomeada de amilopectina que possui as unidades α -D-1,4 ligadas a α -D-1,6 (Hii et al, 2012).

Figura 3 - **Estrutura da amilose**. As setas mostram as ligações α -D-1,4



Fonte: Hii et al, 2012.

Figura 4 - **Estrutura da amilopectina.** As setas mostram as ligações α -D-1,4 (em vermelho) e α -D-1,6 (em azul).



Fonte: Hii et al, 2012.

Além da sua ampla utilização na indústria alimentícia devido ao seu efeito estabilizador, o amido tem despertado crescente interesse biotecnológico devido ao

seu potencial como matéria prima em processos fermentativos e produção de biocombustíveis. Nesse contexto, o Brasil destaca-se como um dos maiores focos dessa indústria devido a sua grande produção de vegetais produtores de amido, especialmente a mandioca, cuja produção é significativa na região Norte do país (Vieira et al, 2020).

Para que o amido possa ser utilizado nestes processos industriais, sua estrutura frequentemente deve ser reduzida através da hidrólise, ou seja, decomposição pela água, quebrando as ligações do amido e convertendo em moléculas menores. No entanto, a hidrólise não opera por si mesma, precisando de agentes que completam essa reação química, sendo elas: os ácidos, álcalis e enzimas. A hidrólise ácida pode ser realizada utilizando diversas fontes, como o ácido clorídrico e ácido sulfúrico, ou ácidos orgânicos, apresentando como principal vantagem o menor custo operacional. Porém esse método possui grande dificuldade em obter os açúcares redutores em comparação com a hidrólise enzimática, devido principalmente a menor seletividade e resultando em formação de subprodutos indesejáveis. Já a hidrólise alcalina usa-se o hidróxido de sódio (NaOH) em excesso, aumentando os custos do processo, além de gerar resíduos de soda cáustica, que demandam tratamento adequado (De Borba et al, 2019).

Por outro lado, a hidrólise enzimática apresenta uma alta especificidade e maior controle dos produtos formados. No entanto, podem ser sensíveis a variações de pH e temperatura, exigindo condições específicas e adequadas para que apresentem melhor atividade. Além disso, para as aplicações industriais, é importante que sejam produzidas por microrganismos classificados como GRAS (*Generally Recognized As Safe*), garantindo segurança no processo e alto rendimento do produto final (Monteiro&Silva, 2009).

Em Lin et al (2016), a hidrólise enzimática vem substituindo gradativamente os métodos químicos, já que o uso das enzimas é seguro, não possuem alto custo financeiro, energético, e a elevada especificidade das enzimas reduz a formação dos compostos secundários, obtendo produtos de alta qualidade. Entre as enzimas utilizadas neste processo, as amilases são consideradas as principais catalisadoras da hidrólise do amido e são amplamente usadas em diferentes setores industriais

2.4 Amilases

Entre as enzimas utilizadas na indústria, as amilases destacam-se por sua ampla aplicabilidade nos mais diversos setores alimentícios, bioprocessos, têxtil e de detergentes. Essas enzimas são responsáveis pela hidrólise de carboidratos complexos, gerando polímeros menores e podem ser encontradas em diversos organismos da natureza, incluindo plantas, animais e diferentes microrganismos. Com as inovações da biotecnologia, suas aplicações foram ampliadas para áreas como diagnóstico clínico, medicinais e química analítica (Tiwari et al, 2015).

As amilases pertencem ao grupo de glicosídeo hidrolase, e podem ser divididas em endoamilases, exoamilases, enzimas desramificadoras e transferases. As endoamilases catalisam a clivagem das ligações glicosídicas α ,1-4 localizadas na parte mais interior das cadeias da amilopectina e amilose, produzindo oligossacarídeos lineares e de vários tamanhos, a endoamilase mais importante é a α -amilase. As exoamilases atuam exclusivamente nas ligações α ,1-4, como ocorre com a β -amilase, ou liberando glicose por meio da clivagem das ligações α ,1-6, como observado nas amiloglucosidase e glucoamilase (Zhao et al, 2022) (Tabela 1).

Tabela 1 - Características das endoamilases e exoamilases

	Enzimas	Classificação	Sítio de clivagem	Produto
Endoamilases	α -amilase	E.C 3.2.1.1	Ligações internas α ,1-4	Dextrinas
Exoamilases	β -amilase, glucoamilase e α -glucosidase	E.C 3.2.1.2, E.C 3.2.1.3 e E.C 3.2.1.20	Ligações externas	Maltose, β -ciclodextrina e glicose

Fonte: Zhao et al, 2022.

As desramificadoras atuam de forma específica somente nas ligações α ,1-6 presentes em α -glucanos ramificados, como a amilopectina e glicogênio. Já as transferases catalisam as ligações α ,1-4 de uma molécula doadora e transferem uma parte para uma molécula receptora, formando uma nova ligação glicosídica. Entre os principais exemplos dessa classe estão a amilomaltose e ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase) (Van der Maarel, 2002).

A α -amilase pode ser encontrada em diferentes microrganismos, incluindo plantas, animais, leveduras e bactérias, sendo isolada de ambientes naturais, como plantações agrícolas de arroz, cultura de cereais e no bioma amazônico, principalmente em solos com plantações de mandioca. No entanto, as amilases produzidas por bactérias e leveduras são as mais empregadas industrialmente devido a facilidade de cultivo, elevada produtividade e adaptação a diferentes condições de processo (Pandey et al, 2000). Entre elas, destacam-se as amilases produzidas por espécies do gênero *Bacillus*, que apresentaram alta atividade catalítica, boa estabilidade térmica e atuações em faixas alcalinas de pH, características altamente desejáveis para aplicações industriais (Reddy, Nimmagadda, Rao&KRS, 2003).

Além disso, a associação dessas enzimas com a Tecnologia do DNA Recombinante possibilitou a obtenção de cepas microbianas capazes de produzir a α -amilase em grandes quantidades. Por meio da inserção do gene da enzima em vetores de expressão apropriados e a escolha de um hospedeiro bacteriano eficiente, tornou-se possível obter elevados níveis de produção da α -amilase, atendendo as demandas industriais de uma forma controlada, reprodutível e econômica (Farooq et al, 2021).

Logo, além da compreensão acerca da sua estrutura, aplicações biotecnológicas, produção e eficiência, o conhecimento das propriedades catalíticas e a cinética enzimática também são essenciais, pois permitem avaliar parâmetros como a afinidade da enzima pelo substrato e seu rendimento catalítico. O conhecimento destes dois fatores permite a otimização das condições da hidrólise e o desenvolvimento de processos industriais mais eficazes e economicamente viáveis.

2.5 Cinética Enzimática

Para que haja um maior entendimento dos mecanismos de ações enzimáticas e seus propósitos, o estudo da cinética enzimática é fundamental, pois a análise de produto formado e sua velocidade de formação com base no consumo de substrato é crucial para o entendimento da eficiência e funcionamento. A compreensão da cinética enzimática foi uma das responsáveis pelo avanço do conhecimento existente sobre o mecanismo de ação destas moléculas catalisadoras, essencial para o desenvolvimento da Bioquímica (Pinto&De Menezes, 2009).

Foram propostos modelos matemáticos para demonstrar os resultados refletidos pela velocidade de reação em função da concentração dos substratos e

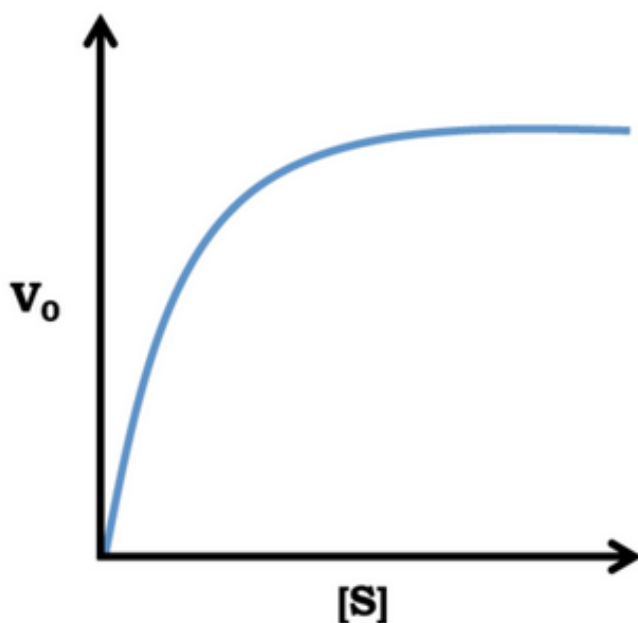
outras variáveis. Com o auxílio das simulações em computador somados com as funções matemáticas, podem ser feitas previsões do comportamento das reações enzimáticas com justificativa teórica (Sartor, 2001).

Um dos exemplos dos modelos matemáticos usados na cinética enzimática é chamado de Michaelis-Menten, a descrição matemática do comportamento da enzima em condições específicas. Proposto em 1913, esse modelo explica que a enzima (E) se liga ao substrato (S), formando o complexo enzima-substrato (ES) e irá se converter em produto (P). A taxa desta conversão pode ser afetada por diversos fatores, como temperatura, pH, concentração da enzima e presença de inibidores (Srinivasan, 2022).

Neste modelo, a sua constante é chamada de K_m , e é um parâmetro essencial da equação de Michaelis-Menten, representada abaixo:

$$v = \frac{V_{max} * [S]}{K_m + [S]}$$

Figura 5 - Gráfico de Michaelis Menten.



Fonte: Rodriguez&Towns (2020).

O K_m é definido como a concentração de substrato em que a reação atinge metade do seu valor máximo, fornecendo o valor para afinidade entre a enzima e o substrato, ou seja, quanto menor o K_m , maior a afinidade da enzima pelo seu

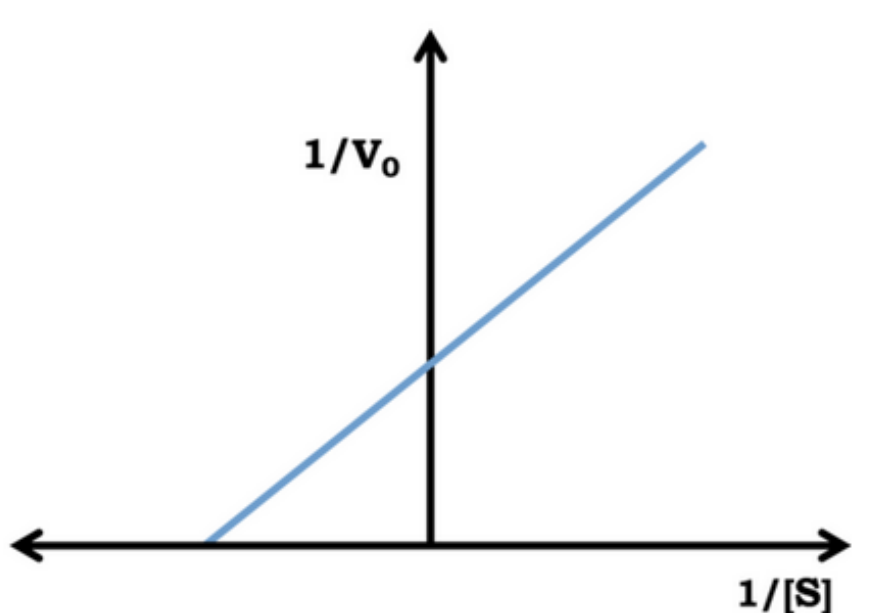
substrato. Logo, a obtenção deste valor é crucial para a avaliação da eficiência da enzima (Freitas et al, 2023).

Outro parâmetro essencial para avaliação da cinética de uma enzima é sua velocidade máxima ($V_{\max}$). O $V_{\max}$ representa a taxa máxima da reação quando a enzima está saturada do substrato, ou seja, adicionar mais substrato não irá aumentar a taxa de reação. O $V_{\max}$ indica a eficiência catalítica, consequentemente é inestimável para a determinação da força catalítica e a máxima capacidade de uma enzima (Adnan, 2010).

Além da equação de Michaelis-Menten para obtenção dos valores de K_m e $V_{\max}$ usa-se também a sua linearização através do duplo recíproco de Lineweaver-Burk, representado abaixo:

$$\frac{1}{v} = \left(\frac{K_m}{V_{\max}}\right) * \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{\max}}$$

Figura 6 - Gráfico de Lineweaver-Burk.



Fonte: Rodriguez&Towns (2020).

A equação de Lineweaver-Burk é usada amplamente para se obter os resultados da cinética enzimática devido a sua simplicidade, maior entendimento entre a relação da velocidade inicial (v) e a concentração do substrato (S), já que cada

variável está sendo representada separadamente ($\frac{1}{v}$ e $\frac{1}{S}$) em vez das duas variáveis estarem em um único eixo (Lineweaver&Burk, 1934).

De acordo com Nielsen&Burés (2019), sua aplicação serve também como um complemento para uma análise adequada, fornecendo a representação visual dos dados além de indícios de quaisquer falhas da equação citada anteriormente, a Michaelis-Menten. Logo, ambas as funções matemáticas são essenciais para o entendimento completo da cinética de um catalisador.

A determinação desses parâmetros cinéticos é relevante no contexto da Biotecnologia moderna, pois as enzimas produzidas pela Tecnologia do DNA Recombinante precisam ser caracterizadas quanto à sua atividade, afinidade pelo substrato e eficiência catalítica. Ou seja, a Tecnologia do DNA Recombinante tornou-se uma ferramenta indispensável para a obtenção e estudo das enzimas de interesse industrial, permitindo a produção de proteínas recombinantes com maiores rendimentos.

2.6 Tecnologia do DNA Recombinante

Desde a descoberta do DNA e o entendimento do Dogma da Biologia Molecular, em que o DNA transforma-se em RNA e se torna proteína, houve um grande interesse na manipulação genética. E foi na década de 60 com a descoberta das enzimas de restrição, que atuam como “tesouras moleculares”, e a DNA ligase que isso se tornou realidade, em conjunto com a clonagem genética e sequenciamento, que permitiram o isolamento de genes específicos, avançando o desenvolvimento da Engenharia Genética (Nicholl, 2023).

As enzimas de restrição foram descobertas em estudos de células bacterianas infectadas por bacteriófagos e podem ser divididas em classes a depender das suas estruturas e sítios de reconhecimento. Mas as mais usadas na Engenharia Genética são as tipo II, proteínas monoméricas e diméricas, que ao reconhecer o sítio com sequência palindrômica, clivam o DNA (Di Felice, Micheli&Camilloni, 2019).

A Engenharia Genética permitiu além do isolamento e purificação de genes, mas a criação de microrganismos altamente eficientes na produção de proteínas de interesse, ou seja, o seu melhoramento genético. Além do aprofundamento na funcionalidade de proteínas, sequências de DNA funcional humano, regulação gênica

entre diferentes espécies, e uso de bactérias, leveduras e plantas como biorreatores (Glick&Patten, 2022).

Foi com a possibilidade da Engenharia Genética que os cientistas Paul Berg, Herbert Boyer e Annie Chang, em 1973 desenvolveram a Tecnologia do DNA Recombinante, que se baseia em alterar um material genético de um organismo para ter as características desejadas. O material genético é introduzido em um organismo exógeno, chamado de vetor, que será multiplicado e produzir cópias contendo o gene de interesse (Khan et al, 2016).

Um dos principais objetivos da expressão heteróloga é a produção de enzimas a partir de microrganismos, podendo ter extensa aplicação na indústria além de visar uma melhoria no processo de produção e outros componentes relacionados. Ou seja, o uso da Engenharia Genética na produção de enzimas por microrganismos pode atender uma demanda mundial e se tornar um dos pilares centrais da bioeconomia, tornando bactérias, fungos e leveduras em recursos capazes de converter matérias primas em moléculas de alto valor (Dornelas, 2026).

Essas possibilidades de manipulações genéticas de microrganismos, aliadas à vasta diversidade de genes consolidaram a Engenharia Genética em conjunto com a Tecnologia do DNA Recombinante como ferramentas essenciais para o desenvolvimento da biotecnologia moderna. Seu uso tem permitido a otimização de vias metabólicas e a produção eficiente de proteínas recombinantes de alto valor agregado, ampliando as aplicações industriais dos organismos geneticamente modificados (Astolfi-Filho, Da Silva&De Fátima Mentos Acácio Bigi, 2014).

2. 7 Expressão heteróloga em *Escherichia coli*

Para escolher os vetores de sistema de expressão de proteínas recombinantes, vários aspectos precisam ser levados em consideração, como o gasto financeiro, qualidade do produto e aspectos qualitativos, já que a produção industrial depende de despesas da cultura celular e o retorno previsto para o produto, logo, é importante a escolha de um microrganismo adequado (Gomes et al, 2016).

Quando se trata de microrganismos para expressão de genes heterólogos, a *Escherichia coli* é a primeira escolha, por ser de fácil manipulação e boa quantidade de produto produzido. É uma enterobactéria Gram-negativa, usada amplamente em laboratórios para clonagem, e produção de proteínas recombinantes. Além de ser um organismo geneticamente e fisicamente bem conhecido, com diferentes cepas de

genótipo reconhecido, sua produção pode ser feita em escala laboratorial ou industrial (Olins&Lee, 1993).

Apesar de oferecerem diversas qualidades, como crescimento rápido a cada 20 a 30 minutos, capacidade de fermentação contínua de baixo custo e alto número de cepas modificadas para aplicações específicas, a expressão heteróloga em *E. coli* possui limitações como acumulação intracelular de proteínas heterólogas, dobramentos impróprios das proteínas, falta de modificações pós translacionais e presença de proteases que degradam os produtos de interesse (Terpe, 2006).

Para melhoria da expressão gênica na *Escherichia coli* é necessário tomar certas precauções, como o cuidado de não ter íntrons, sequências não codificadoras, já que a bactéria não possui em sua maquinaria, ferramentas para retirada dos íntrons. É importante também a verificação de fragmentos terminadores para a bactéria, que irão resultar no término precoce da leitura do DNA e perda da expressão gênica. A *E. coli* também pode ter dificuldade em processar as proteínas recombinantes que necessitam de modificações pós translacionais, o que pode afetar a bioatividade, função, estrutura, solubilidade e meia vida do produto de interesse (Kolaj, 2009).

Durante muito tempo, acreditou-se que a bactéria não era capaz de secretar as proteínas recombinantes, no entanto, nos últimos anos esse entendimento tem mudado, uma vez que diferentes cepas utilizadas em laboratório demonstraram capacidade de secreção. Essa característica passou a ser considerada mais uma vantagem do sistema, pois facilita a purificação dos produtos recombinantes. Além disso, a facilidade na seleção de colônias recombinantes, devido à presença de marcadores de seleção, como a resistência a antibióticos, também é considerada uma vantagem (Chen, 2012).

Essa dificuldade da bactéria de processar os produtos de interesse pode gerar estresse celular, tornando as proteínas inúteis. Além disso, muitas proteínas recombinantes tendem a formar grandes agregados insolúveis, conhecidos como corpos de inclusão. Em alguns casos a formação destes agregados pode ser vantajosa, especialmente para proteínas tóxicas ou resistentes à degradação por proteases, facilitando sua recuperação e posterior purificação (Nascimento, 2016).

No caso da produção de enzimas industriais, como a α -amilase, a elevada expressão da proteína pode resultar em grande acúmulo ou secreção do produto recombinante, principalmente quando sua transcrição é controlada por promotores

induzíveis fortes (Suominen, 1987). A ativação desses sistemas de expressão é frequentemente realizada por meio da adição de IPTG (isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo), um dos indutores mais utilizados para a produção de proteínas recombinantes em cepas bacterianas (Zhao, 2019). Dessa forma, a eficiência da produção heteróloga está diretamente relacionada aos elementos regulatórios responsáveis pelo controle da expressão gênica, os quais são incorporados aos vetores de expressão utilizados na clonagem e produção de proteínas recombinantes.

