

Hidrólise enzimática de matéria orgânica pela bactéria *Bacillus Subtilis*

Eddy Wilson Delgado Gonzales¹, Arion Zandoná Filho², Jair Santana³.

1 Acadêmico do curso de Tecnologia em Bioprocessos e Biotecnologia da Universidade Tuiuti do Paraná (Curitiba, PR);

2 Química, Prof. Doutor em Biotecnologia, Universidade Tuiuti do Paraná;

3 Prof. Doutor em Educação, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Arion Zandoná Filho, email: a.zandona@globo.com

RESUMO: O principal objetivo deste trabalho foi demonstrar a degradação aeróbia da matéria orgânica, da atividade agroindustrial, da qual pode se obter ou não energia de interesse industrial. Esta pesquisa evidenciou que por meio da bactéria *Bacillus Subtilis*, habitante natural do solo e que produz exo-enzimas hidrolíticas como a α -amilase, foi capaz de degradar carboidratos derivando açúcares redutores (que são carboidratos simples e/ou açúcares simples). Estes foram hidrolisados em um sistema de fermentação aeróbio em meio de cultivo amiláceos proveniente de resíduo da atividade agroindustrial. A bactéria se desenvolveu utilizando o carboidratos como forma de energia e nutrientes conforme a literatura clássica. Foi monitorado tanto o crescimento da bactéria no meio amiláceo como a conversão de seus açúcares redutores por métodos espectrofotométricos. Em fim, esta experiência mostrou a viabilidade de se obter açúcares redutores e enzimas de fontes de energias sustentáveis ao meio ambiente.

Palavras-chave: hidrólise, α -amilase, biodegradação.

ABSTRACT: The main objective was to demonstrate the aerobic degradation of organic matter, from agribusiness activity, which it can obtain or not, energy for industrial interest. This study showed that by the bacterium *Bacillus subtilis*, a natural soil inhabitant and which produces hydrolytic exo-enzymes such as α -amylase, was able to degrade carbohydrates deriving sugars (which are simple carbohydrates and / or simple sugars). These were hydrolyzed in an aerobic fermentation system in culture medium starch from agroindustrial residue. The bacteria was developed using carbohydrates as a form of energy and nutrients according to classical literature. Was monitored both the growth of bacteria in the middle starchy as the conversion of sugars by their spectrophotometric methods. In the end, this experiment showed the feasibility of obtaining reducing sugars and enzymes of sustainable energy sources to the environment.

Keywords: hidrolis, α -amylase, degradation.

INTRODUÇÃO

Os processos de fermentação cumprem uma função importante na transformação de biomassa por meio da biodegradação com microorganismos que, degradam os compostos orgânicos mais complexos como carboidratos, que são hidrolisados em matéria prima orgânica simples, com ampla utilização na industria de alimentos, minimizando os impactos ambientais gerados pelo descarte destes resíduos (LIN; CHYAU; HSU., 1998 *apud* CARVALHO, 2008). Este trabalho abordou a biodegradação aeróbia de substratos solúveis provenientes de matéria orgânica que podem ou não ser de resíduos agroindustriais por meio da digestão aeróbia realizada por bactérias denominadas facultativas, que são formadoras de ácidos ou provenientes de processos fermentativos que degradam complexos orgânicos (carboidratos, proteínas e lipídeos) e convertem a matéria prima a açúcares redutores por meio de enzimas que quebram as ligações de carbono alfa 1-4, estes açúcares fornecem energia para o metabolismo propiciando sua multiplicação (EMBRAPA¹, 2007). Enzimas de origem microbiana possuem vantagens sobre as equivalentes de origem animal ou vegetal, possibilitando a produzir em larga escala em fermentadores industriais, além de oferecer um amplo espectro de características físico-químicas, e vantagens como de menor custo de produção das enzimas hidrolíticas. (OLIVEIRA *et al*, 2007).

As amilases secretadas por uma variedade de espécies de *Bacillus* têm sido estudadas devido à sua aplicação industrial. A α -amilase de *Bacillus subtilis* convertem em açúcares solúveis simples fermentáveis por hidrolisar um açúcar derivado ou carboidratos complexos a partir do amido, são enzimas que produzem principalmente glucose e maltose (MOAT,2002 p 424).

Estudos mostram que os processos de degradação da matéria orgânica oriunda de resíduos orgânicos, esterilizados para eliminar qualquer tipo de contaminação proveniente de microorganismos patogênicos e com meios nutritivos, potencializam a atividade enzimática do microorganismo na digestão aeróbia controlada (SPIER, 2005). Segundo Speir (2005) os processos fermentativos envolvem uma série de variáveis, mesmo em laboratório, o sistema sendo afetado por diversos fatores, que incluem: pré-tratamento do sólido, composição do meio, pH inicial do meio, condições de autoclavagem ou esterilização, forma, idade e quantidade de inóculo, agitação, aeração e temperatura (SAUCEDO-CASTANEDA,1992 *apud* SPIER, 2005 p 3).