2.8 Vetores de expressão

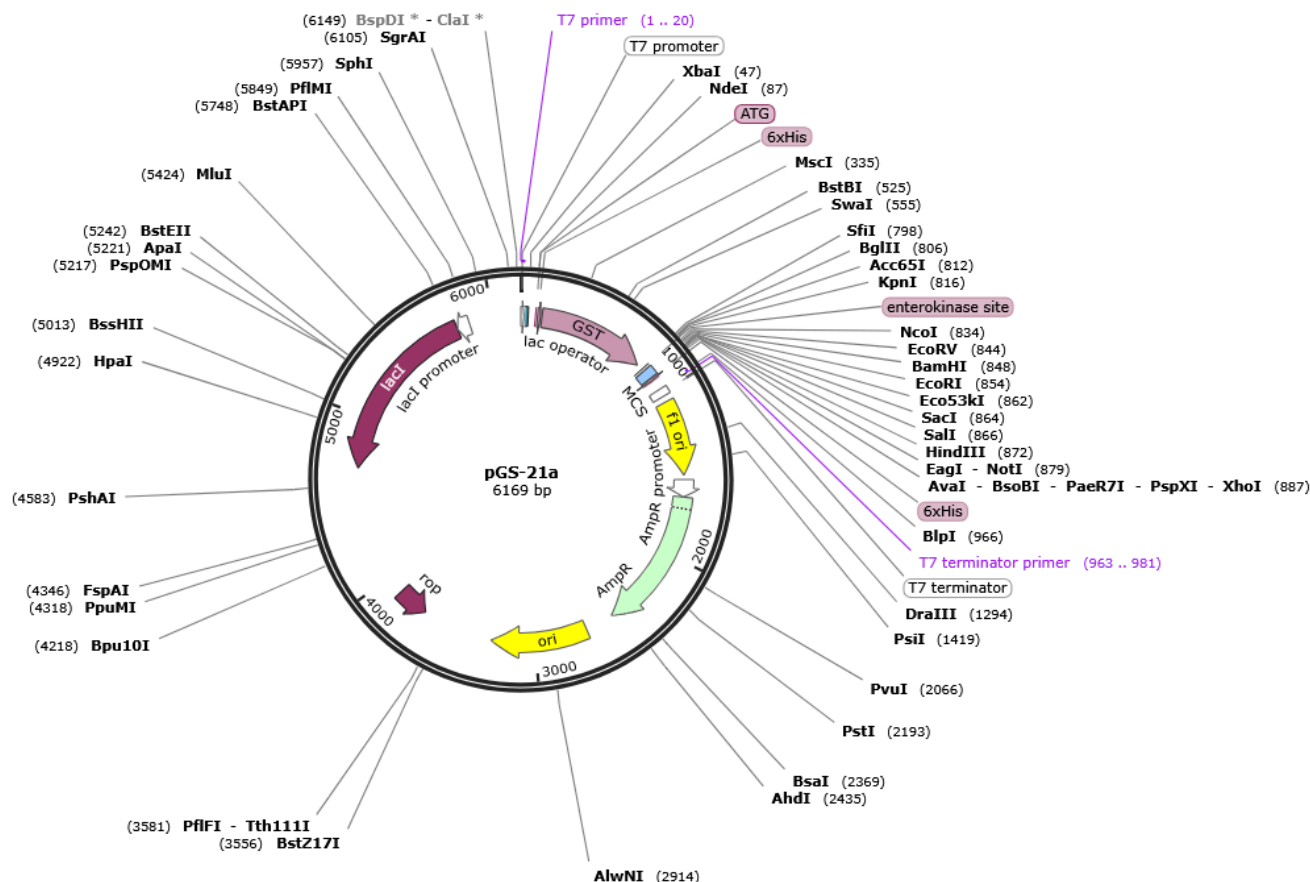
Um dos elementos centrais dos sistemas de expressão de proteínas heterólogas são os chamados vetores de expressão. Essas moléculas possuem a capacidade de replicação independente e são amplamente utilizadas para introduzir um DNA de interesse na célula hospedeira, possibilitando a produção de proteínas recombinantes por meio das ferramentas de Engenharia Genética, como as enzimas de restrição e DNA ligase (Xistra, 2016).

Existe uma ampla variedade de vetores disponíveis, entretanto, os plasmídeos são os mais simples e amplamente utilizados para a clonagem de material genético. Os plasmídeos são moléculas extracromossomais de DNA circular de dupla fita, capazes de promover a transferência horizontal de genes. São encontrados em bactérias e apresentam tamanhos que variam de alguns milhares a mais de cem mil pares de bases. Para sua utilização em clonagem, devem possuir marcadores de seleção, como resistência a antibióticos além de um múltiplo sítio de enzimas de restrição para facilitar a inserção do gene de interesse (Carattoli, 2013).

Os marcadores de seleção são utilizados para impedir o crescimento de células que não possuem o vetor de expressão, permitindo o uso apenas das células recombinantes. Os antibióticos mais empregados em laboratório para seleção e manutenção de plasmídeos são ampicilina, canamicina, cloranfenicol e tetraciclina. Cada uma possui vantagens e limitações específicas, logo a escolha do marcador de seleção deve ser avaliada a depender das condições de cultivo e das características da cepa bacteriana utilizada (Carroll&Wong, 2018).

Um vetor adequado para expressão em *Escherichia coli* deve possuir uma origem de replicação independente (Ori), responsável por determinar o número de cópias, e um múltiplo sítio de clonagem (MCS) contendo diferentes sítios de enzimas de restrição para inserção do gene de interesse (Helinski, 2022) (Figura 7).

Figura 7 - **Plasmídeo pGS-21a**, possui o múltiplo sítio de clonagem e o gene *Ampr* que confere a resistência à ampicilina.



Fonte: Silva, 2016.

Outro elemento fundamental dos plasmídeos de expressão é o promotor. Normalmente essa região está associada a outros elementos regulatórios, incluindo genes que codificam proteínas repressoras e sistemas de indução gênica. Entre os promotores mais usados em laboratórios destacam-se o promotor o *Lac* (pLac), principal componente do *operon lac* e o promotor T7, amplamente usado na produção de proteínas recombinantes. O gene T7 é derivado do bacteriófago T7 e produz sinais fortes de transcrição e tradução, resultando em alta produção de proteínas de interesse (Rosano&Ceccarelli, 2014).

Os plasmídeos mais usados atualmente combinam diferentes promotores, marcadores de seleção e estratégias para maximizar a eficiência da produção proteica. Também foram incorporados características que facilitam a produção e purificação de proteínas recombinantes, como *tags* de afinidade e de solubilidade,

sequências sinal para secreção e terminadores de transcrição, que contribuem para estabilidade e controle da expressão gênica (Riggs, 2018).

Além das características do vetor, a escolha do microrganismo hospedeiro também influencia na eficiência da produção de proteínas recombinantes. Em Bailey (2005), determinados sistemas de expressão exigem cepas bacterianas específicas para alcançar o desempenho ideal. Por exemplo, plasmídeos contendo o promotor *lac*, são frequentemente utilizados em cepas que possuem o gene *lacI^q*, responsável pela superprodução do repressor *lacI*. Da mesma forma que os vetores foram desenvolvidos para otimizar a expressão de proteínas, diversas cepas foram desenhadas para aperfeiçoamento da expressão de proteínas, além de características específicas, como maior solubilidade, menor degradação proteolítica ou maior rendimento de expressão.

Dessa forma, o sucesso da produção heteróloga depende dos mecanismos celulares responsáveis pelo controle e tradução, além da transcrição da construção do vetor de expressão. Portanto, compreender os mecanismos de regulação da expressão gênica bacteriana é fundamental para o desenvolvimento e a otimização de sistemas de expressão eficientes.

2.9 Regulação da expressão gênica bacteriana

As bactérias estão constantemente expostas a alterações ambientais, como variações de pH, temperatura, disponibilidade de nutrientes e concentrações de oxigênio. Essas mudanças requerem que o microrganismo tenha uma rápida adaptação fisiológica para garantir sua sobrevivência. Essa adaptação ocorre, principalmente, por meio da capacidade de modular a expressão gênica, produzindo componentes estruturais e funcionais necessários em determinadas condições ambientais, mas que podem não ser expressos em situações consideradas normais (Santos, 2018).

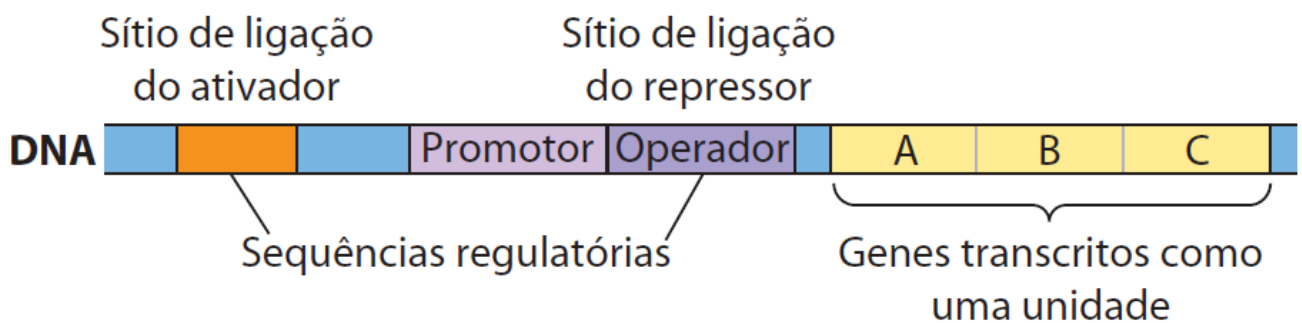
Entretanto, a síntese desses produtos não essenciais requer um alto gasto energético por parte da célula. Dessa forma, mecanismos regulatórios são importantes para controlar a transcrição dos genes e garantir a produção das proteínas apenas quando necessárias, contribuindo para a otimização do crescimento e metabolismo bacteriano (Tsutsuki et al, 2016).

De acordo com Munsky, Neuert&Van Oudenaarden (2012), os genes podem ser regulados por mecanismos de indução ou repressão. A indução consiste na

síntese de produtos metabólicos em resposta à presença de determinadas moléculas no meio de cultura, geralmente substratos envolvidos em uma via metabólica específica. Enquanto a repressão ocorre quando a expressão gênica é reduzida ou interrompida, devido a atuação do produto na via metabólica ou quando sua concentração atinge níveis adequados na célula.

Nas bactérias, os genes que participam de uma mesma via metabólica costumam estar organizados em “blocos”, chamados de *operons*. Um *operon* (Figura 8) é composto de estruturas reguladoras que possuem três partes: promotor (região controladora), região codificadora e terminador. O promotor corresponde a região de ligação da RNA polimerase para promover a transcrição, funcionando como um botão de “liga/desliga” da transcrição, dependendo do produto que está ligado a ela. As regiões codificadoras referem-se aos genes que são expressos, chamados de genes estruturais, eles possuem funções semelhantes e atuam na mesma via metabólica. A sequência terminadora sinaliza o término da transcrição pela polimerase, ou seja, o final da transcrição (Osbourn&Field, 2009).

Figura 8 - Esquema das regiões de um operon

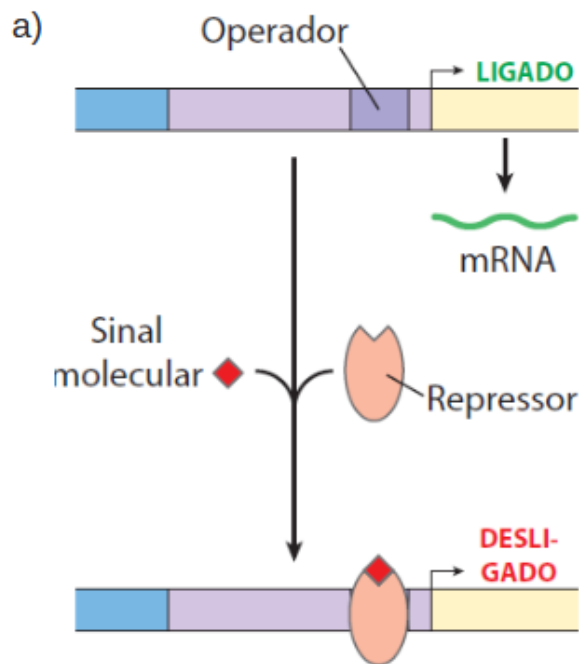


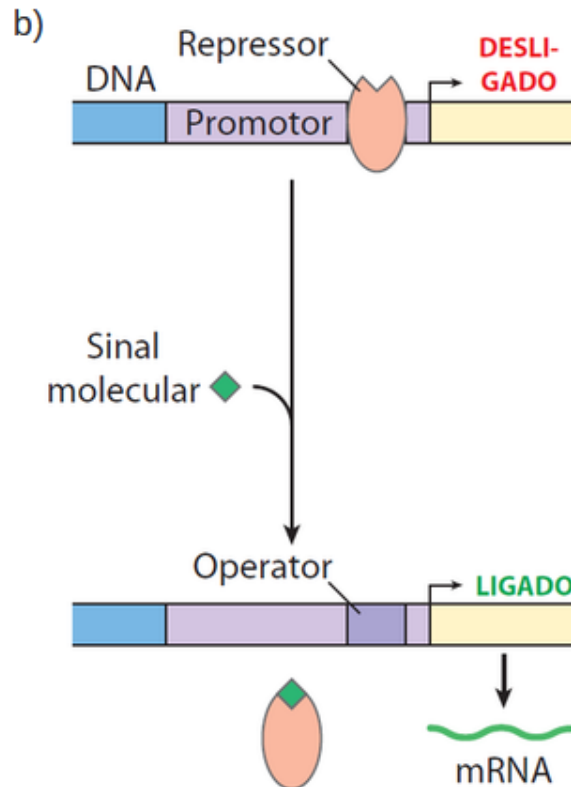
Fonte: Nelson&Cox, 2022.

Os genes presentes em um *operon* são transcritos em uma única molécula de RNA mensageiro policistrônico, permitindo que diferentes proteínas envolvidas na mesma função celular sejam produzidas de forma coordenada. Dependendo do mecanismo regulatório, um *operon* pode ser induzível ou repressivo. O *operon* induzível, sempre se encontra reprimido, até a presença de um indutor específico, enquanto os operons repressivos permanecem ativos até que a concentração do

produto final da via metabólica atinja níveis suficientes para interromper sua expressão (Berg et al, 2012) (Figura 9).

Figura 9 - **Funcionamento do operon.** (A) A proteína repressora se liga à região operadora impedindo a transcrição. (B) Na presença de um substrato indutor, ela se liga à proteína repressora, mudando a conformação do repressor e perdendo a capacidade de se ligar à região operadora, permitindo a transcrição dos genes estruturais





Fonte: Nelson&Cox, 2022.

Além da regulação específica exercida sobre determinados *operons*, as bactérias também apresentam mecanismos de regulação global. Enquanto a específica irá controlar a expressão de genes relacionados a funções metabólicas particulares, a regulação global coordena respostas mais amplas, desencadeadas pela disponibilidade de carbono, fosfato, danos ao DNA, diferenças de temperaturas e reações ao estresse celular. Essas respostas dependem da atuação integrada de múltiplos sistemas regulatórios (Oliveira, 2005).

Entre os diversos sistemas de regulação gênica, o *Operon Lac* destaca-se como o modelo mais estudado e compreendido. Ele representa um exemplo de *operon* induzível, em que a expressão gênica é controlada pela disponibilidade de lactose no meio. O *Operon Lac* serviu de base para o desenvolvimento de diversos sistemas de expressão utilizados na produção de proteínas recombinantes.

2.10 *Operon lac*

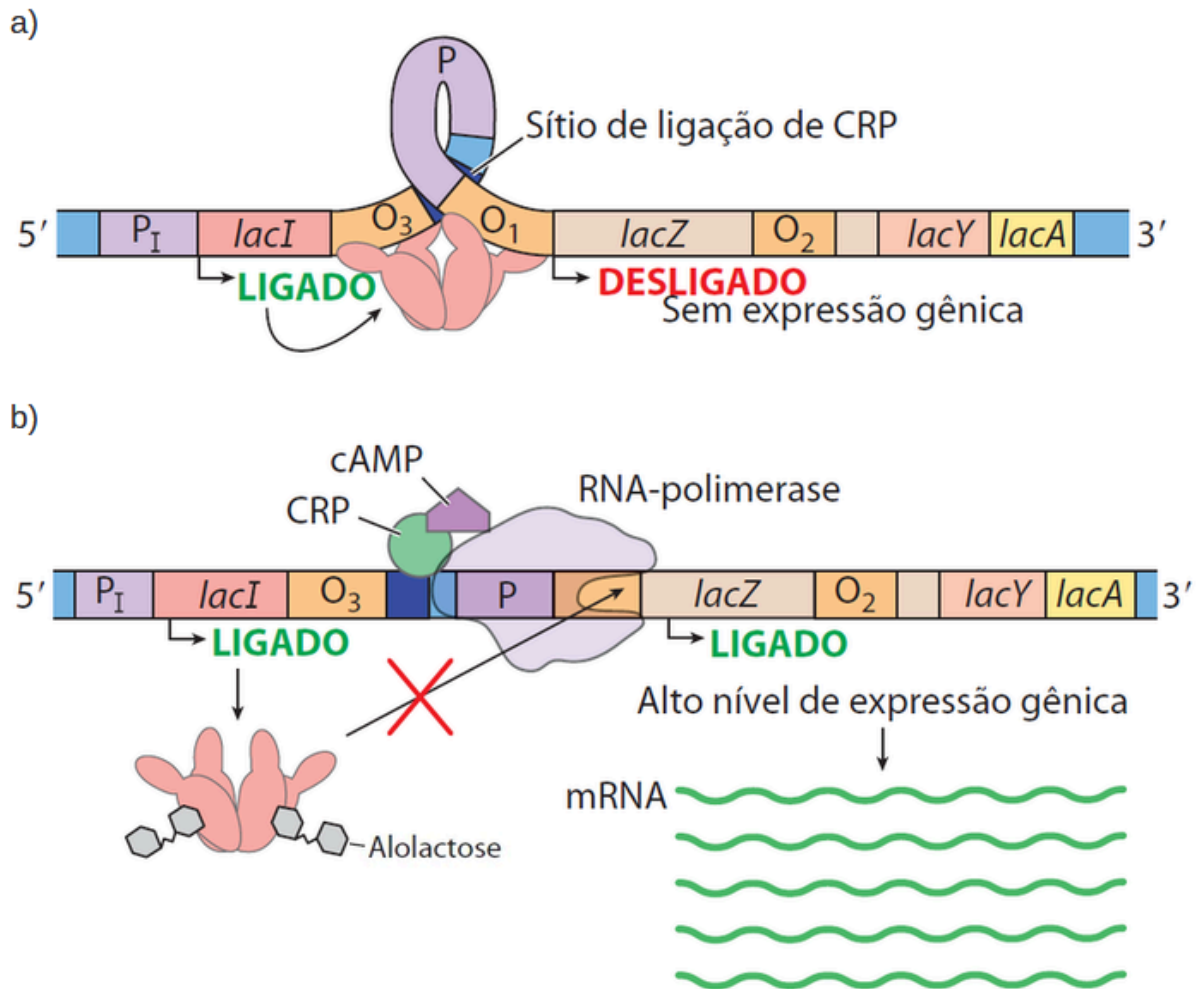
Como citado anteriormente, a expressão gênica é parte fundamental da Engenharia Genética, pois permite o controle da produção de proteínas de interesse por organismos, como bactérias. Nestes microrganismos, a expressão de genes é responsivo a alterações físicas e nutricionais do ambiente, sendo regulados por vias complexas, que garantem a adaptação celular às diferentes condições de crescimento. Entre esses mecanismos, destaca-se o *Operon Lac*, descrito inicialmente por Jacob e Monod em 1961, é considerado um dos modelos clássicos para o estudo da regulação gênica em procariotos (Velazco et al, 2021).

O *operon lac* é um dos elementos regulatórios mais estudados em *Escherichia coli* e consiste em três genes responsáveis pela síntese de três enzimas presentes no metabolismo da lactose: *lacZ*, que codifica a β -galactosidase; *lacY*, que codifica a β -galactoside permease; e *lacA*, responsável pela produção da galactoside-acetiltransferase.

Sua expressão é regulada por um promotor e por duas vias: CAP (proteína ativadora de catabolismo) e proteína repressora *lacI*. Quando há glicose no meio, não há necessidade de catalisar a lactose para o metabolismo celular da bactéria, logo, os níveis de cAMP (sinalização de fome celular) vão estar baixos e a proteína CAP não é ativada e não irá se ligar a região reguladora, resultando em baixos níveis de expressão do *operon lac* (Figura 10).

Em níveis baixos de glicose, os níveis de CAP irão aumentar, terá a conversão de lactose em alolactose pela β -galactosidade, que irá se ligar ao repressor e permitindo a expressão do *operon* (Lewis, 2013).

Figura 10 - **Esquema de funcionamento do operon lac e enzimas que influenciam a regulação.** A) Na ausência de lactose/IPTG e presença de glicose o sistema não é ativo, havendo a ação da proteína repressora que impede que a RNA polimerase faça a transcrição dos genes. B) Na presença de lactose/IPTG a região operadora fica livre, permitindo que a RNA polimerase faça a transcrição dos genes.



Fonte: Nelson&Cox, 2022.

Apesar de sua ampla utilização em sistemas de expressão heteróloga, versões sintéticas do *operon lac* são conhecidas por “vazar” (*leaky expression*) a expressão de proteínas heterólogas, ou seja, apresentam expressões basais não induzidas. Esse efeito ocorre, em parte, porque muitos sistemas artificiais apresentam apenas um sítio de ligação para o repressor *lacI*, somando com o fato que em *operons lac* nativos, a ligação simultânea do repressor a diferentes regiões da fita do DNA promove a formação de um laço, aumentando a eficiência da repressão e reduzindo a transcrição indesejada (Penumetcha et al, 2010).

Diferentes estratégias foram desenvolvidas para impedir esse “vazamento” de expressão, uma vez que a produção dessas proteínas recombinantes pode comprometer o crescimento celular e reduzir o rendimento do processo biotecnológico. Entre essas estratégias destacam-se a suplementação do meio de cultura com glicose para reforçar a repressão catabólica e a utilização de plasmídeos

que produzem a lisozima do bacteriófago T7, a lisozima liga-se a RNA polimerase do fago T7 e inibe a transcrição, diminuindo o “vazamento”.

Logo, o controle da expressão gênica é um dos principais fatores para o sucesso da produção heteróloga de proteínas, minimizando o estresse metabólico da célula hospedeira, otimizando o crescimento bacteriano ao mesmo tempo que aumenta o rendimento da proteína recombinante. Assim, a escolha adequada de sistema de expressão e das condições de indução são etapas fundamentais para o desenvolvimento biotecnológico.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

- Expressar a amilase nativa da espécie *Priestia koreensis* em *Escherichia coli* usando o *operon lac*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Subclonar o gene da α -amilase no vetor de expressão pDMU 02 e selecionar clones recombinantes
- Produzir a enzima e purificar da α -amilase recombinante
- Realizar ensaios enzimáticos a fim de obter as condições ótimas de atividade da enzima.
- Caracterizar os parâmetros cinéticos da α -amilase obtida.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Linhagem bacteriana

Foi usada a linhagem hospedeira JM110 da *Escherichia coli*, que apresenta o genótipo *rpsL (Str^r) thr leu thi-1 lacY galK galT ara tonA tsx dam dcm supE44 Δ(lac-proAB) [F traD36 proAB lacI^{qZΔM15]}*. Essa linhagem contém o gene *lacI*, responsável pela produção da proteína repressora LacI, cuja função é inibir a transcrição dos genes sob o controle dos promotores derivados do *operon lac*.

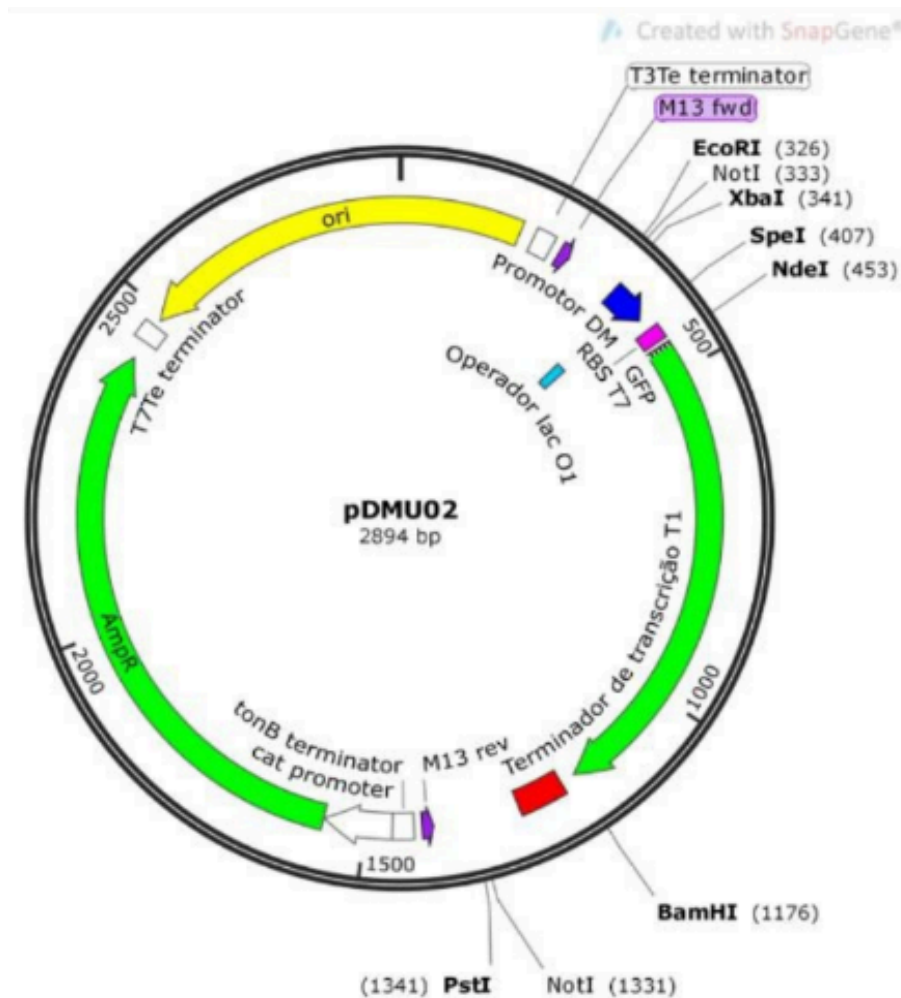
4.2 Plasmídeos utilizados

4.2.1 pDMU 02

O vetor escolhido para expressão da α -amilase foi o pDMU 02 que contém 2894 pares de bases, apresenta os sítios de enzimas de restrição *Bam*HI na posição 1176 e *Nde*I na 453. Possui como marcador de seleção o gene de resistência ao

antibiótico ampicilina, promotor DM com nível médio de força, além de origem de replicação com alto número de cópias (Moreira, 2016).

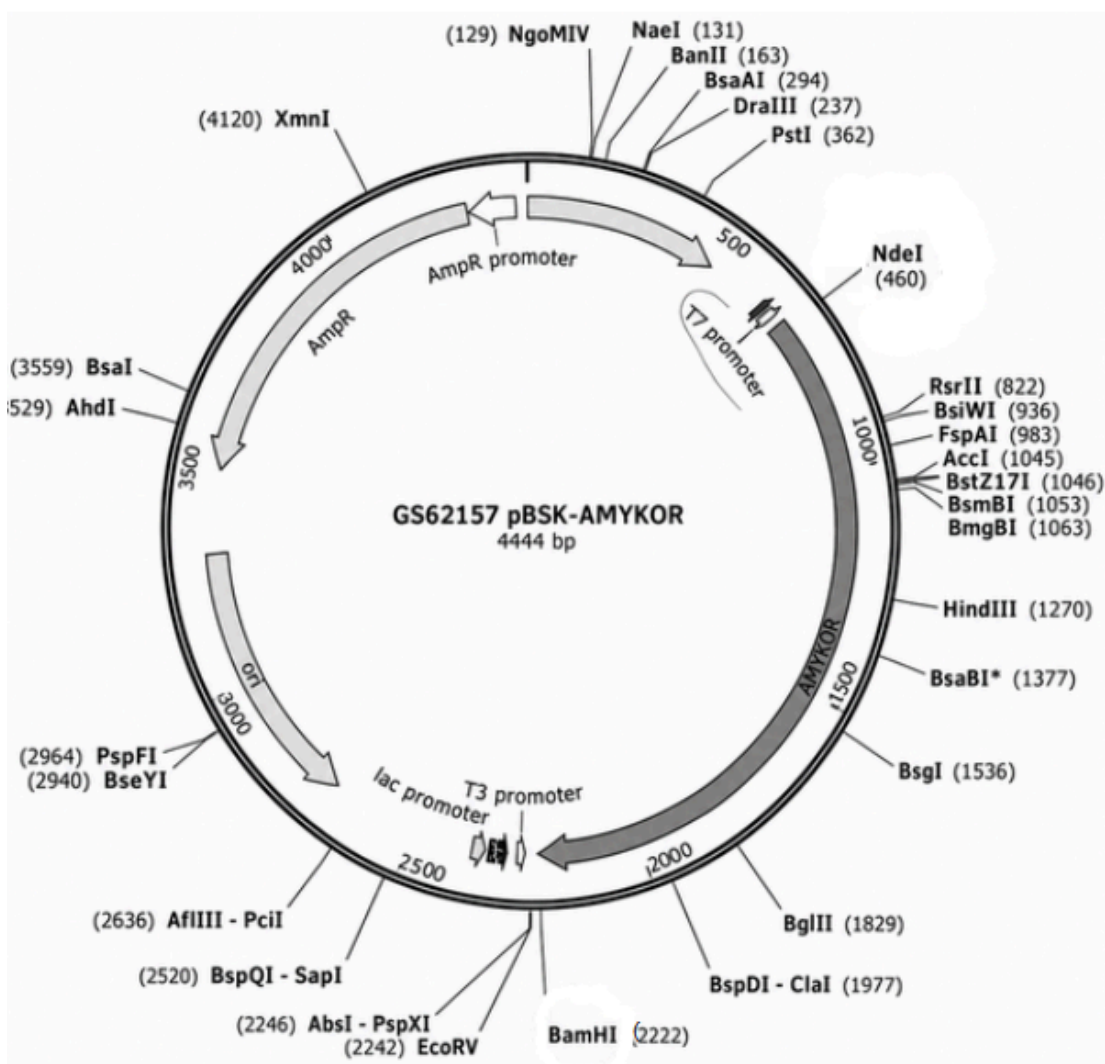
Figura 11 - **Mapa do vetor pDMU 02**. A figura contém os itens essenciais do plasmídeo: promotor DM, sítios de enzimas de restrição, operador *lac*, marcador de seleção para resistência a ampicilina e a origem de replicação.



4.2.2 pBSK-AMYKOR

O vetor para clonagem do gene α -amilase, pBSK-**AMYKOR** possui 4444 pares de bases, possuindo os sítios de enzimas de restrição *Bam*HI na posição 2222 e *Nde*I na 660. Possui o marcador de seleção para resistência a ampicilina (Neves, 2018).

Figura 12 - **Mapa do vetor pBSK-AMYKOR**. A figura contém os itens essenciais do plasmídeo: promotor T7, sítios de enzimas de restrição, promotor *lac*, marcador de seleção para resistência a ampicilina e a origem de replicação.



Fonte: Neves, 2018.

4.3 Transformação genética da bactéria JM110 com os vetores pBSKAMYKOR e pDMU 02

A transformação genética da linhagem JM110 da *E. coli* com os plasmídeos pBSKAMYKOR e, posteriormente, pDMU 02 foi realizada pelo método de eletroporação; Após a transformação, as células foram plaqueadas em meio LB suplementado com 100 µg/mL de ampicilina, sendo posteriormente incubadas a 37°C por 16 h (Sambrook et al., 2001).

Para a seleção das colônias recombinantes do plasmídeo pDMU 02, o meio de cultura foi suplementado com 0,5% de glicose além do antibiótico 100 µg/mL de

ampicilina, com o objetivo de reprimir a expressão basal do sistema regulado por *operon lac* (Laksmi et al, 2023).

4.4 Extração plasmidial do plasmídeo pBSKAMYKOR e pDMU 02 com gene e digestão enzimática dos plasmídeos

As extrações plasmidiais dos vetores BSKAMYKOR e PDMU 02 foram realizadas utilizando o kit PureYield™ Plasmid Miniprep System (Promega), seguindo as informações fornecidas pelo fabricante. Após a extração, a fim de obter o gene da α -amilase (Amy) e o vetor (pDMU 02) sem o gene da GFP, foi feita a dupla digestão enzimática com as endonucleases de restrição *Bam*HI e *Nde*I.

Os produtos da extração e da digestão enzimática foram analisados por meio de eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio, conforme descrito em Sambrook&Russel, 2001. Esperava-se ver duas bandas de cada plasmídeo, do pDMU02 contendo 720 pares de bases e 2100 pares de bases, e do pBSK-AMYKOR com cerca de 1700 pares de bases e 2500 pares de bases.

4.5 Construção do vetor pDMU02-AMY

O plasmídeo PDMU 02 possui os sítios das enzimas de restrição *Bam*HI e *Nde*I flanqueando o gene da GFP de 720 pares de bases, que foi removido por digestão enzimática com essas endonucleases. Após a digestão, os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de agarose 0,8% e o vetor linearizado (pDMU 02 sem o gene da GFP) foi purificado utilizando o kit ReliaPrep™ DNA Clean-Up and Concentration System (Promega), seguindo as instruções do fabricante.

De maneira semelhante, o vetor pBSKAMYKOR também apresenta os sítios das enzimas *Bam*HI e *Nde*I flanqueando o gene AMYKOR de 1700 pares de bases. Após a digestão com as mesmas enzimas, o fragmento correspondente ao gene AMYKOR foi purificado a partir de gel de agarose 0,8% utilizando o mesmo kit.

Após a purificação do vetor (pDMU 02 linearizado sem o gene de GFP) e do inserto (AMYKOR) foi realizada a reação de ligação com a enzima ligase contendo o tampão da enzima 10x, vetor pDMU 02 (30 ng) e inserto AMYKOR (11 ng), como pode ser visto na tabela 2. Em seguida, a reação foi incubada a 16°C por 18h.

Posteriormente, o DNA ligado foi precipitado, utilizando 1 ug glicogênio , NaCl (3 M) e etanol, sendo incubado novamente a -20°C por mais 18h (Sambrook et al, 2001).

Após incubação, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 30 min a 4°C. O pellet obtido foi lavado com etanol 70% e repetiu-se a centrifugação 14.000 rpm por 30 min a 4°C. Em seguida, o DNA foi seco sob fluxo de ar em fluxo laminar e ressuspendido em 3 µL de água MilliQ.

Foi usado 1,5 µL do plasmídeo recombinante pDMU02-AMY para transformação em células JM110, posteriormente foram semeadas em placa de petri com meio de crescimento sólido LB, glicose 0,5% e ampicilina 100 ug/mL.

Tabela 2 - Sistema utilizado para ligar o vetor pDMU 02 com o inserto AMYKOR.

Reagentes	Volume (µL)
H ₂ O	4
Tp. de ligase 10x	1
pDMU02 linearizado (30 ng)	1
AMYKOR (11 ng)	3
Ligase (100 U/ µL	1
Total	10

4.6 Seleção das colônias recombinantes

Após a transformação genética com o plasmídeo recombinante pDMU02-AMY, foi feita a seleção das colônias recombinantes. Para isso, as colônias obtidas foram repicadas em sistema de *grid* em placas de petri contendo meio LB sólido suplementado com glicose 0,5%, ampicilina 100 ng/mL e amido 1%. As colônias recombinantes foram identificadas pela formação de halos de degradação do amido ao redor das colônias recombinantes, as quais foram reveladas por vapor de iodo (Costa, Abreu-Lima&Carreiro, 2011).

Com o objetivo de analisar a expressão do gene AMY, foram preparadas 4 placas de petri contendo meio LB sólido suplementado com ampicilina 100 ug/mL e amido 1%, sob diferentes condições de indução e repressão. A placa 1 continha

glicose 0,5%, a placa 2 não continha glicose 0,5% e foi suplementada com IPTG 1 mM, a placa 3 continha glicose 0,5% e de IPTG 1mM e a placa 4 não continha glicose nem IPTG. As placas foram incubadas a 37°C por 16 h e, posteriormente, foram reveladas por vapor de iodo para visualização dos halos de hidrólise do amido

4.7 Avaliação da expressão a partir do vetor pDMU 02 - AMY sob diferentes concentrações de indutor

Com o objetivo de avaliar a expressão gênica do plasmídeo recombinante pDMU 02-AMY foi feito um pré-inóculo a partir de uma colônia recombinante em meio líquido LB suplementado com 100 ug/mL de ampicilina e 0,5% de glicose. Após incubação a 37° C, sob agitação de 160 rpm por 16 h, foi transferido uma alíquota de 1mL da cultura para cinco erlenmeyers contendo 50 mL de meio LB líquido suplementado com antibiótico e 0,5% de amido.

Foi feita a monitoração do crescimento bacteriano a cada hora em espectrofotômetro no comprimento de onda 600 nm. Quando a cultura atingiu a densidade óptica de aproximadamente 0,6 OD600nm, foram adicionadas concentrações de 0,1; 0,2; 0,3, 0,5 e 1 mM de IPTG em cada um dos erlenmeyers.

As culturas permaneceram incubadas por aproximadamente de 10 h, onde a cada 2h30 foram coletados 500 uL da cultura bacteriana e adicionados 500 µL do reagente FUWA, com o objetivo de avaliar a degradação do amido presente no meio de cultura.

Após a avaliação de melhor quantidade de IPTG, analisou-se também se as concentrações de 0,25 e 0,35 mM de IPTG afetariam a produção enzimática.

4.8 Expressão da α -amilase pelo vetor pDMU 02-AMY

Após a avaliação de indução do plasmídeo pDMU 02-AMY em diferentes concentrações do indutor, a concentração de 0,3 mM de IPTG foi selecionada para os experimentos subsequentes. Novamente, colônias recombinantes foram selecionadas e utilizadas no pré-inóculo em meio LB líquido suplementadas com 100 ug/mL de ampicilina e 0,5% de glicose. As células foram incubadas a 37°C, sob agitação de 160 rpm por 16 h.

Em seguida, foi transferido 1mL do pré-inóculo para 50mL de meio LB líquido, suplementado com 100 ug/mL de ampicilina e 0,5% de amido. Monitorou-se o crescimento bacteriano e quando atingiu a densidade óptica de 0,6 OD_{600nm} foi adicionado 0,3 mM de IPTG. O crescimento continuou por cerca de 10 h, onde a cada 2h30 foi coletado 500uL da cultura e adicionado 500uL do reagente FUWA, a fim de monitorar a degradação do amido presente no meio de cultura.

Ao término da expressão genética, a cultura foi centrifugada a 10.000 rpm por 30 min, a 4°C. O *pellet* bacteriano foi separado do sobrenadante contendo o extrato enzimático bruto, o qual foi armazenado a 4°C para futuras análises da atividade enzimática.

4.9 Precipitação com Acetona P.A

Após produção e recuperação da enzima por centrifugação, o extrato enzimático bruto foi precipitado com acetona P.A, na proporção 3:1 com o objetivo de concentrar as proteínas e possibilitar as análises da α -amilase. Para isso, o volume do extrato enzimático bruto foi dividido em 5 tubos falcons de 50 mL, contendo 10 mL do extrato enzimático em cada tubo, e foram adicionados 30 mL de acetona PA (Sadunishvili, 2019).

Os tubos falcon foram incubados a -20 °C por 16 h e, posteriormente, foram centrifugados a 10. 000 rpm por 30 min a 4° C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e os pellets formados de proteínas precipitadas foram secos sob fluxo laminar. Em seguida, os pellets secos foram ressuspensos em 1 mL de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5.5.

4.10 Estudo da atividade enzimática da α -amilase produzida pelo vetor pDMU02-AMY

A atividade físico-química e bioquímica da α -amilase recombinante produzida por *Escherichia coli* e precipitada com acetona P.A foi determinada pelo método iodométrico descrito por FUWA (1954). Para a caracterização bioquímica, foi construída uma curva padrão utilizando diferentes concentrações de amido (Tabela 3)

As reações foram feitas em triplicatas, contendo 40 μ L de amido previamente diluído, 40 μ L do tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5.5, 40 μ L de ácido acético 1 M,

40 µL do reagente FUWA e 1.880 mL de água destilada. Após o preparo das reações, as absorbâncias foram lidas por espectrofotômetro no comprimento de onda 660 nm.

Com os valores das absorbâncias obtidas a partir das diferentes concentrações de amido, foi construída a curva padrão e determinou-se a equação da reta, sendo utilizada para quantificar a hidrólise do amido nas análises enzimáticas posteriores.

Tabela 3 - Concentrações de amido e água destilada para construção da equação da reta.

Amido 1%	H ₂ O
500 µL	500 µL
450 µL	550 µL
400 µL	600 µL
350 µL	650 µL
300 µL	700 µL
250 µL	750 µL
200 µL	800 µL
150 µL	850 µL
100 µL	900 µL

Fonte: compilação do autor.

4.11 Velocidade da reação da α -amilase pDMU 02 - AMY

Para a determinação da curva de progresso da reação enzimática da α -amilase, foram feitas reações em triplicatas utilizando 1% de amido, diferentes concentrações do extrato enzimático (2 a 12 µL) e tampão acetato de sódio 50 mM pH 5 (Tabela 4).

As reações foram incubadas e ao término de cada período, a reação foi interrompida pela adição de 40 µL de ácido acético, seguida da adição de 40 µL do reagente FUWA. Posteriormente a leitura das absorbâncias de cada reação foi feita em espectrofotômetro a 660 nm. As reações foram incubadas com o tempo de 0 até 120 min a fim de também averiguar o tempo ideal da atividade enzimática.

Tabela 4 - Concentrações de amido, tampão e extrato enzimático para construção da curva de reação da enzima.