¹ EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária)

O microrganismo escolhido neste trabalho para a degradação da matéria do meio amiláceo é a bactéria *Bacillus subtilis*, a qual secreta enzimas com a finalidade de decompor, (através da hidrólise) biopolímeros, como proteínas, amidos e pectinas oriundos de tubérculos da atividade agroindustrial (COSTA, 1996). Segundo Gerardi (2003), bactérias fermentativas transformam, por hidrólise, polímeros em monômeros, e estes, em acetato, hidrogênio, dióxido de carbono, ácidos orgânicos de cadeia curta, aminoácidos e outros produtos, como glucose.

A bactéria *B. Subtilis* inicia a fase de esporulação quando as condições forem adversas, ou ao não encontrar nutrientes necessários para sua subsistência no meio de cultura, porem quando as condições forem favoráveis, reativam-se colocando seu metabolismo a funcionar para consumir os carboidratos presentes no meio e desta forma induzir a produção das exo-enzimas que hidrolisam os polissacarídeos, que são convertidos em monossacarídeos, dissacarídeos, oligossacarídeos, aminoácidos, peptídeos, proteínas e lipídeos (PEREZ *et al*, 2000).

Com tudo o principal objetivo deste trabalho, foi degradar a matéria orgânica amilácea pela bactéria *Bacillus subtilis* que por meio da hidrólise, reduziu carboidratos contidos na biomassa em açúcares redutores como glucose, maltose e frutose.

MATÉRIAS E MÉTODOS

Cultura Bactéria na

A célula do gênero: *Bacillus subtilis* que pertence ao domínio: *bactérias*; filo: *firmicutes*; classe: *bacilli*; ordem: *bacillates*; família: *bacillaceae*, são em forma de bastonete, são gram-positivas, são mesofílicas (a temperatura ideal é 37° C), e possui a capacidade de competir em meios diversos o que determina a liberação de antibióticos e exo-enzimas que hidrolisam e consomem os metabólicos primários, garantindo seu pré-domínio no meio de cultivo. Para este trabalho foram adquiridas cepas comerciais padrão de *bacillus subtilis subsp spizizenii* CCCD – B0005 (referência ATCC 6633).

Preparo do Inoculo

A bactéria *Bacillus subtilis* foi cultivado em meio TSB (Triptona soja Broth – Peptona caisena caldo). Para eclodir os esporos, preparou-se seis tubos de cultura contendo 10 ml do meio TSB, nos quais foi inoculado a bactéria (a temperatura de 37° C), com pH de 7,0 ± 0,2. (Após 24 horas constatou-se, o crescimento da bactéria na parte superficial do meio).

Testes bioquímicos descritos na bula, fornecida pelo laboratório foram utilizados como controle de qualidade.

Substrato

A matéria orgânica utilizada para este estudo com fontes de amido, proteínas, lipídeos e pectinas, foi de resíduo de batata de cultivares da região metropolitana de Curitiba utilizada na agroindústria. O material foi fragmentado e liquidificado para conseguir uma boa homogeneização em uma mistura com água mineral suficiente para conseguir um substrato amiláceos no volume de 2 litros. Três potes de vidro de 3 litros foram condicionados para os cultivos denominados MA, MB, MC, a temperatura ambiente e MC-37 a temperatura de 37°C.

MA – com massa de 1 kg, esterilizado por autoclave, diluída na razão 1:2 ;

MB – massa de 1 kg, esterilizado por metabisulfito, diluída na razão 1:2 ;

MC- massa de 500 g, meio: batata cozida, descascada, fragmentada e diluída na razão de 1:5;

MC-37- massa de 100 g, meio: batata cozida, descascada, fragmentada e diluída na razão de 1:5.

Coloração de Gram

A técnica coloração de Gram é uma técnica de coloração de preparações histológicas para observação ao microscópio óptico, utilizada para corar diferencialmente microorganismos com base na composição química e integridade da sua parede celular.

Baseado no princípio da impregnação pelo cristal violeta (corante primário) na parede celular de algumas espécies bactéria nas. Este corante forma um complexo insolúvel com uma solução fraca de iodo (lugol – mordente). Estas espécies, devido à natureza química de sua parede celular, retêm o cristal violeta mesmo após o tratamento com descorante orgânico (álcool-acetona) e são chamadas de Gram Positivas. As bactérias que perdem a coloração primária são ditas Gram negativas, sendo depois coradas pelo corante secundário (Fucsina de Ziehl diluída), tomando a coloração rósea.