Reação	Amido 1% (μL)	Tampão (μL)	Enzima (μL)
1	20	8	12
2	20	14	6
3	20	18	2

Fonte: compilação do autor.

4.12 Determinação da temperatura ótima da α-amilase

A determinação da temperatura ótima da enzima foi realizada avaliando a atividade enzimática em temperaturas variando de 0° C a 100° C. As reações foram preparadas seguindo a tabela 5.

As reações foram incubadas nas diferentes temperaturas por 10 minutos. Ao término da incubação, as reações foram interrompidas pela adição de 40 μL de ácido acético, seguida da adição de 40 μL do reagente FUWA e 1.800 mL de água destilada. As reações foram homogeneizadas e as absorbâncias foram feitas em espectrofotômetro no comprimento de onda a 660 nm.

Tabela 5 - Concentração de amido, tampão e extrato enzimático para as reações enzimáticas.

Amido 1% (μL)	Tampão (μL)	Enzima (μL)
20	8	12

Fonte: compilação do autor.

4.13 Determinação do pH ótimo da α-amilase

Para determinar o pH ótimo da enzima, foi feita avaliando a atividade enzimática em diferentes condições de pH, variando de 3,0 a 12,0. As reações foram preparadas seguindo a tabela 5. O tampão utilizado seguiu o descrito em Oliveira (2009) composto por glicina 50 mM, ácido acético 50 mM e fosfato de sódio dibásico 50 mM, ajustando aos diferentes valores de pH.

Em seguida a reação foi incubada por 20 minutos a 60°C. Ao término do tempo, as reações foram paradas com adição de 80 µL de ácido acético, 80 µL do reagente FUWA e 1800 mL de água destilada. As reações foram homogeneizadas e foi feita a leitura em espectrofotômetro em comprimento de onda 660 nm.

4.14 Termoestabilidade da enzima α -amilase

A termoestabilidade da α -amilase foi avaliada por meio de incubação do extrato enzimático em microtubos nas temperaturas de 50, 60, 70, 80° e 100° C, durante diferentes intervalos de tempo (0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 e 120 minutos). Ao final de cada tempo de incubação, uma alíquota do extrato enzimático foi retirado para determinação da atividade enzimática.

O ensaio enzimático foi realizado utilizando 20 µL de amido 1%, 12 µL de extrato enzimático e 8 µL de acetato de sódio 50 mM pH 5.5. As reações foram incubadas a 60° C por 10 min. Após esse período, as reações foram interrompidas com adição de 80 µL de ácido acético 1M e 80 µL do reagente FUWA.

As absorbâncias foram determinadas por espectrofotometria no comprimento de onda 660 nm e a atividade enzimática residual foi comparada em relação à atividade da enzima incubada por 0 min.

4.15 SDS-PAGE

Após a confirmação da expressão da α -amilase e determinação das condições ótimas de atividade do extrato enzimático bruto, foi realizado eletroforese em gel de SDS-PAGE no sistema Tris-Glicina, com o objetivo de analisar quantitativamente a produção e precipitação da enzima.

Para o preparo das amostras, uma alíquota de 30 µL do extrato enzimático foi misturada com 10 µL de tampão de corrida 5x contendo azul de bromofenol. As amostras foram fervidas a 100°C durante 10 minutos e, posteriormente, foram aplicados 10 µL de cada amostra nos poços de em um gel de poliacrilamida 12%. Foram aplicados 4 mL do mix de gel 12% e 1mL do mix de 5%.

Os *pellets* do controle negativo (pDMU02 íntegro) foram recuperados com 60 µL de PBS e foi retirado uma alíquota de 30 µL de cada. As alíquotas foram misturadas com 10 µL de tampão de corrida 5x e foram fervidas a 100°C durante 10 minutos. Foram aplicadas 10 µL de cada controle negativo.

A corrida eletroforética foi realizada a 200 volts, 25 mA e 150 Watts por aproximadamente 45 minutos. Em seguida, o gel foi submetido à coloração com a solução corante contendo *Coomassie Blue* por 40 minutos. Após esse período, o gel foi lavado com água destilada e colocado em solução descolorante por 2 h. Após a descoloração, o gel foi lavado novamente com água destilada e foi feita a visualização das bandas proteicas.

4. 16 Cromatografia de troca iônica em coluna HiTrap FF

Após análise do extrato enzimático bruto em SDS-PAGE, foi feita a purificação da α -amilase por cromatografia de troca iônica (Muller, 2008) utilizando colunas HiTrap Q FF 5 x 1 mL (cytiva), previamente equilibradas com tampão Tris HCl 20 mM pH 8.

Para a purificação, 5 mL do extrato enzimático precipitado foram aplicados à coluna e as proteínas foram eluídas utilizando o tampão Tris HCl 20 mM contendo NaCl 1 M pH 8. As frações eluídas foram coletadas em volumes de 2 mL em temperatura ambiente.

A atividade enzimática das frações coletadas foi determinada utilizando o teste de FUWA (1954). As frações que apresentaram atividades amilolíticas foram submetidas em gel de SDS-PAGE para analisar qualitativamente o grau de purificação da α -amilase.

4. 17 Determinação dos Parâmetros cinética enzimáticos K_m e V_{max}

Os parâmetros cinéticos enzimáticos da α -amilase foram determinados utilizando as condições ótimas previamente estabelecidas de pH e temperatura. A atividade enzimática foi avaliada de acordo com o método iodométrico descrito por FUWA (1954).

Para as reações enzimáticas, foram utilizadas diferentes concentrações de amido solúvel (Êxodo Científica), variando de 0,1 a 1,5 mg/mL do substrato. Os dados obtidos foram utilizados para construção da curva de velocidade inicial da reação em função da concentração de substrato, segundo o modelo de Michaelis-Menten. Posteriormente, os dados foram linearizados pelo método de Lineweaver-Burk,

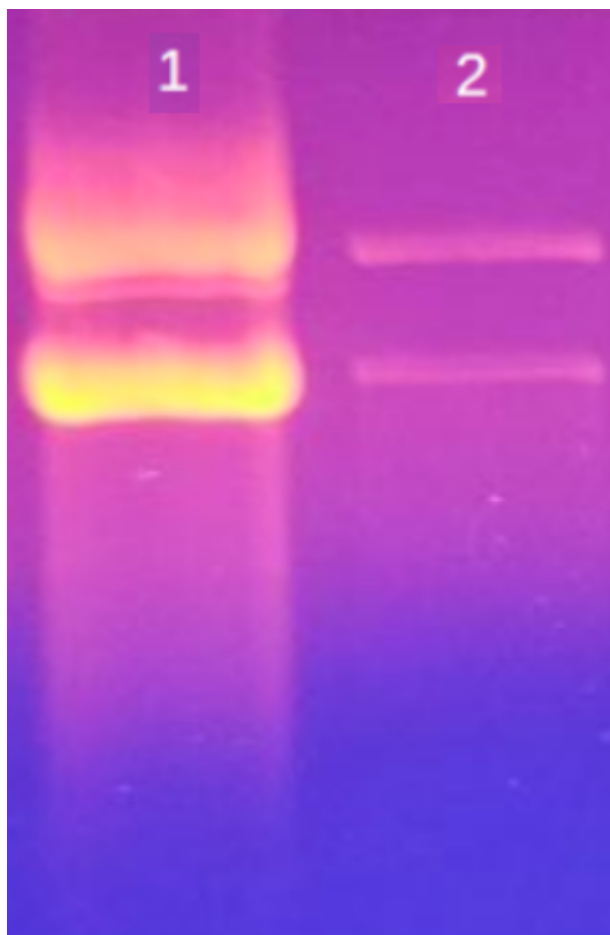
permitindo a determinação dos parâmetros cinéticos aparentes, K_m e V_{max} (Muller, 2008).

5. RESULTADOS

5.1 Transformação genética, extração plasmidial e análise do vetor com endonucleases de restrição

Os vetores pBSKAMY e PDMU02 foram introduzidos nas células eletrocompetentes de *E. coli* JM110 por meio da técnica de eletroporação e foi feita a extração dos plasmídeos. Na figura 13, podemos visualizar os plasmídeos em diferentes conformações.

Figura 13 - Análise eletroforética, em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio. 1. pDMU 02/ 2. pBSK-AMY



Fonte: compilação do autor

Posteriormente, com as amostras dos plasmídeos extraídos, foi feita a reação de digestão enzimática para confirmação dos sítios de restrição, retirada do gene Amy

e obtenção do vetor pDMU2. O resultado da digestão foi visualizado em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio e com o auxílio da luz UV, apresentado na Figura 14 .

Figura 14 - **Perfil eletroforético da digestão enzimática dos plasmídeos pDMU 02 e pBSKAMY.** 1.

Controle negativo pDMU 02/ 2. pDMU 02 digerido com BamHI/ 3. pDMU 02 digerido com NdeI/ 4.

pDMU digerido com BamHI/NdeI, liberando a proteína GFP com cerca de 720 pares de base/

5.Marcador molecular/ 6. Controle negativo pBSKAMY/ 7. pBSAMY digerido com NdeI/ 8. pBSKAMY digerido com BamHI/ 9. pBSKAMY digerido com BamHI e NdeI liberando o gene AMY com pouco mais de 1500 pares de base.



Fonte: compilação do autor.

No poço 4, podemos visualizar a liberação de um fragmento com cerca de 750 pares de bases, referente ao gene da proteína GFP, após a digestão dupla com as enzimas BamHI e NdeI, e liberação do vetor pDMU 02 linearizado.

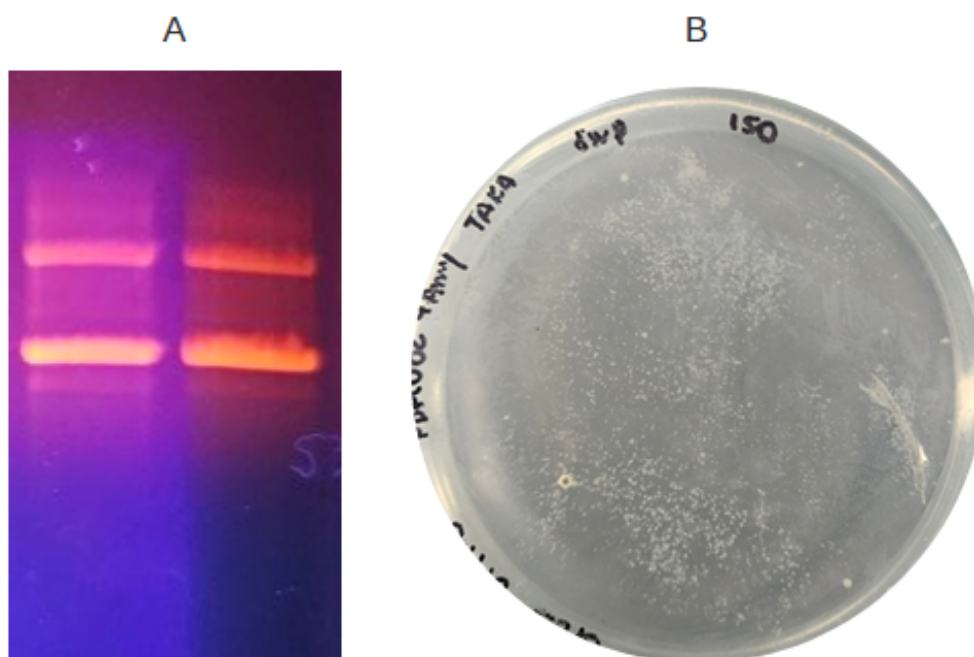
No poço 9, há a liberação de um fragmento com cerca de 1500 pares de bases, referente ao gene da α -amilase, assim como a linearização do plasmídeo pBSKAMY.

5.2 Ligação do vetor pDMU 02 sem GFP com o gene Amy e transformação do plasmídeo pDMU02-AMY

Após liberação dos fragmentos, o vetor linearizado pDMU02 e o gene Amy foram purificados e foi feita a reação de ligação do DNA. Feita a ligação do vetor de expressão pDMU02 com o gene codificador da α -amilase e a transformação genética das células de *E. coli* JM110 foram obtidas as colônias recombinantes (Figura 15B).

As colônias isoladas foram escolhidas para o pré-inóculo e em seguida foi feita a extração do plasmídeo recombinante pDMU02-AMY, como mostrado na Figura 15A.

Figura 15 - (A) Perfil eletroforético do vetor recombinante pDMU02-AMY e (B) placa com clones recombinantes.



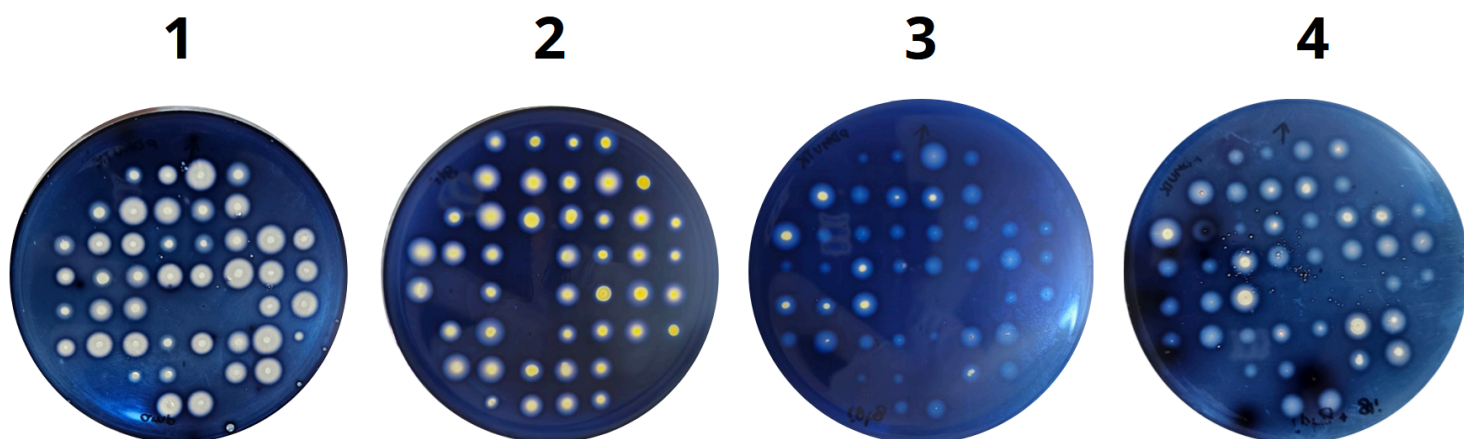
Fonte: compilação do autor.

5.3 Seleção dos clones recombinantes e análise da regulação da expressão gênica do plasmídeo recombinante

Nas placas de petri suplementadas com amido, foi possível confirmar a expressão gênica do plasmídeo recombinante pDMU02-AMY, por meio da presença de halos de degradação de amido ao redor das colônias, resultantes da atividade

amilolítica da α -amilase. Após a revelação com vapor de iodo, observou-se uma variação nos halos formados, indicando diferença nos níveis de expressão enzimática das colônias escolhidas (Figura 16). Para o restante do trabalho preferiu-se sempre as colônias com maiores halos de degradação de amido.

Figura 16 - Análise da expressão da α -amilase em meio LB suplementado com amido 1% e antibiótico e presença ou ausência de glicose 0,5%/IPTG 1 mM. 1 - somente antibiótico (ausência de glicose e IPTG)/ 2. somente glicose 0,5%/ 3. somente IPTG 1mM./ 4. presença de IPTG 1 mM e glicose 0,5%



Fonte: compilação do autor.

Observou-se que as placas contendo apenas antibiótico (1) e glicose 0,5% (2) apresentaram halos de degradação do amido maiores quando comparadas às placas suplementadas com IPTG (placas 3 e 4), muito provavelmente sendo o “vazamento”, ou expressão basal, relatado em Lozano Terol et al (2021).

Além de possuírem halos com diâmetros maiores, verificou-se que algumas colônias também apresentaram um maior crescimento. Esse resultado pode estar relacionado com a toxicidade do indutor (IPTG) e ao estresse metabólico causado pela super produção da α -amilase, permitindo maior crescimento bacteriano e, conseqüentemente, uma maior degradação do amido suplementado no meio de cultura. Em Briand et al (2016) a toxicidade do IPTG é comentada como um dos problemas ao se trabalhar com promotores baseados no *operon lac*, incluindo a necessidade de encontrar as condições (concentrações de indutor) ideais para a expressão heteróloga.

A adição do IPTG também pode ter promovido uma superexpressão da enzima no começo do crescimento bacteriano, resultando em um grande estresse metabólico, redução do desenvolvimento celular e, portanto, a diminuição da quantidade de enzima produzida ao longo do tempo de incubação. De acordo com Li&Rinas (2020), a alta produção de proteínas recombinantes em *E. coli* tem como consequência um lento crescimento celular, conhecido como carga metabólica.

Dessa forma, para dar continuidade ao trabalho e obter uma produção mais robusta da α -amilase, optou-se por realizar cultivos em meio líquido utilizando diferentes concentrações de IPTG, a fim de determinar a condição de indução mais adequada para maior produção da α -amilase.

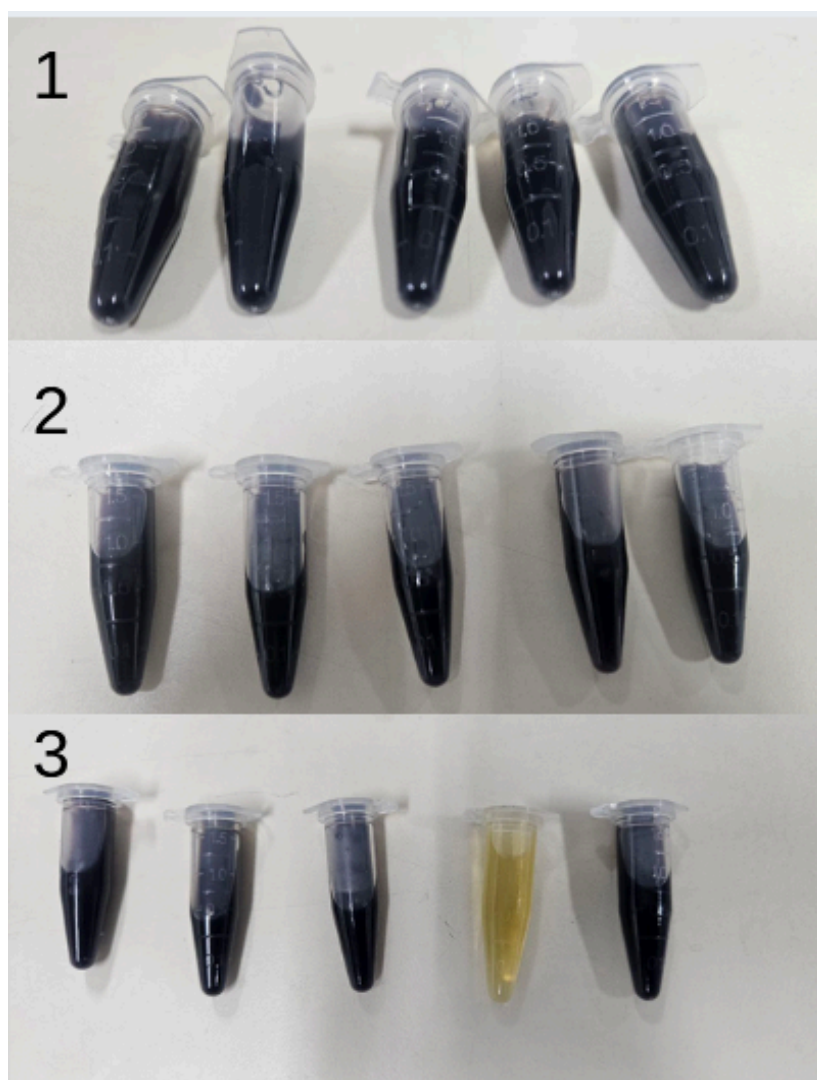
5.4 Avaliação da expressão da α -amilase produzida pelo vetor pDMU 02 - AMY

Após a análise do comportamento do vetor recombinante em JM110 sob diferentes condições de cultivo, notou-se que a concentração de 1 mM de IPTG afetou negativamente o crescimento bacteriano e a produção da α -amilase, causando grande estresse metabólico por estar em concentrações altas.

Logo, as concentrações menores de IPTG foram escolhidas (1,; 0,1; 0,2; 0,3 e 0,5 mM), com o objetivo de determinar as condições mais adequadas para a produção da α -amilase. Os resultados podem ser visualizados na Figura 17.

Figura 17 - **Análise da expressão em meio líquido da α -amilase.** 1. 2h30 após adição do IPTG 0,3 mM/ 2. 5h após adição do IPTG/ 3. 10h após adição do IPTG.

Da esquerda pra direita: 1; 0,1; 0,2; 0,3 e 0,5 mM de IPTG.



Fonte: compilação do autor.

Observou-se que, durante as primeiras 5 h de cultivo, não houve degradação do amido presente no meio, logo, não houve secreção da α -amilase em quantidades detectáveis. Mas após 10 h de cultivo, a cultura em que foi adicionado 0,3 mM do indutor apresentou uma degradação considerável do amido, evidenciando uma maior produção da α -amilase sob essa condição.

Esses resultados indicaram que a concentração de 0,3 mM de IPTG seria a mais adequada para a expressão heteróloga da α -amilase, e adotou-se essa quantidade nas subseqüentes produções enzimáticas.

O uso de amido como substrato na produção da α -amilase tem sido relatado. Em Ashraf et al (2003), foi usado a concentração de 1% de amido na produção da enzima por *Bacillus licheniformis*. Matthew et al (2016) relatou o uso de diferentes

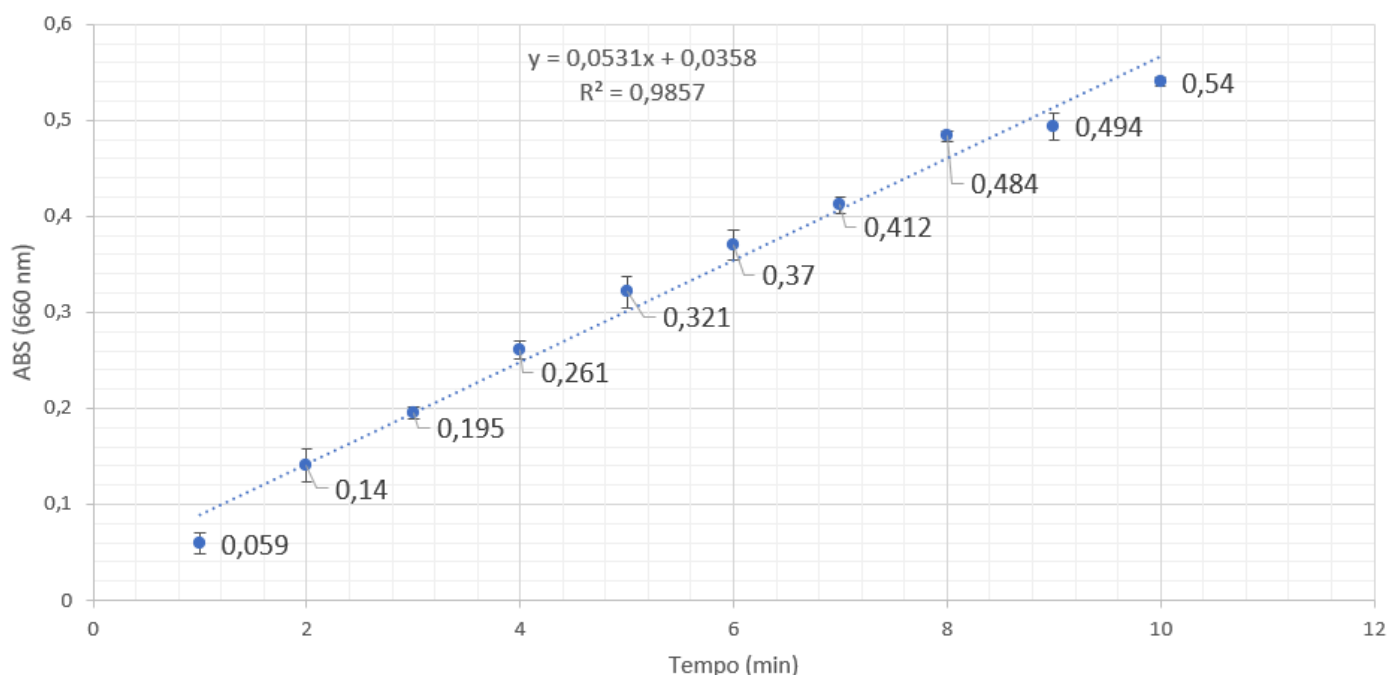
substratos como água de arroz, tapioca e batata, todos substratos contendo o carboidrato como suplementos no meio de cultura.

Em Božić et al (2011) relata-se que a concentração de 0,5% de amido como substrato no meio de cultura resultou na maior produção da α -amilase por *B. licheniformis* após cerca de 8 h de cultivo. Concentrações maiores que 0,5% não resultaram em melhor produção enzimática, relatando menor atividade enzimática no meio de cultura, provavelmente devido a viscosidade do meio causada pelo amido, o que acaba interferindo na transferência de oxigênio, consequentemente, prejudicando o crescimento bacteriano.

5.5 Determinação da atividade enzimática

Para determinação da atividade enzimática da α -amilase precipitada com acetona P.A., foi construída a curva de calibração de amido utilizando diferentes concentrações de amido. A partir dos dados obtidos, foi gerada a equação da reta $y = 0,0531x + 0,0358$ (figura 18), a qual foi utilizada para determinar as concentrações de amido inicial e amido residual das seguintes reações enzimáticas. O cálculo para o amido hidrolisado é calculado pela diferença dos valores da concentração inicial e a concentração residual do amido.

Figura 18 - Curva de calibração do amido.

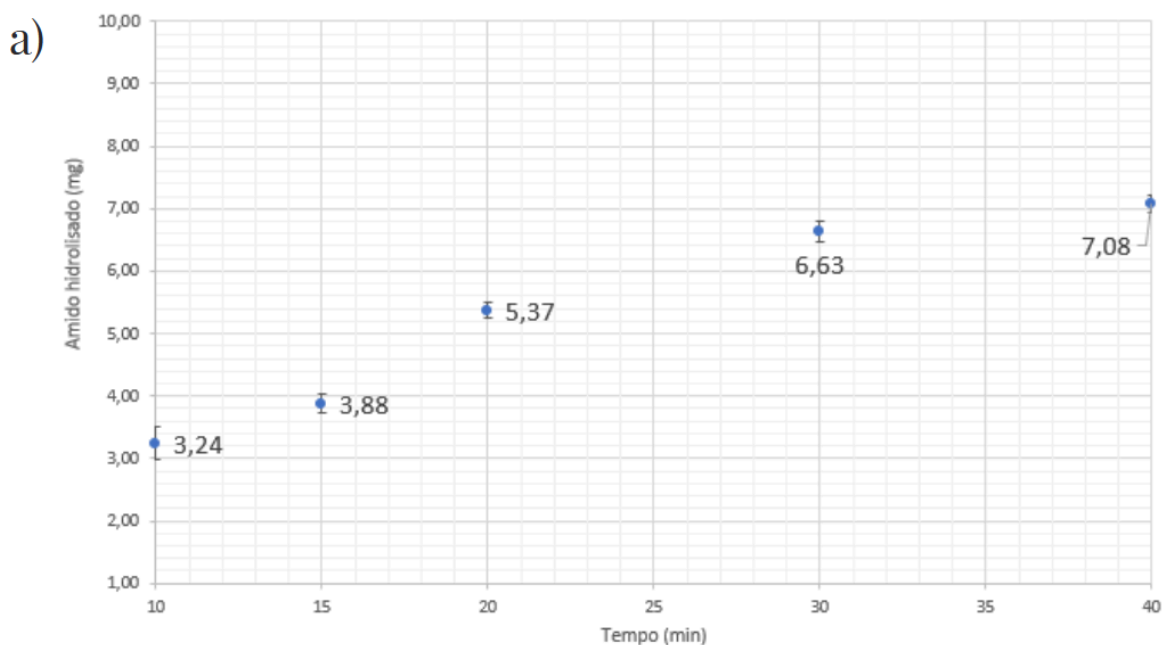


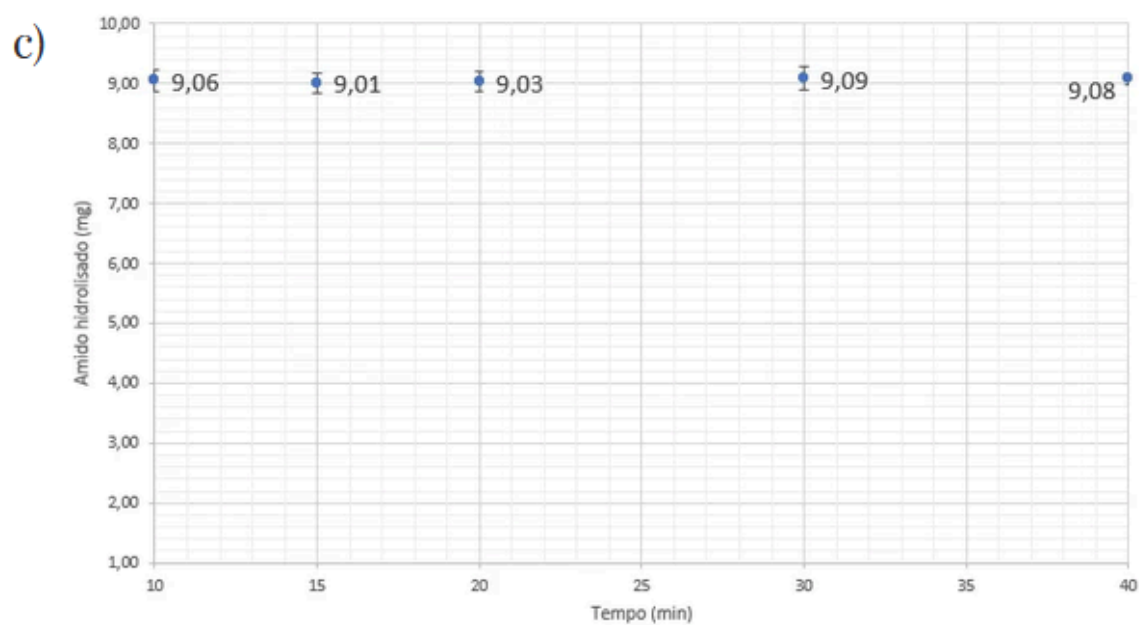
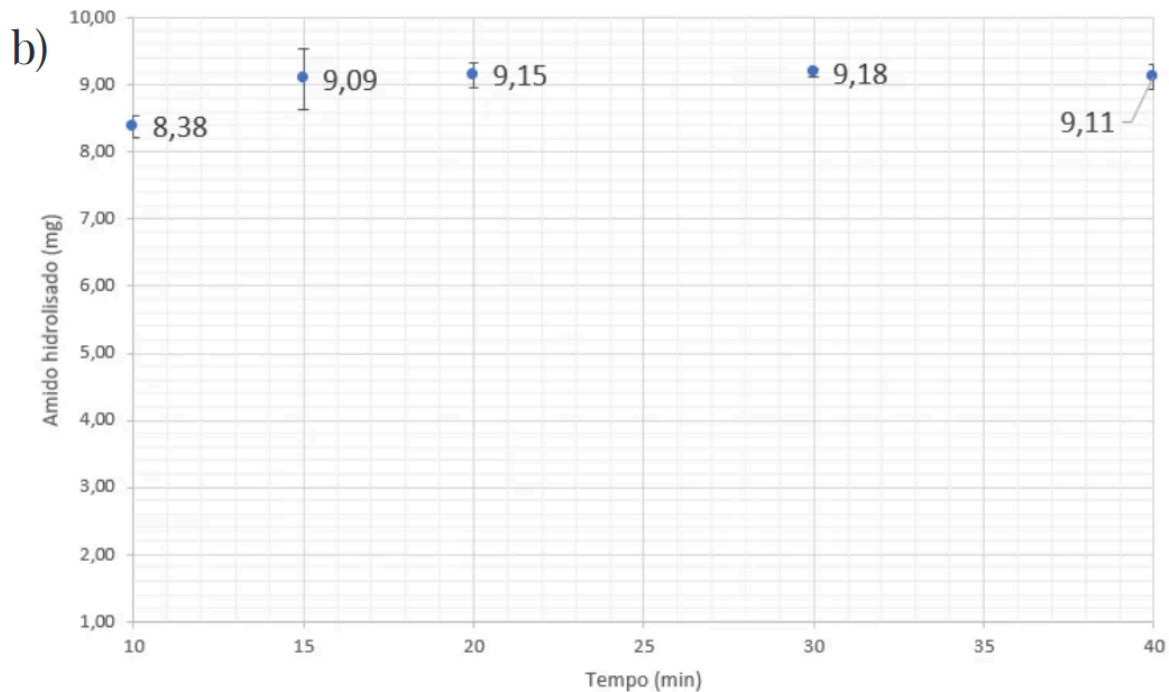
Fonte: compilação do autor

5.6 Velocidade da reação da α -amilase

Analizando a velocidade da reação da α -amilase percebeu-se que as concentrações de 6 μL (figura 19b) e 12 μL (figura 19c) de extrato enzimático precipitado com acetona P.A foram eficientes na hidrólise do amido, degradando todo o substrato em poucos minutos de reação. Logo, a quantidade de 2 μL e 6 μL são as ideais para as reações enzimáticas.

Figura 19 - **Velocidade da reação da α -amilase.** a) reação com 2 μL de α -amilase/ b) reação com 6 μL de enzima/ c) reação com 12 μL de enzima.





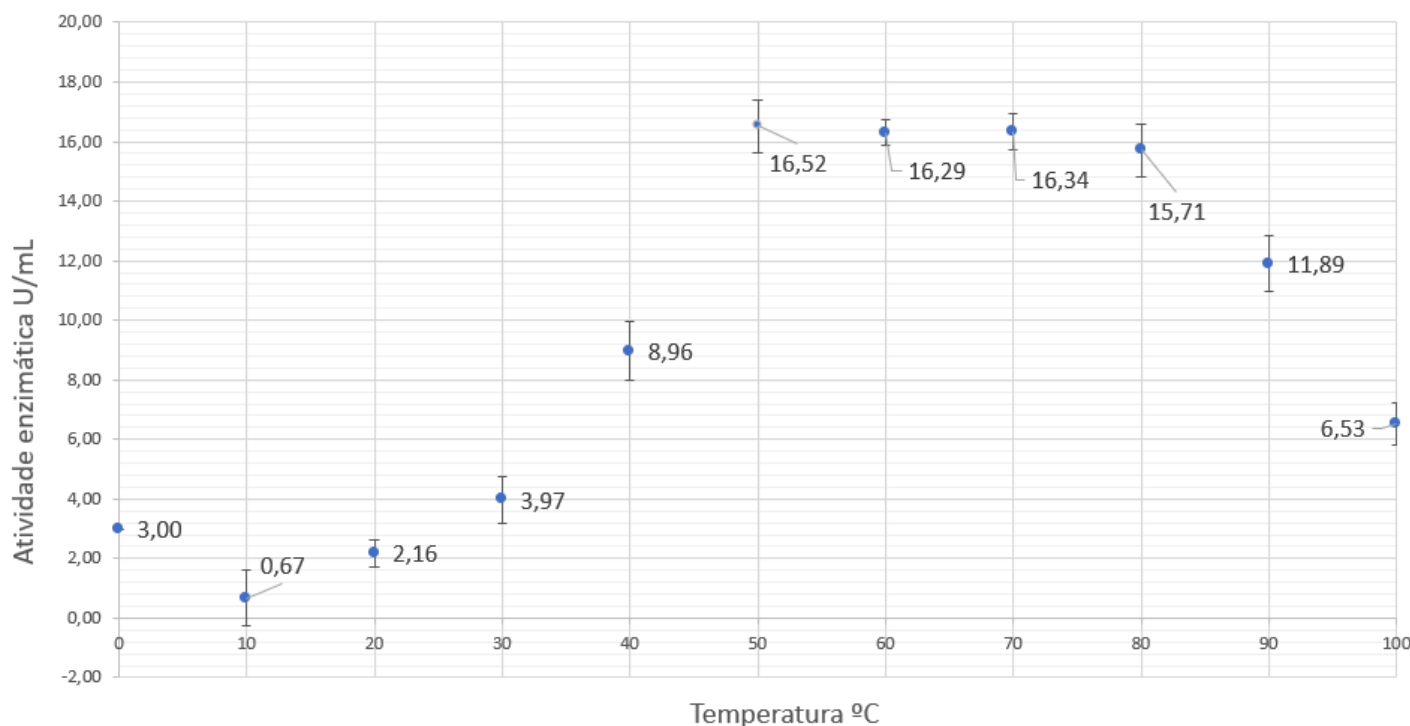
Fonte: compilação do autor.

5.7 Avaliação da temperatura ótima da α -amilase

Após os ensaios da atividade enzimática em diversas temperaturas, observou-se que a α -amilase apresentou baixa atividade hidrolítica nas temperaturas de 0, 10, 20, 30, 90 e 100° C. Enquanto nas temperaturas de 40, 50, 60, 70 e 80° C

apresentaram alta atividade enzimática, ou seja, a enzima possui elevada atividade em uma ampla faixa de temperatura (Figura 20)

Figura 20 - Atividade da α -amilase precipitada com acetona P.A e variação de acordo com a temperatura.



Fonte: compilação do autor.

Este resultado está de acordo com as temperaturas ótimas normalmente descritas na literatura para α -amilase. Farooq et al (2021) analisaram a literatura existente acerca da enzima desde 2011, e observaram que a faixa de temperatura ótima das maiores das α -amilases estudadas varia entre 40 a 60° C. Comentou-se também que na temperatura de 50°C detectaram 100% de atividade enzimática, enquanto temperaturas iguais ou acima de 90° C, apresentaram pouco ou nenhum potencial catalítico.

Resultados semelhantes foram observados em Abdulaal et al (2018), em que as α -amilases produzidas por *Trichoderma pseudokoningii* e *T. harzianum* também demonstraram pouca atividade nas temperaturas de 20 e 90° C, enquanto a máxima catalisação foi obtida a 50° C.

Com pouca atividade em baixas temperaturas, este resultado demonstra o papel importante das temperaturas para a eficiência catalítica da α -amilase. A menor atividade nessas condições pode estar relacionada à redução da energia da cinética enzimática, diminuindo a frequência das colisões entre a enzima e o substrato. Cipolla et al (2011) relatam que um dos efeitos adversos das baixas temperaturas em relação ao metabolismo celular é a redução exponencial das atividades enzimáticas. De forma semelhante, Arcus e Mulholland (2020) também comentam que o resfriamento de reações enzimáticas reduz drasticamente as taxas de reações.

Enquanto a redução da atividade amilolítica observada em temperaturas acima de 80° C, provavelmente está associada às alterações conformacionais e desnaturação da estrutura enzimática, comprometendo a formação dos complexos enzimas-substrato. Singh et al (2015) discute a relação da desnaturação da α -amilase e o aumento da temperatura reacional, demonstrando que mesmo após certo período de resfriamento, a enzima não volta a possuir atividade, indicando uma possível desnaturação irreversível devido a alta temperatura.

Além de influenciar as reações amilolíticas, a temperatura também pode afetar a produção enzimática pelos microrganismos. Segundo Awasthi et al (2018), espécies como *Brevibacillus borstelensis* e *Bacillus licheniformis* produziram maiores quantidades de α -amilase quando cultivadas nas temperaturas de 40 a 80° C.

A atividade reduzida em temperaturas menores de 40° C e maiores que 90°C , demonstra a importância das temperaturas para a eficiência catalítica da α -amilase. A maior atividade enzimática foi observada na faixa de 50°C, portanto, foi a temperatura selecionada para os experimentos subsequentes.

As temperaturas de 50 até 80° C foram semelhantes, este resultado sugere que a α -amilase recombinante apresenta características termoestáveis, propriedade essencial para enzimas com aplicações biotecnológicas e industriais.