Bioreator Aeróbio

Foi empregado 3 potes de vidro de 3 litros com um sistema que permitiu extração da amostra amilácea do meio e entrada de ar, livre de contaminante para o interior. Evitando a contaminação por outros microorganismos, a agitação foi realizada por meio da entrada de ar

promovida por um aerador de aquário como mostra a imagem do reator aeróbio abaixo. Neste sistema, a matéria orgânica introduzida para fermentação, teve uma determinada diluição para sofrer hidrólise a temperatura ambiente para seu funcionamento. Foi imperativo a verificação de todos os parâmetros como o pH, temperatura e nutrientes como adjuvantes indicados na tabela de nutrientes abaixo, para que o cultura pura bacteriana de *bacillus subtilis* produzisse e libera-se para ao meio as exo-enzimas α -amilase para degradar a matéria residual orgânica.

Foram empregadas as seguintes formulações de nutrientes na razão de 50ml a para cada 1000ml:

Tabela de Nutrientes	
Descrição	Qtde/ UND
Fosfato monobásico de Potássio [KN ₂ PO ₄]	12,00 g
Fosfato dibásico de sódio [Na ₂ HPO ₄]	8,00 g
Sulfato de amônio [(NH ₄) ₂ SO ₄]	2,00 g
Sulfato de Magnésio [MgSO ₄]	2,00 g
Sulfato de Manganês [MnSO ₄]	2,00 g
Agua destilada q.s.p.	1000 ml

Fonte: Tabela de Nutrientes como meio mínimo mineral de complementação. Disciplina de Eng. Bioquímica 5º período da graduação de Tecnologia em Bioprocessos e Biotecnologia, 1º semestre 2010 Prof. Funayama.



Fonte: Imagem Reator Aeróbio. Autor E.W. Delgado, 2010

Determinação do pH

O pH é o símbolo para a grandeza físico-química de potencial hidrogeniônico. Essa grandeza indica a acidez, neutralidade ou alcalinidade de uma solução aquosa. O pH pode ser determinado usando um medidor de pH (também conhecido como pHmetro) que consiste em um eletrodo acoplado a um potenciômetro. O medidor de pH é um milivoltímetro com uma escala que converte o valor de potencial do eletrodo em unidades de pH. Este tipo de eletrodo é conhecido como eletrodo de vidro, que na verdade, é um eletrodo do tipo "íon seletivo". O pH pode ser determinado indiretamente pela adição de um indicador de pH na solução em análise. A cor do indicador varia conforme o pH da solução. Indicadores comuns são a fenolftaleína, o alaranjado de metila e o azul de bromofenol. Outro indicador de pH muito usado em laboratórios é o chamado papel de tornassol (papel de filtro impregnado com tornassol). Este indicador apresenta uma ampla faixa de viragem, servindo para indicar se uma solução é nitidamente ácida (quando ele fica vermelho) ou nitidamente básica (quando ele fica azul). A determinação do pH foi efetuada através da utilização de potenciômetro modelo Lutron PH-206.

Refratometria na Escala Brix

Por meio deste método físico verificou-se a quantidade de sólidos solúveis desde o início, até o final da digestão aeróbia. Segundo Spencer, Meade (1945), este método baseia-se em um sistema de gradação de aparelhos, especialmente desenvolvido para ser utilizado na indústria açucareira, mais precisamente na análise de açúcares em geral que estejam em solução. As amostras foram preparadas a uma concentração final de 1% para serem lidas diretamente no aparelho modelo Digit ref. 20013, Refratômetro Manual com escala de 0 a 32% Brix a temperatura de 25°C.

Método Fenol-Sulfúrico

Baseia-se na determinação de açúcares simples, polissacarídeos e seus derivados incluindo os metil-ésteres com grupos redutores livres, após a desidratação dos mesmos pelo ácido sulfúrico e subsequente complexação dos produtos formados com o fenol. A mudança da cor da solução é medida na região do visível e é proporcional à quantidade de açúcares presentes na amostra. A reação é sensível e de cor estável, sendo as análises feitas de acordo com Dubois (1956). Os teores de açúcares totais foram determinados por espectrofotometria a um comprimento de onda de 490nm utilizando-se uma curva padrão de glucose (70 ug.ml^{-1}) de intervalo de 20 a 100 ug.