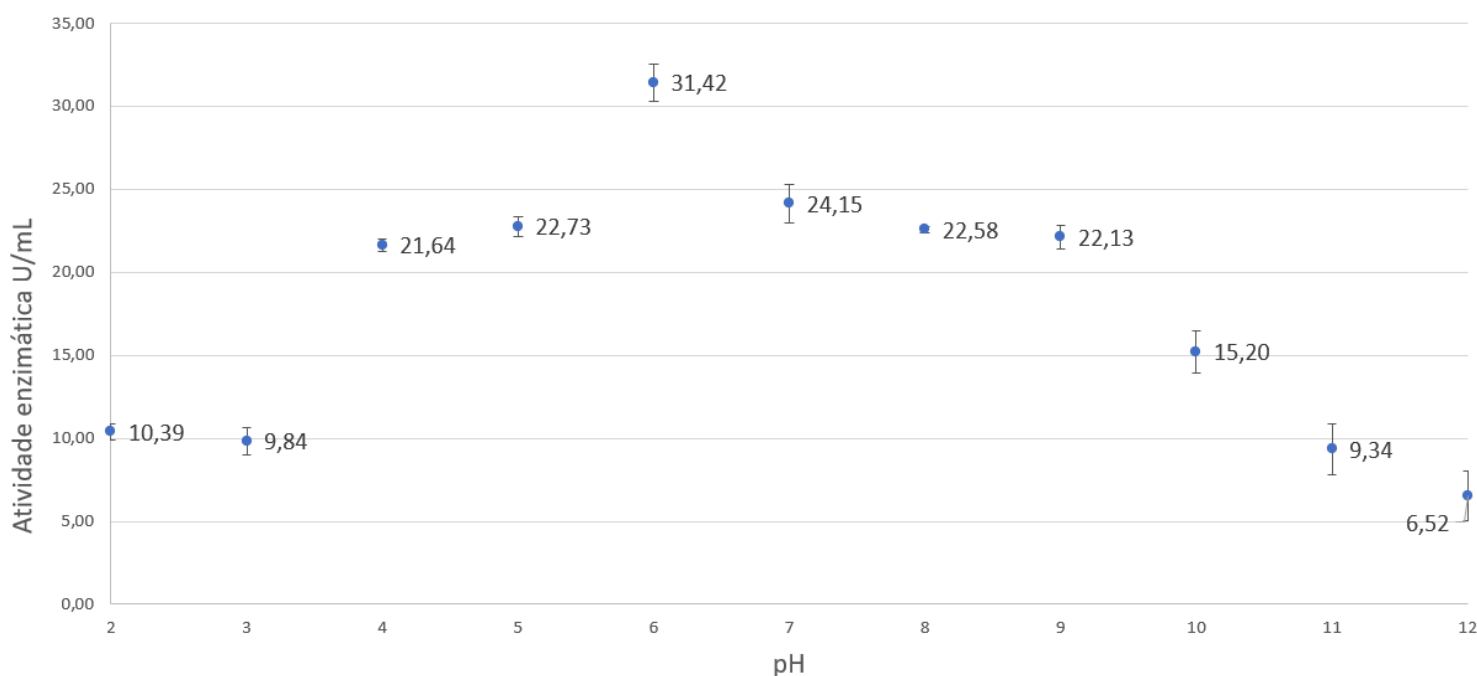
5.8 Avaliação de pH ótimo da α -amilase

Para a determinação do pH ótimo para reação enzimática da α -amilase precipitada com acetona P.A., foram realizadas reações enzimáticas em triplicatas utilizando tampões com valores de pH variando entre 2 e 12.

Observou-se que as unidades de pH 5, 6 e 7 favoreceram a reação enzimática, sendo o pH 6 aquele que apresentou melhor atividade amilolítica, logo, sendo escolhido para continuar os experimentos subsequentes da α -amilase (Figura 21).

As unidades de pH 3, 4, 8 e 9 apresentaram atividade dextrinizante intermediária se for comparada com os valores citados anteriormente. Porém, nos extremos da faixa avaliada (2 a 12), atividade enzimática foi drasticamente reduzida, evidenciando a importância do pH sobre a reação catalítica da α -amilase.

Figura 21 - **Atividade da α -amilase precipitada com acetona**
P.A e variação de acordo com o pH.



Fonte: compilação do autor

Yadav&Prakash (2011) reforçam a ideia que o pH da solução no qual a enzima se encontra exerce papel fundamental para sua estabilidade e atividades catalíticas. Em unidades extremas, as proteínas vão sofrer desnaturação, resultando em alterações nas estruturas secundárias e terciárias da enzima. Neste trabalho, os autores avaliaram a atividade amilolítica em tampões com valores de pH variando entre 3 e 10, e observaram uma melhor atividade na faixa de 5.5 e 7.5, semelhante ao resultado das reações enzimáticas deste trabalho.

Além disso, Kumari, Singh&Kayastha (2012) destacaram a importância das α -amilase apresentarem uma ampla faixa de boa reação catalítica, já que essa característica indica sua elevada capacidade a mudanças e diferenças nas condições ambientais, ampliando seu potencial biotecnológico e industrial.

Apesar da maioria das amilases microbianas apresenta atividade ótima em pHs neutros, Sajedi et al (2005) descrevem a existência de uma α -amilase, produzida por *Alicyclobacillus acidocaldarius*, que atinge a atividade máxima no pH 3, sendo uma vantagem para o uso industrial, pois diversas manufaturas se utilizam de pHs ácidos. Também há casos de *Bacillus licheniformis* produzindo enzimas com afinidade a soluções ácidas, como a descrita por Wu et al (2018), onde a α -amilase manteve 76% da sua estabilidade no pH 4 por cerca de 1 h.

Por outro lado, em Simair et al (2017) caracterizou uma α -amilase bruta produzida por uma espécie do gênero *Bacillus*, que possuía melhor atividade no pH 9, ou seja, uma enzima com afinidade alcalina. Ela também permaneceu estável nas unidades 8-10 por cerca de 1 h, enquanto sua estabilidade foi reduzida em condições ácidas e neutras. Resultados semelhantes foram descritos por Asgher et al (2007), que observou uma α -amilase, produzida por *Bacillus subtilis*, que apresentava atividade ótima no pH 8, além de elevada atividade em uma ampla faixa de pH, entre 5 até 10.

O pH também pode influenciar na produção enzimática pelos microrganismos. Ejike&Onyeonula (2024) demonstram a importância do pH na produção da α -amilase. O trabalho variou os valores de pH no meio de cultura de bactérias do gênero *Lactobacillus* e observaram mudanças na estabilidade da enzima de acordo com o pH do meio, sendo os valores de pH entre 5 e 6 se mostrando como mais favoráveis para a produção da α -amilase.

No presente trabalho, a maior atividade foi observada em pH 6, sugerindo que essa condição favorece a manutenção da estrutura catalítica ativa da α -amilase, possibilitando maior taxa na hidrólise do amido. Resultados semelhantes são descritos na literatura acerca da enzima, principalmente as com fontes microbianas, cujos os valores ótimos geralmente se encontram entre 5 e 7.

5.9 Termoestabilidade da enzima

A determinação de termoestabilidade da enzima foi feita em triplicata, nas temperaturas de 50, 60, 70, 80 e 100°C, com tempos de incubação variando de 0 a 120 minutos. A enzima apresentou boa termoestabilidade, sendo observado um aumento gradual da atividade dextrinizante até os 60 minutos de incubação na maioria das temperaturas avaliadas.

Entretanto, após os 120 minutos, verificou-se uma redução significativa da atividade enzimática. Notou-se também que a enzima apresentou baixa capacidade hidrolítica na temperatura de 100° C, com redução progressiva da atividade à medida que o tempo de incubação aumentava (Figura 22).

Como as α -amilase são amplamente usadas em processos industriais, a termoestabilidade é uma característica de grande interesse biotecnológico. Kumar, Singh&Rao (2009) comentam que muitas α -amilases são capazes de aguentar as altas temperaturas usadas nos processos de liquefação (80-90° C) e a gelatinização (100-110° C), além das propriedades estruturais e dinâmicas das enzimas termoestáveis serem grandes vantagens para aplicações industriais.

Esta característica pode ser potencializada pela presença de íons de cálcio. De acordo com Kumari et al (2010), o mineral estabiliza a estrutura da enzima por meio de interações com os resíduos carregados negativamente, aumentando sua termoestabilidade. De modo geral, a adição de íons de Ca^{2+} melhoram significativamente a estabilidade da enzima.

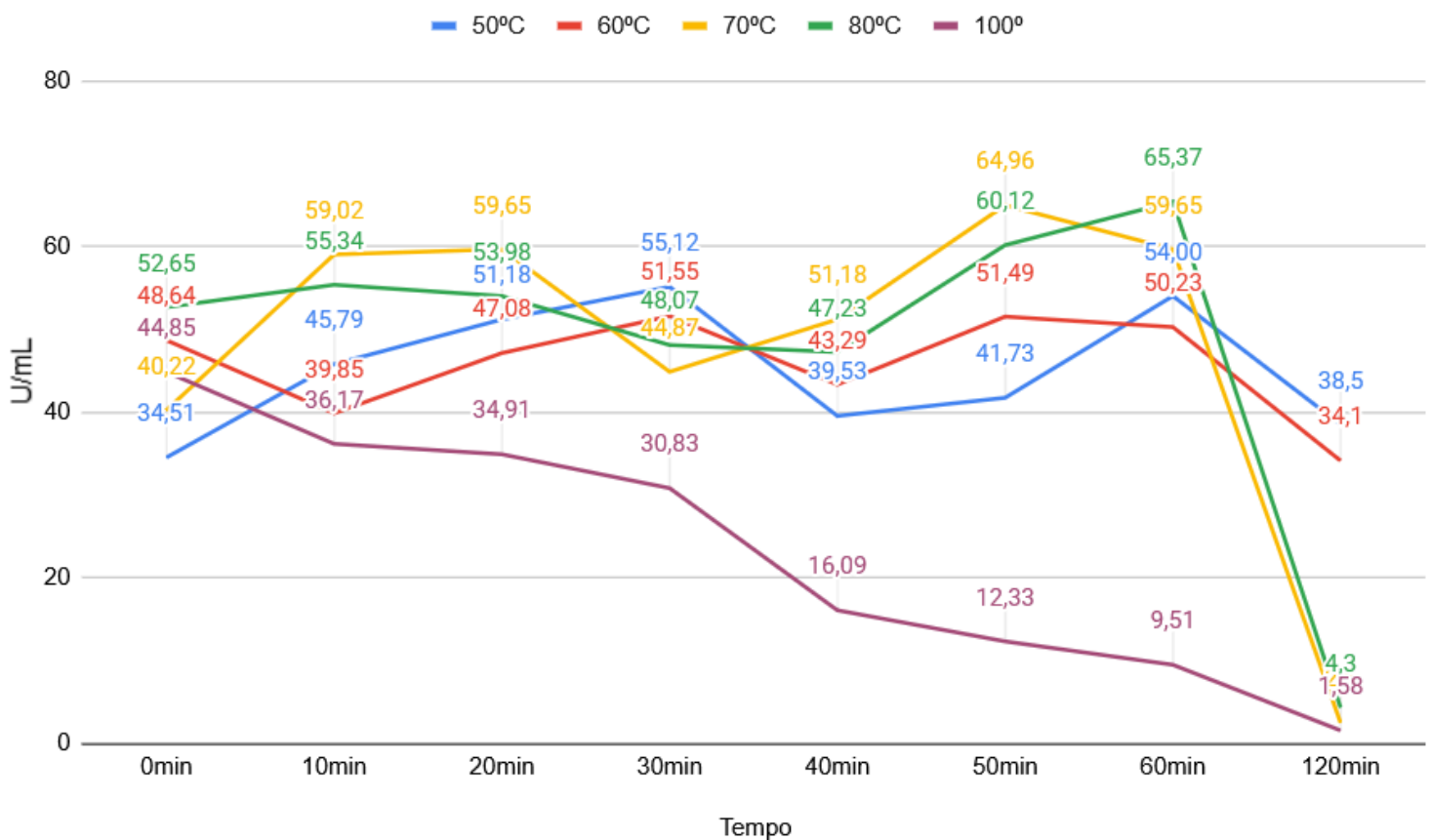
Hwang et al (2013), por exemplo, observaram que a α -amilase produzida por *Streptomyces avermitilis* possuía uma temperatura ótima de 25° C, com redução gradual da atividade em temperaturas acima de 45° C, no entanto, com a adição de CaCl_2 , a enzima manteve a sua atividade máxima por 4 h a 50° C, além de apresentar um aumento da sua meia vida.

Além da presença do cálcio, a presença de substrato também pode afetar a termoestabilidade da α -amilase. Em Sudan et al (2018), a enzima produzida por *Geobacillus bacterium* manteve cerca de 50% da sua atividade após 9 h de incubação nas temperaturas de 70° C e 2 h de incubação a 80° C. Segundo os autores, o aumento desta estabilidade pode estar relacionado com a formação do complexo

enzima-substrato, dando maior estabilidade estrutural e conformacional para a enzima. Além disso, a α -amilase também manteve mais de 90% de atividade hidrolítica quando mantida em temperatura ambiente ou 4° C por 6 meses.

Os efeitos da temperatura em α -amilase produzida por microrganismos tem sido amplamente caracterizados. Wu et al (2018), ao caracterizarem a enzima produzida por *Bacillus licheniformis*, relataram que a enzima manteve, aproximadamente, 50% da sua atividade após incubação a 80° C por 110 min, porém a partir dos 115 min, houve um rápida redução da atividade hidrolítica.

Figura 22 - **Atividade da α -amilase precipitada com acetona P.A nas temperaturas de 50° até 100° C nos tempos de 0 até 120 minutos.**



Fonte: compilação do autor

O aumento da atividade enzimática observado nas temperaturas de 50° até 80°C, ao longo do período de incubação, pode estar relacionada a diferentes fatores.

Uma das hipóteses é a desnaturação de proteases presentes no extrato enzimático bruto, e que poderiam reduzir a ação amilolítica da enzima. Corroborando essa hipótese, Majeed (2024) relatou que acima de 60°C, o desempenho de proteases produzidas por *Bacillus subtilis* apresentam queda significativa de atividade. De forma semelhante, Su et al (2005) observaram que determinadas proteases apresentaram baixa termoestabilidade nas temperaturas de 30 a 70° C enquanto a amilase manteve elevada estabilidade sob as mesmas condições.

Mishra, Joguete&Jayaraman (2022) relatam que a α -amilase produzida por *Virgibacillus dokdonensis* manteve sua estabilidade e mais de 50% da sua atividade hidrolítica em temperaturas acima de 55° C, enquanto as proteases que foram produzidas em conjunto com a enzima, apresentaram temperatura ótima entre 50 e 55° C, porém sua atividade diminuiu drasticamente a partir de 60° C. Os autores também observaram, que ao pré incubar as enzimas em diferentes temperaturas, as proteases perderam sua atividade após 30 min de incubação a 50° C, enquanto a α -amilase manteve a capacidade hidrolítica mesmo depois de 30 min de incubação a temperaturas mais elevadas, como 80° C.

Além disso, o aumento inicial da atividade enzimática observado neste estudo pode estar associado a alterações conformacionais induzidas pela temperatura, sendo capazes de favorecer a interação enzima e substrato, contudo, em períodos prolongados, especialmente após os 60 minutos de incubação, a desnaturação proteica é predominante, resultando na queda da atividade catalítica observada.

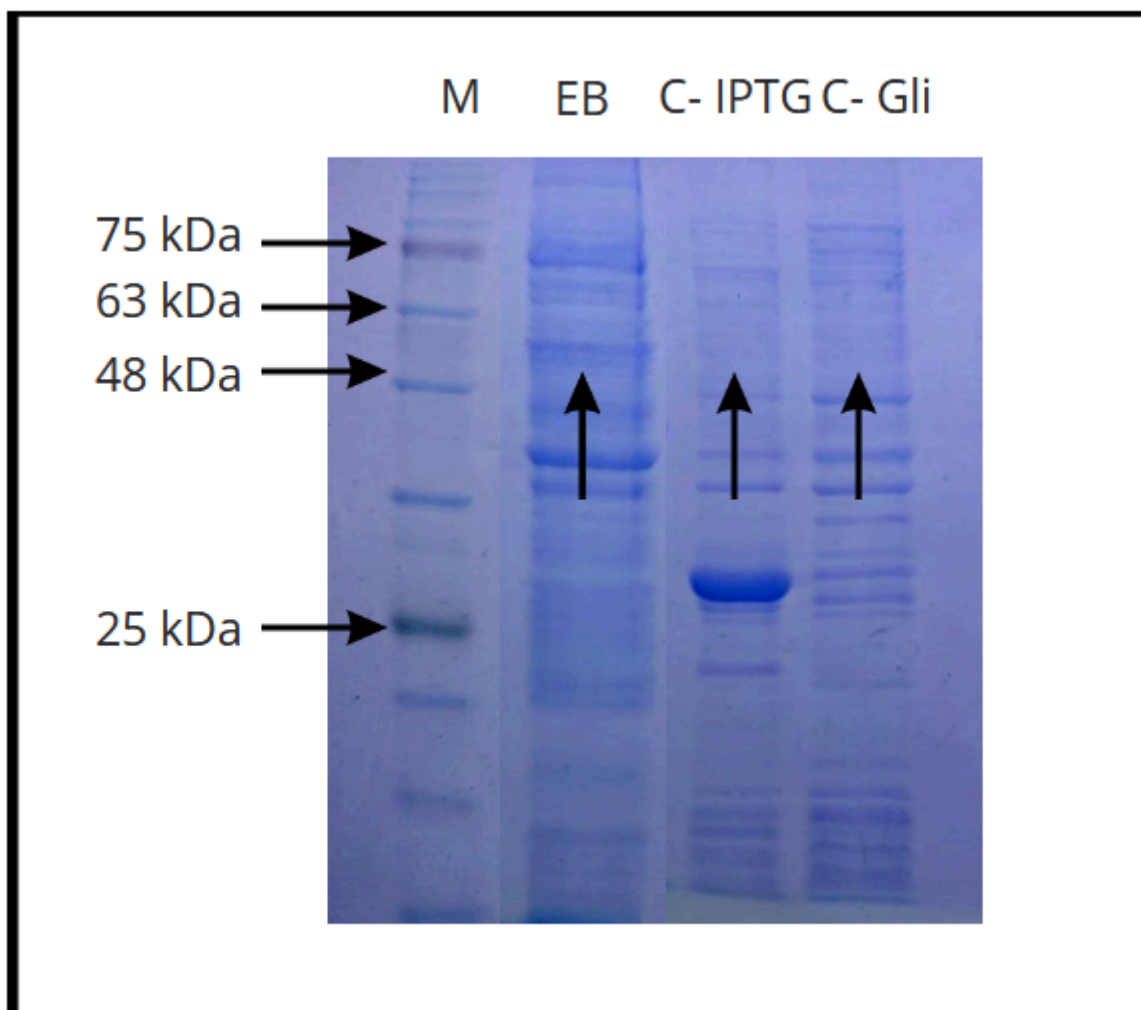
Singh et al (2015) discutem a capacidade da α -amilase de se adaptar a diferentes condições ambientais, destacando os processos de dobramento e desdobramento para a manutenção do funcionamento enzimático em ambientes estressantes. Os autores também sugerem que o ambiente influencia as vias conformacionais adotadas pelas proteínas para atingir a conformação funcional. Adicionalmente, demonstraram que, especialmente, o domínio catalítico da α -amilase apresenta mais estabilidade do que os outros domínios da enzima, auxiliando na manutenção da atividade catalítica.

5.10 SDS-PAGE

As proteínas recombinantes produzidas pela *E. coli* foram analisadas por eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE).

De acordo com o perfil de migração das proteínas precipitadas do sobrenadante da expressão enzimática em gel de SDS-PAGE (Figura 23), foi possível observar diversas bandas correspondentes às proteínas presentes no extrato bruto. A α -amilase recombinante possui massa molecular teórica de aproximadamente 59 kDa. No extrato bruto observou-se uma banda com massa molecular próxima de 63 kDa, ausente nas amostras pDMU 02 íntegro, tanto sobre indução com IPTG quanto repressão com glicose. A presença da banda na amostra recombinante sugere que seja correspondente a α -amilase expressa pelo plasmídeo recombinante pDMU 02 - AMY.

Figura 23 - **Gel SDS-PAGE do extrato bruto precipitado.** Da esquerda para a direita: marcador molecular GRS Protein Marker, extrato bruto da proteína precipitada com acetona P.A., controle negativo induzido com IPTG e controle negativo reprimido com glicose.



Fonte: compilação do autor

O peso molecular aparente da α -amilase recombinante observada no presente estudo é semelhante ao descrito em outros trabalhos sobre α -amilase bacterianas. Arian (2008) descreve a enzima produzida por *Bacillus sp*, e segundo o autor, a enzima apresentou peso molecular 60,5 kDa. De forma semelhante, Gangadharan et al (2009) relataram que a α -amilase produzida por *Bacillus amyloliquefaciens* apresentou peso molecular de 58 kDa.

Mais recentemente, Akbulut et al (2025) caracterizam uma α -amilase produzida por *Priestia megaterium* e clonada em *E. coli*. Os autores reportaram que a enzima possuía 56 kDa, valor semelhante a outras amilases de fontes bacterianas.

Apesar da banda correspondente a α -amilase do extrato bruto não apresentar grande intensidade quando comparada, por exemplo, a banda de GFP observada nos controles negativos, os ensaios de atividade enzimática demonstraram alta

capacidade de hidrólise do amido, indicando que mesmo em aparente quantidade reduzida no gel de poliacrilamida, a enzima apresenta alta atividade catalítica.

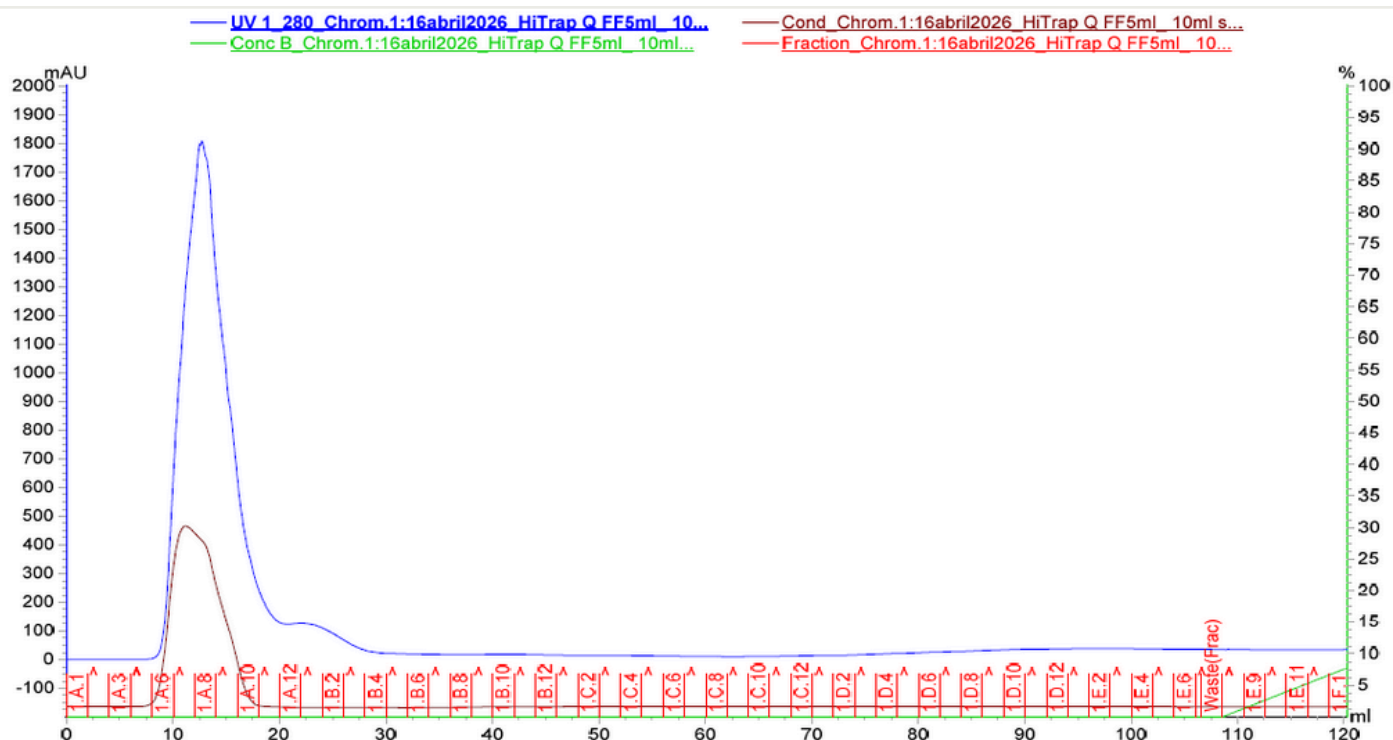
5. 11 Cromatografia de troca iônica em coluna HiTrap Q FF

Devido a grande concentração de proteínas secretadas no meio de cultura juntamente com a α -amilase, foi feita uma etapa de purificação de proteínas por cromatografia de troca iônica. O perfil das frações eluídas da coluna pode ser visualizado na Figura.

Durante a eluição inicial com o tampão Tris-HCl 20 mM, pH 8 (Tampão A) foi observado um pico de atividade nas frações A7, A8 e A9, após a passagem de cerca de 11 mL de tampão pela coluna. Na eluição do tampão posterior, Tris-HCl 20 mM com NaCl 1 M pH 8 (Tampão B, não foram observados novos picos, indicando que a α -amilase foi diluída predominantemente nas frações eluídas durante a etapa inicial da cromatografia (Figura 24).

Considerando que a coluna HiTrap Q FF é uma resina de troca aniônica, ou seja, as proteínas com carga positiva irão aderir em sua superfície. O resultado da cromatografia sugere que a α -amilase apresentou baixa afinidade pela matriz cromatográfica, possivelmente sendo carregada negativamente e não interagindo com a coluna.

Figura 24 - Perfil cromatográfico do extrato bruto precipitado com acetona P.A.

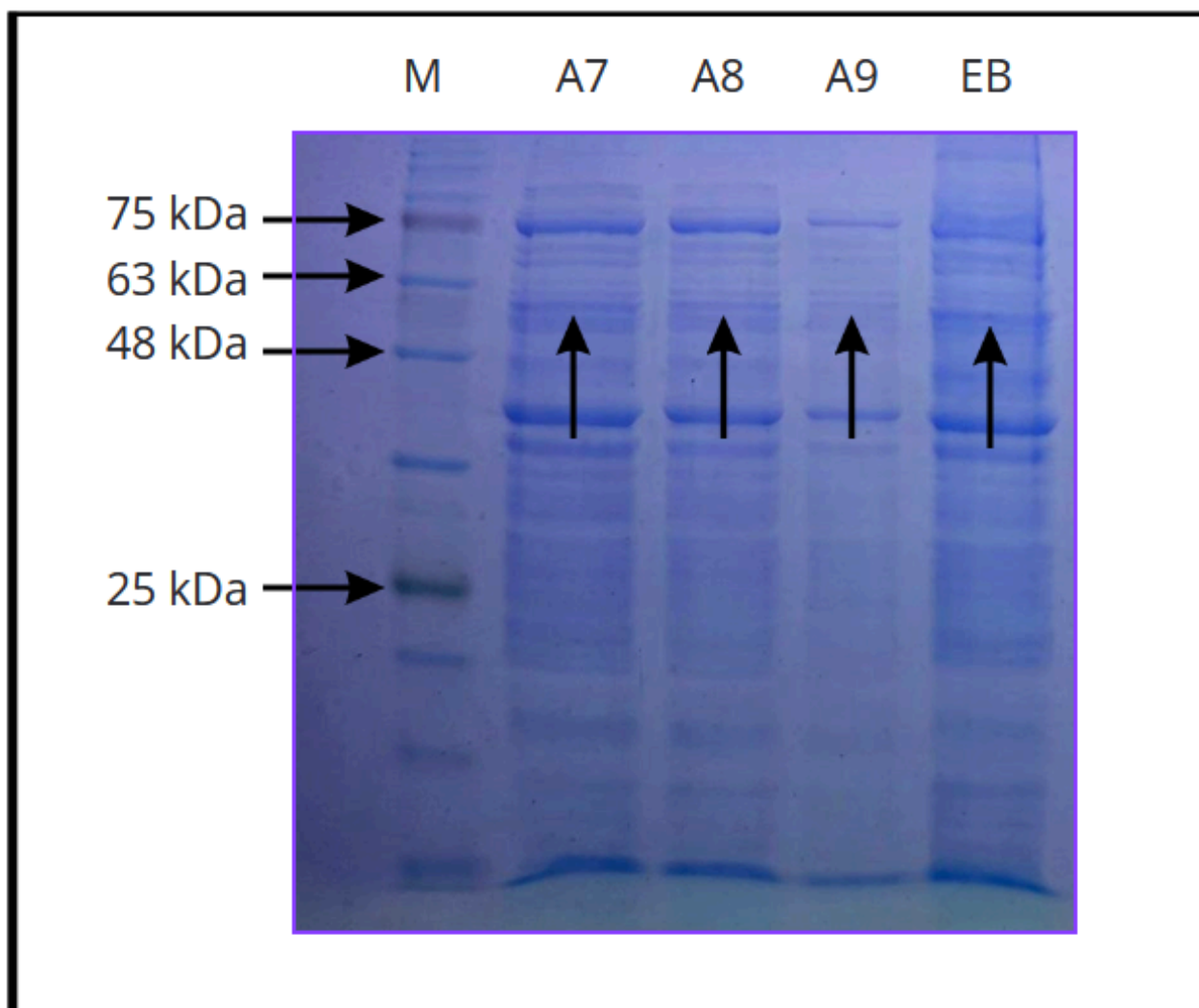


Fonte: compilação do autor

Com base neste resultado, foi feita outra purificação com coluna Hitrap SP HP, uma resina de troca catiônica, porém o resultado obtido foi o mesmo. A enzima α -amilase não interagiu com a coluna, saindo novamente no flow-through, nas frações iniciais da cromatografia.

Após a purificação, foi feito gel de SDS-PAGE para confirmar o grau de pureza das frações contendo a α -amilase recombinante produzida por *Escherichia coli*, como mostrado na Figura 25. É possível ver na Figura que não houve purificação da enzima, confirmando que o sistema de expressão heteróloga em *E. coli* secreta uma alta quantidade de proteínas homólogas em conjunto com a expressão da α -amilase.

Figura 25 - **Gel SDS-PAGE das frações A7, A8 e A9.** Da esquerda para a direita: marcador molecular GRS Protein Marker, A7, A8, A9 e Extrato Bruto.



Fonte: compilação do autor

A fração A7 apresentou uma atividade específica de 72 U/mg de atividade enzimática, A8 possuía 61,75 U/mg e a fração A9 ficou com 22U/mg, enquanto o extrato bruto apresentou 78 U/mg de atividade enzimática. Logo, a α -amilase apresentou elevada atividade específica mesmo após eluição com os tampões usados na etapa de purificação.

5.12 Parâmetros cinéticos

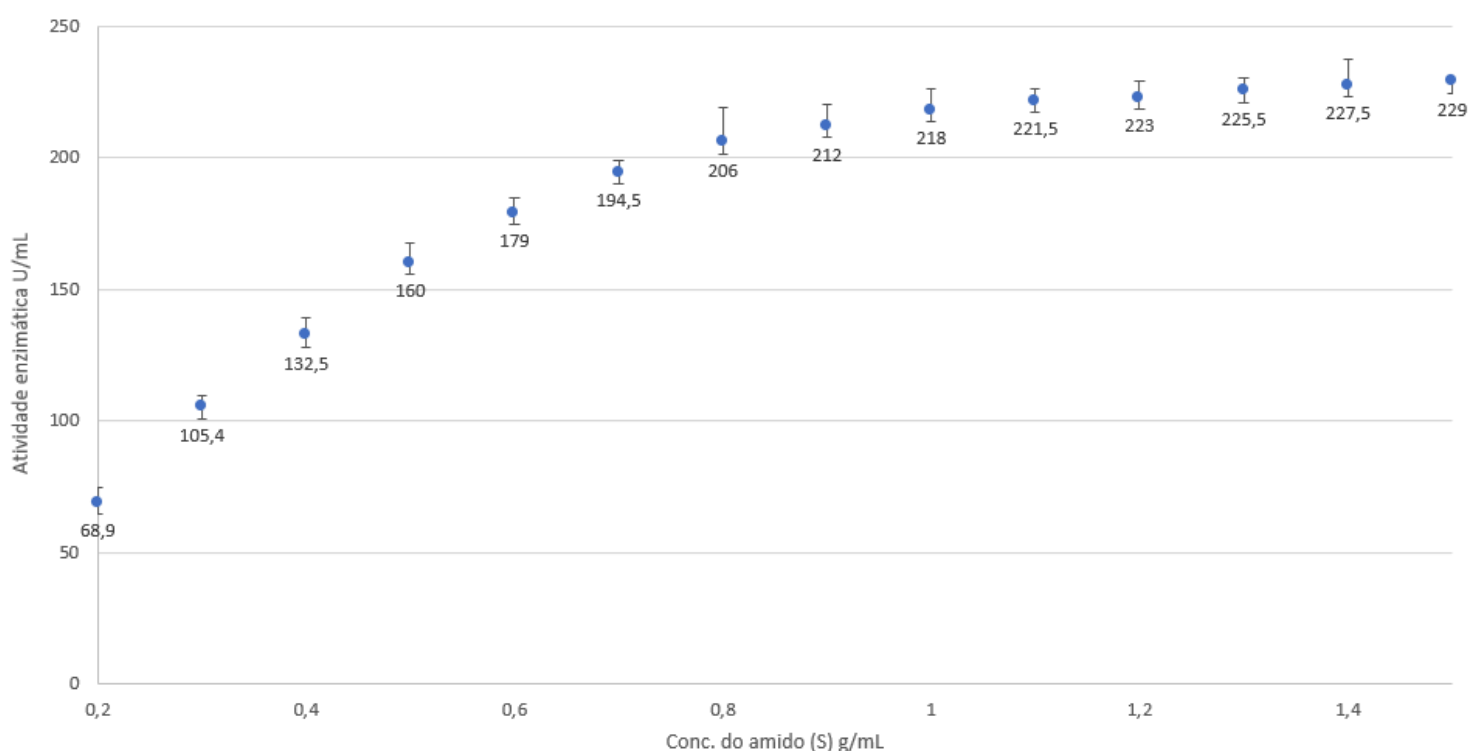
Na caracterização cinética da enzima α -amilase recombinante, observou-se o efeito da concentração do substrato sobre a velocidade de reação enzimática, sendo representado pela curva de Michaelis-Menten. Os valores da constante cinética (K_m) aparente e velocidade máxima aparente (V_{max}) obtidos podem ser observados na Tabela 6.

Tabela 6 - Valores de K_m (mM) e V_{max} (U/mL)

K_m (mM)	V_{max} (U/mL)
1	434,78

A figura 25 apresenta o efeito da concentração do amido (mg/mL) sobre a velocidade de reação da α -amilase. A curva de $[V_0] \times [S]$ possui o formato de uma curva típica de Michaelis-Menten, em que a velocidade (V_0) é proporcional à concentração do substrato, neste estudo, o amido solúvel. É possível observar também que à medida que a concentração do amido aumenta, a velocidade diminui, indicando a saturação dos sítios catalíticos da α -amilase.

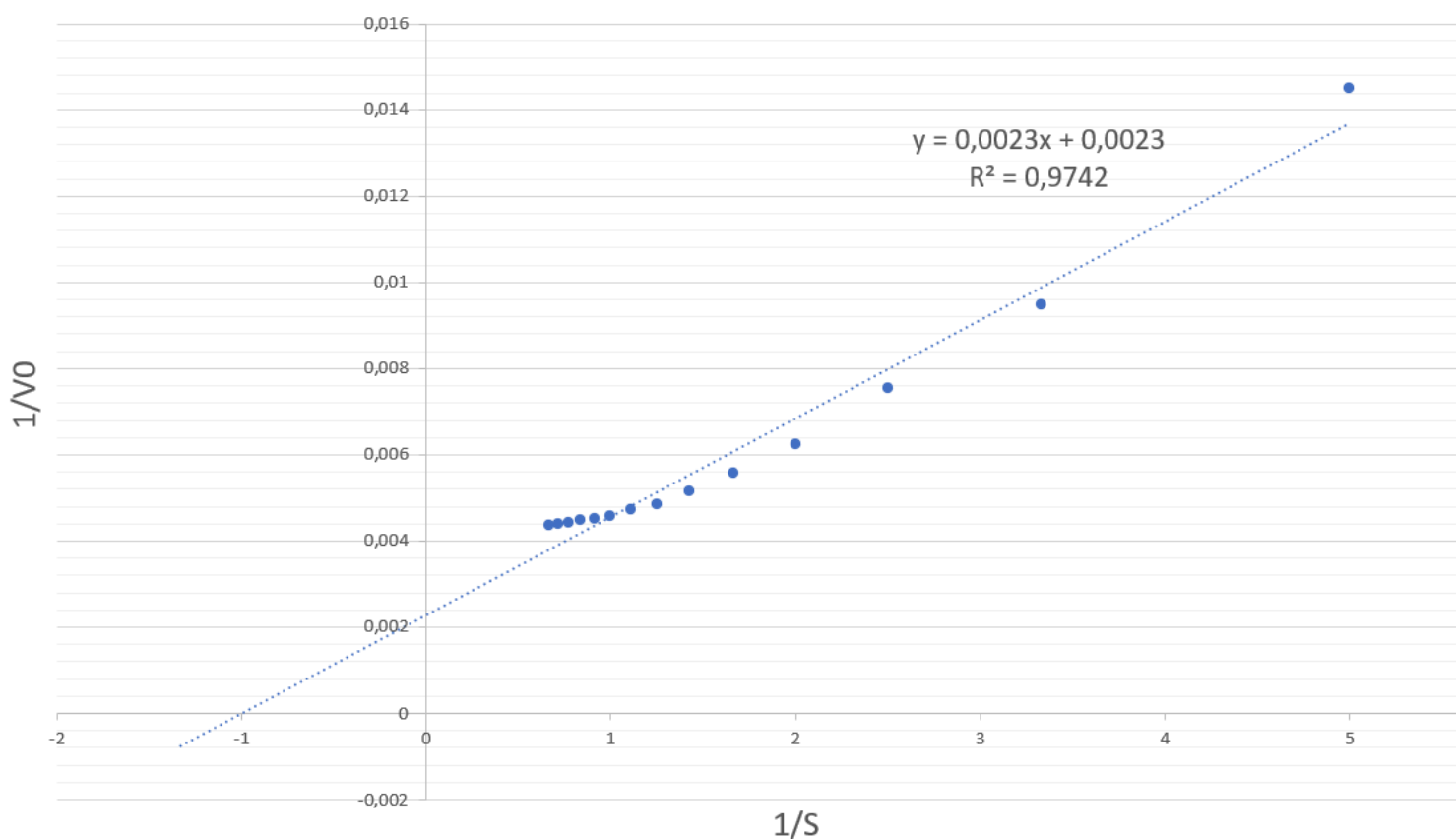
Figura 26 - Perfil cinético da velocidade em função do substrato.



Fonte: compilação do autor

Para a plotagem do gráfico de Lineweaver-Burk, foi feita a plotagem do gráfico das funções $1/V_0$ e $1/S$, onde é obtido o seu duplo recíproco. Este gráfico permite a determinação mais exata de V_{max} (Figura 27).

Figura 27 - Duplo recíproco $1/V_0$ em função de $1/S$.



Fonte: compilação do autor

O Lineweaver-Burk fornece uma linha reta que terá inclinação de $K_m/V_{\max}$, sendo a interceptação $1/V_{\max}$ no eixo de $1/[V_0]$ e interceptação $-1/K_m$ no eixo de $1/[S]$ (Lineweaver&Burk, 1934). Com o auxílio da equação da reta fornecida por este gráfico, foi possível calcular o K_m e $V_{\max}$ (Tabela 6).

Al-qodah (2007) descreve como o valor de K_m indica a afinidade da enzima pelo substrato, e eles são inversamente proporcionais, então quanto menor o valor de K_m , maior a afinidade da enzima pelo substrato. Logo, a enzima deste trabalho possui grande afinidade pelo amido solúvel. Adnan (2010) relata como os valores de K_m e $V_{\max}$ são difíceis de serem comparados pois dependem muito dos substratos usados e condições reacionais.

Os resultados da cinética enzimática indicam que o extrato bruto apresenta-se como uma boa alternativa no uso da α -amilase no processo industrial da liquefação do

amido, não necessitando da fase de purificação na indústria, assim, reduzindo os custos da operação como um todo.

6. CONCLUSÃO

O presente trabalho demonstrou:

- A clonagem do gene AMYKOR no vetor de expressão pDMU 02 foi feita, possibilitando sua expressão funcional na linhagem *Escherichia coli*

JM110. E a α -amilase recombinante produzida apresentou alta atividade hidrolítica.

- Diferentes condições de indução foram observadas, sendo a maior produção de α -amilase recombinante ocorreu após 10 h de indução com 0,3 mM de IPTG, indicando que essa concentração promove um bom equilíbrio entre a produção enzimática e o crescimento celular.
- A caracterização bioquímica indicaram que a enzima apresenta uma ampla faixa de atividade em diferentes temperaturas, com atividade máxima em 50° C, além de alta termoestabilidade, mantendo atividade amilolítica entre 50 e 80° C por cerca de 60 minutos. Após os 120 minutos de incubação, notou-se redução na atividade enzimática entre 50 e 60° C, enquanto nas outras temperaturas a atividade foi perdida.
- Os resultados sugerem que o aumento da atividade enzimática em altas temperaturas pode estar relacionado à desnaturação das proteases presentes no extrato bruto, reduzindo a degradação da α -amilase e favorecendo a ação catalítica. O aumento da temperatura também pode estar relacionado a mudanças nas conformações da enzima, favorecendo o seu sítio catalítico.
- Enquanto ao pH, a α -amilase apresentou maior atividade no pH 6, com redução significativa em condições extremamente ácidas ou alcalinas, compatível com outras α -amilases bacterianas descritas na literatura.
- Apesar da análise do SDS-PAGE não ter evidenciado uma grande expressão da proteína recombinante, os ensaios enzimáticos demonstraram alta capacidade hidrolítica. Esse resultado indica que pequenas quantidades da enzima são suficientes para promover uma alta hidrólise do amido.
- Os parâmetros cinéticos obtidos, representados por K_m e V_{max} demonstraram boa afinidade da enzima recombinante pelo substrato, ou seja, o extrato bruto possui potencial de aplicação em processos industriais que não demandam enzimas com alto nível de purificação,

reduzindo os custos de produção e aumentando a viabilidade econômica.

- Conclui-se que a α -amilase recombinante produzida possui características promissoras para aplicações biotecnológicas e industriais, como a liquefação do amido, e em processos que requerem enzimas termoestáveis.

7. PERSPECTIVAS

Os resultados deste trabalho abriram para as seguintes perspectivas:

- Clonagem do gene da α -amilase em vetores de maior produção de proteínas heterólogas.

- Otimização da produção enzimática em fermentadores com parâmetros como agitação, combinação de nutrientes e controlados no geral para maior produção da enzima recombinante.
- Verificação de outros métodos de purificação para caracterização dos estudos cinéticos da enzima purificada.

8. REFERÊNCIAS

ABDULAAL, Wesam H. Purification and characterization of α -amylase from *Trichoderma pseudokoningii*. **BMC biochemistry**, v. 19, n. 1, p. 4, 2018.

ADNAN, FAZAL. Kinetics and thermodynamic studies of alpha amylase from *Bacillus licheniformis* mutant. **Pakistan Journal of Botany**, v. 42, n. 5, p. 3507-3516, 2010.

AGUIAR, Caroline Mariana de et al. Hidrólise enzimática de resíduos lignocelulósicos utilizando celulasas produzidas pelo fungo *Aspergillus niger*. 2010.

AKBULUT, Kübra et al. Heterologous expression of calcium-independent mesophilic α -amylase from *Priestia megaterium*: Immobilization on genipin-modified multi-walled carbon nanotubes and silica supports to enhance thermostability and catalytic activity. **Bioorganic Chemistry**, v. 155, p. 108151, 2025.

AL-QODAH, Zakaria et al. Determination of kinetic parameters of [alpha]-amylase producing thermophile *Bacillus sphaericus*. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, n. 6, p. 699, 2007.

ARCUS, Vickery L.; MULHOLLAND, Adrian J. Temperature, dynamics, and enzyme-catalyzed reaction rates. **Annual review of biophysics**, v. 49, n. 1, p. 163-180, 2020.

ARIKAN, Burhan. Highly thermostable, thermophilic, alkaline, SDS and chelator resistant amylase from a thermophilic *Bacillus* sp. isolate A3-15. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 8, p. 3071-3076, 2008.

ASGHER, M. et al. A thermostable α -amylase from a moderately thermophilic *Bacillus subtilis* strain for starch processing. **Journal of food engineering**, v. 79, n. 3, p. 950-955, 2007.

ASHRAF, Hamad et al. Production of alpha amylase by *Bacillus licheniformis* using an economical medium. **Bioresource technology**, v. 87, n. 1, p. 57-61, 2003.

ASTOLFI FILHO, Spartaco; DA SILVA, Carlos Gustavo Nunes; DE FÁTIMA MENDES ACÁCIO BIGI, Maria. Bioprospecção e biotecnologia. **Parcerias Estratégicas**, v. 19, n. 38, 2014.

ASTOLFI-FILHO, S. et al. Noções básicas de tecnologia do DNA recombinante. **Universidade do Amazonas**, 1996.

AWASTHI, Mukesh Kumar et al. Biodegradation of food waste using microbial cultures producing thermostable α -amylase and cellulase under different pH and temperature. **Bioresource technology**, v. 248, p. 160-170, 2018.

BAILEY, James E. Host-vector interactions in *Escherichia coli*. **Bioprocess Design and Control**, p. 29-52, 2005.

BERG, J. M. et al. Biochemistry WH Freeman. **New York**, p. 988-990, 2002.

BHATWA, Arshpreet et al. Challenges associated with the formation of recombinant protein inclusion bodies in *Escherichia coli* and strategies to address them for industrial applications. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 9, p. 630551, 2021.

BOŽIĆ, Nataša et al. Optimization of the growth and α -amylase production of *Bacillus subtilis* IP 5832 in shake flask and laboratory fermenter batch cultures. **Journal of the Serbian Chemical Society**, v. 76, n. 7, p. 965-972, 2011.

BULLER, R. et al. From nature to industry: Harnessing enzymes for biocatalysis. **Science**, v. 382, n. 6673, p. eadh8615, 2023.

CARATTOLI, Alessandra. Plasmids and the spread of resistance. **International journal of medical microbiology**, v. 303, n. 6-7, p. 298-304, 2013.

CARROLL, Amanda C.; WONG, Alex. Plasmid persistence: costs, benefits, and the plasmid paradox. **Canadian journal of microbiology**, v. 64, n. 5, p. 293-304, 2018.

CHANDRA, Prem et al. Microbial lipases and their industrial applications: a comprehensive review. **Microbial cell factories**, v. 19, n. 1, p. 169, 2020.

CHEN, Rachel. Bacterial expression systems for recombinant protein production: E. coli and beyond. **Biotechnology advances**, v. 30, n. 5, p. 1102-1107, 2012.

CIPOLLA, Alexandre et al. Stepwise adaptations to low temperature as revealed by multiple mutants of psychrophilic α -amylase from Antarctic bacterium. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 44, p. 38348-38355, 2011.

CUMMINGS, B. Operon lac. Pearson Education Inc., copyright, 2006.

DA SILVA, Shenian Pedro Bom; HASS, Iris. AmEG–Ambientes e Expressão Gênica. **Legenda**, v. 9, p. 1, 2022.

DE BORBA, Verônica Simões et al. Modificações do amido e suas implicações tecnológicas e nutricionais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos: pesquisa e práticas contemporâneas**, v. 1, n. 31, p. 428-457, 2021.

DECOL, Celina. Avaliação da hidrólise da lactose por β -galactosidase comercial em leite UHT. **Research, Society and Development**, 2021.

DI FELICE, Francesca; MICHELI, Gioacchino; CAMILLONI, Giorgio. Restriction enzymes and their use in molecular biology: An overview. **Journal of biosciences**, v. 44, n. 2, p. 38, 2019.

DORNELAS, Charlys Seixas Maia. Biotecnologia de microrganismos: fundamentos, bioprocessos e aplicações na indústria e na agricultura. **Revista JRG de Estudos Acadêmicos**, v. 9, n. 20, p. e092841-e092841, 2026.

EJIKE, E. N.; ONYEANULA, E. O. Effect of Varying Temperature, pH and Incubation Time on Amylase Production by Amylolytic Lactic Acid Bacteria Isolated from Fermented Starchy Foods. **Int. J. Microbiol. & Appl. Sciences**, v. 3, n. 3, p. 22-36, 2024.

FAROOQ, Muhammad Adeel et al. Biosynthesis and industrial applications of α -amylase: A review. **Archives of Microbiology**, v. 203, n. 4, p. 1281-1292, 2021.

FREITAS, Marisa et al. Assessment of α -amylase activity in a microanalysis system: Experimental optimization and evaluation of type of inhibition. **Journal of Chemical Education**, v. 100, n. 3, p. 1237-1245, 2023.

FUWA, Hidetsugu. A new method for microdetermination CF amylase activity by the use of amylose as the substrate. **The journal of Biochemistry**, v. 41, n. 5, p. 583-603, 1954.

GANGADHARAN, Dhanya et al. Biochemical characterization of raw-starch-digesting alpha amylase purified from *Bacillus amyloliquefaciens*. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 158, n. 3, p. 653-662, 2009.

GLICK, Bernard R.; PATTEN, Cheryl L. **Molecular biotechnology: principles and applications of recombinant DNA**. John Wiley & Sons, 2022.

GOMES, Amitha Reena et al. An overview of heterologous expression host systems for the production of recombinant proteins. **Adv. Anim. Vet. Sci**, v. 4, n. 7, p. 346-356, 2016.

GOMES, Isidore; GOMES, Joseph; STEINER, Walter. Highly thermostable amylase and pullulanase of the extreme thermophilic eubacterium *Rhodothermus marinus*: production and partial characterization. **Bioresource technology**, v. 90, n. 2, p. 207-214, 2003.

GURUNG, Neelam et al. A broader view: microbial enzymes and their relevance in industries, medicine, and beyond. **BioMed research international**, v. 2013, n. 1, p. 329121, 2013.

GUTIÉRREZ-GARCÍA, Ana K.; ALVAREZ-GUZMÁN, Cecilia Lizeth; DE LEON-RODRIGUEZ, Antonio. Autodisplay of alpha amylase from *Bacillus megaterium* in *E. coli* for the bioconversion of starch into hydrogen, ethanol and succinic acid. **Enzyme and microbial technology**, v. 134, p. 109477, 2020.

HELINSKI, Donald R. A brief history of plasmids. **EcoSal Plus**, v. 10, n. 1, p. eESP-0028-2021, 2022.

HII, Siew Ling et al. Pullulanase: role in starch hydrolysis and potential industrial applications. **Enzyme research**, v. 2012, n. 1, p. 921362, 2012.

HWANG, Sang Youn et al. Thermal stability and starch degradation profile of α -amylase from *Streptomyces avermitilis*. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 77, n. 12, p. 2449-2453, 2013.

KHAN, Suliman et al. Role of recombinant DNA technology to improve life. **International journal of genomics**, v. 2016, n. 1, p. 2405954, 2016.

KOCABAŞ, Didem Sutay; LYNE, John; USTUNOL, Zeynep. Hydrolytic enzymes in the dairy industry: Applications, market and future perspectives. **Trends in Food Science & Technology**, v. 119, p. 467-475, 2022.

KOLAJ, Olga et al. Use of folding modulators to improve heterologous protein production in *Escherichia coli*. **Microbial cell factories**, v. 8, n. 1, p. 9, 2009.

KONG, Haocun et al. Fine structure impacts highly concentrated starch liquefaction process and product performance. **Industrial Crops and Products**, v. 164, p. 113347, 2021.

KUMAR, R. Siva Sai; SINGH, Sridevi Annapurna; RAO, AG Appu. Conformational stability of α -amylase from malted sorghum (*Sorghum bicolor*): reversible unfolding by denaturants. **Biochimie**, v. 91, n. 4, p. 548-557, 2009.

KUMARI, Arpana et al. The effect of calcium binding on the unfolding barrier: A kinetic study on homologous α -amylases. **Biophysical chemistry**, v. 151, n. 1-2, p. 54-60, 2010.

KUMARI, Arpana; SINGH, Kritika; M KAYASTHA, Arvind. α -Amylase: General properties, mechanism and biotechnological applications-A review. **Current Biotechnology**, v. 1, n. 1, p. 98-107, 2012.

LAKSMI, F. A. et al. Autoinduction expression of Bst DNA polymerase using lac operon-controlled expression systems in Escherichia coli. In: **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**. IOP Publishing, 2023. p. 012050.

LEWIS, Mitchell. Allostery and the lac Operon. **Journal of molecular biology**, v. 425, n. 13, p. 2309-2316, 2013.

LIN, Lingshang et al. Molecular structure and enzymatic hydrolysis properties of starches from high-amylose maize inbred lines and their hybrids. **Food Hydrocolloids**, v. 58, p. 246-254, 2016.

LINEWEAVER, Hans; BURK, Dean. The determination of enzyme dissociation constants. **Journal of the American chemical society**, v. 56, n. 3, p. 658-666, 1934.

MAJEED, Tanveer et al. Characterization of a thermostable protease from Bacillus subtilis BSP strain. **BMC biotechnology**, v. 24, n. 1, p. 49, 2024.

MALLICK, ANUSAYA; SAMAL, ALOK CHANDRA; SANTRA, S. C. Current Scenario of Industrial Biotechnology in India.

MATHEW, Jiby John et al. Amylase production by Aspergillus niger through submerged fermentation using starchy food byproducts as substrate. **Int. J. Herb. Med**, v. 4, n. 6, p. 34-40, 2016.

MAY, Oliver. Industrial enzyme applications—overview and historic perspective. **Industrial enzyme applications**, p. 1-24, 2019.

MONTEIRO, Valdirene Neves; DO NASCIMENTO SILVA, Roberto. Aplicações industriais da biotecnologia enzimática. **Revista processos químicos**, v. 3, n. 5, p. 9-23, 2009.

MOREIRA, Diego da Silva. Construção de novos promotores funcionais em Escherichia coli por meio de síntese química de DNA randomizada. 2016.

MOTTA, Joyce Fagundes Gomes et al. Use of enzymes in the food industry: a review. **Food Science and Technology**, v. 43, p. e106222, 2023.

MOVAHEDPOUR, Ahmad et al. A brief overview on the application and sources of α -amylase and expression hosts properties in order to production of recombinant α -amylase. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 69, n. 2, p. 650-659, 2022.

MULLER, Gabriela. **Clonagem e Expressao do Gene da α -amilase de Bacillus subtilis variedade D2 na levedura Pichia pastoris**. 2008. 110 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2008.

NASCIMENTO, Camila Tauane Monteiro do. Expressão heteróloga de uma osmotina laticífera e desenvolvimento de protocolos para extração da proteína recombinante a partir de corpos de inclusão. 2016.

NELSON, David L.; COX, Michael M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. Artmed Editora, 2022.

NEVES, Rogério de Oliveira. Estudo da α -amilase de *Bacillus koreensis* isolado de ecossistema aquático da Amazônia: clonagem molecular, expressão e caracterização. 2018.

NICHOLL, Desmond ST. **An introduction to genetic engineering**. Cambridge University Press, 2023.

NIEGO, Allen Grace T. et al. The contribution of fungi to the global economy. **Fungal Diversity**, v. 121, n. 1, p. 95-137, 2023.

NOTIN, Pascal et al. Machine learning for functional protein design. **Nature biotechnology**, v. 42, n. 2, p. 216-228, 2024.

O'CONNELL, Adam et al. Biocatalysis: landmark discoveries and applications in chemical synthesis. **Chemical Society Reviews**, v. 53, n. 6, p. 2828-2850, 2024.

OLINS, Peter O.; LEE, Stephen C. Recent advances in heterologous gene expression in *Escherichia coli*. **Current opinion in biotechnology**, v. 4, n. 5, p. 520-525, 1993.

OLIVEIRA, Cristiana Gomes de et al. Regulação gênica da biossíntese de violaceína e Quorum sensing em *Chromobacterium violaceum*. 2005.

OSBOURN, Anne E.; FIELD, Ben. Operons. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 66, n. 23, p. 3755-3775, 2009.

PANDEY, Ashok et al. Advances in microbial amylases. **Biotechnology and applied biochemistry**, v. 31, n. 2, p. 135-152, 2000.

PANDEY, Ashok et al. Advances in microbial amylases. **Biotechnology and applied biochemistry**, v. 31, n. 2, p. 135-152, 2000.

PENUMETCHA, Pallavi et al. Improving the Lac system for synthetic biology. **Bios**, v. 81, n. 1, p. 7-15, 2010.

PINTO, Gerson Ferreira; DE MENEZES, Reginaldo Ramos. **Cinética enzimática**. Editora E-papers, 2009.

RADLEY, Emily et al. Engineering enzymes for environmental sustainability. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 62, n. 52, p. e202309305, 2023.

REDDY, N. S.; NIMMAGADDA, Annapoorna; RAO, KRS Sambasiva. An overview of the microbial α -amylase family. **African journal of biotechnology**, v. 2, n. 12, p. 645-648, 2003.

RODRIGUES, Maria Luiza Fernandes et al. Produção de enzimas hidrolíticas pelo fungo endofítico. **Revista Brasileira de Energias Renováveis**, v. 4, p. 129-145, 2015.

ROSANO, Germán L.; CECCARELLI, Eduardo A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. **Frontiers in microbiology**, v. 5, p. 172, 2014.

ROSANO, Germán L.; CECCARELLI, Eduardo A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. **Frontiers in microbiology**, v. 5, p. 172, 2014.

SADUNISHVILI, Tinatin. Heat Stable α -and Glucoamylase Performing Deep Enzymatic Hydrolysis of Starch to Fermentable Glucose. **European Scientific Journal ESJ**, 2019.

SAJEDI, Reza Hassan et al. A Ca-independent α -amylase that is active and stable at low pH from the Bacillus sp. KR-8104. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, n. 5-6, p. 666-671, 2005.

SANTOS, Wendel Renan Macedo dos et al. Modelagem da via de regulação gênica de ácidos graxos da bactéria Escherichia coli K12 utilizando redes booleanas. 2018.

SARDAR, Razi Ahmad Meryam. Enzyme immobilization: an overview on nanoparticles as immobilization matrix. **Biochemistry & Analytical Biochemistry**, v. 4, n. 02, 2015.

SARTOR, Giorgio. Cinetica enzimatica. 2001.

SHUKLA, Ekta; BENDRE, Ameya D.; GAIKWAD, Sushama M. Hydrolases: the most diverse class of enzymes. In: **Hydrolases**. IntechOpen, 2022.

SILVA, Luiz Fernando Duarte da. Desenho e síntese artificial de um vetor para expressão de proteínas heterólogas. 2016.

SIMAIR, Altaf Ahmed et al. Production and partial characterization of α -amylase enzyme from Bacillus sp. BCC 01-50 and potential applications. **BioMed research international**, v. 2017, n. 1, p. 9173040, 2017.

SINGH, Kritika et al. Heat, acid and chemically induced unfolding pathways, conformational stability and structure-function relationship in wheat α -amylase. **PLoS One**, v. 10, n. 6, p. e0129203, 2015.

SRINIVASAN, Bharath. A guide to the Michaelis–Menten equation: steady state and beyond. **The FEBS journal**, v. 289, n. 20, p. 6086-6098, 2022.

SU, Nan-Wei et al. Effects of temperature and sodium chloride concentration on the activities of proteases and amylases in soy sauce koji. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 53, n. 5, p. 1521-1525, 2005.

SUDAN, Sarabjeet Kour et al. Production, purification and characterization of raw starch hydrolyzing thermostable acidic α -amylase from hot springs, India. **International journal of biological macromolecules**, v. 117, p. 831-839, 2018.

SUOMINEN, Ilari et al. Extracellular production of cloned α -amylase by Escherichia coli. **Gene**, v. 61, n. 2, p. 165-176, 1987.

TERPE, Kay. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 72, n. 2, p. 211-222, 2006.

TIWARI, S. P. et al. Amylases: an overview with special reference to alpha amylase. **J Global Biosci**, v. 4, n. 1, p. 1886-1901, 2015.

VAN DER MAAREL, Marc JEC et al. Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. **Journal of biotechnology**, v. 94, n. 2, p. 137-155, 2002.

VELAZCO, Sarai et al. Modeling gene expression: lac operon. In: **2021 43rd Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine & Biology Society (EMBC)**. IEEE, 2021. p. 1086-1091.

VIEIRA, Eduardo Alano et al. New cassava cultivars for starch and flour production in the Cerrado of Central Brazil. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 20, n. 2, p. e27362023, 2020.

VIMAL, Archana; KUMAR, Awanish. Transforming the healthcare system through therapeutic enzymes. In: *Enzymes in food biotechnology*. Academic Press, 2019. p. 603-625.

WANG, Xiaoqing et al. Transgenic expression of a bacterial thermophilic amylase in the *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast to facilitate algal biofuel production. **BioEnergy Research**, v. 8, n. 2, p. 527-536, 2015.

WILTGEN, Filipe. O efeito energético e a escassez de recursos naturais. **Revista H-Tec Humanidades e Tecnologia**, v. 10, n. 2, p. 102-114, 2024.

WU, Xiangrong et al. Purification and biochemical characterization of a thermostable and acid-stable alpha-amylase from *Bacillus licheniformis* B4-423. **International journal of biological macromolecules**, v. 109, p. 329-337, 2018.

WU, Xiangrong et al. Purification and biochemical characterization of a thermostable and acid-stable alpha-amylase from *Bacillus licheniformis* B4-423. **International journal of biological macromolecules**, v. 109, p. 329-337, 2018.

XISTRA, Vera Mónica de Almeida. **Construção de um vetor de expressão de Transtirretina**. 2016. Tese de Doutorado.

YADAV, Jay Kant; PRAKASH, V. Stabilization of α -amylase, the key enzyme in carbohydrates properties alterations, at low pH. **International journal of food properties**, v. 14, n. 6, p. 1182-1196, 2011.

ZHAO, Fangfang et al. Exo-type, endo-type and debranching amylolytic enzymes regulate breadmaking and storage qualities of gluten-free bread. **Carbohydrate Polymers**, v. 298, p. 120124, 2022.

ZHAO, Fangkun et al. Secretion of the recombination α -amylase in *Escherichia coli* and purification by the gram-positive enhancer matrix (GEM) particles. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 123, p. 91-96, 2019.