DNS – Açúcares Redutores Totais

O método do DNS é um método onde ocorre a oxidação do grupo carbonila. O oxidante, chamado DNS utiliza o ácido dinitro-salicílico; sal de Rochelle, (solução de tártaro de sódio de potássio) que serve para prevenir o reagente da ação do oxigênio dissolvido; fenol, que é utilizado para aumentar a quantidade de cor produzida; bissulfito, que é um estabilizante da cor obtida na presença do fenol e hidróxido de sódio, que é o redutor da ação da glicose sobre o ácido dinitro-salicílico. Neste caso a redução do 3,5-di-nitrosalicitato (de cor amarelo forte) ácido e a oxidação do monossacarídeo, a glicose, formam o 3-amino-5-nitro-salicilato (de cor laranja-marrom forte), na proporção estequiométrica segundo Miller (1959). Portanto, pela determinação da luz absorvida a 540nm pelo 3-amino-5-nitrosalicilato, determinou-se a concentração de açúcar redutor da solução, utilizando-se uma curva padrão de glicose (1 g.l^{-1}) de intervalo de 20 a 100 ug.

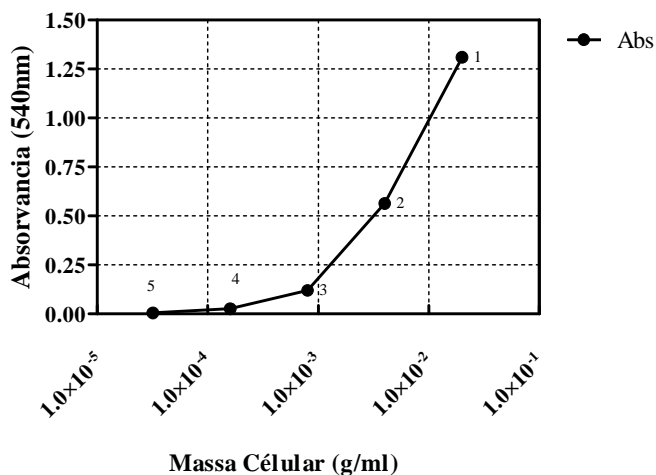
RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este trabalho utilizou métodos para mostrar os resultados e explicar como a bactéria *B. subtilis* realiza a conversão de carboidratos em açúcares durante um determinado tempo. Partindo dessa perspectiva, se verificou inúmeras ações acontecendo devido a intervenção do microrganismo no meio amiláceo, como mostra nas tabelas a seguir.

Para a contagem microbiana utilizou-se cultivo TSA (Tryptona Soja Agar- Peptona Soja Agar) constatando-se, o crescimento em placas de petri foi em 24 horas, e que através do preparo de laminas e leitura de microscopia verificou-se sua presença, pela visualização de bastonetes de coloração roxa nas lâminas, por meio a coloração de gram.

Realizou-se a relação de absorvância versus massa celular da célula bacteriana *Bacillus subtilis*, para conhecer a quantidade de células que teve uma grama de massa celular, que foi obtida através da centrifugação, e diluída em 10 ml de H₂O deionizada, foi coletado 1ml de esta amostra e se realizou diluição seriada em nove tubos de ensaio na relação 1:5 para a leitura de absorvância, após a quarta e até a novena diluição a leitura de absorvância foi de zero como mostra o gráfico 1, chegando-se aos resultados seguintes: a massa celular do de 1 ml do inoculo de 10ml é 0,10 g ($0,1 \text{ g} = 1,14 \times 10^{10}$), então conclui-se que $1 \text{ g} = 1,14 \times 10^{11} \text{ u.f.c./ml}$.

Gráfico 1
Absorvância x Massa Célular

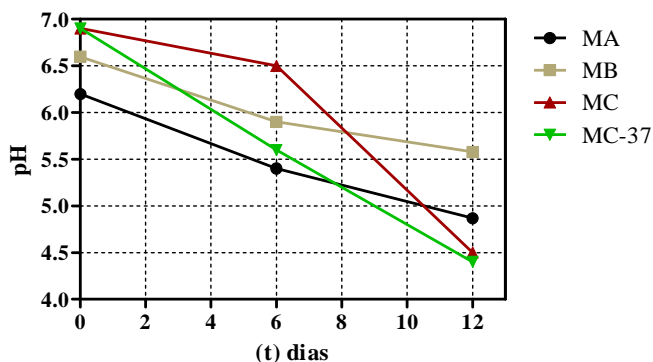


	g/ml	Abs	u.f.c.
5	$3,2 \times 10^{-5}$	0.005	3.65E+06
4	$1,6 \times 10^{-4}$	0.025	1.82E+07
3	$8,0 \times 10^{-4}$	0.120	9.12E+07
2	$4,0 \times 10^{-3}$	0.563	4.56E+08
1	$2,0 \times 10^{-2}$	1.310	2.28E+09

Gráfico 1-Fonte: Curva Absorvância versus Massa Celular da Bactéria *Bacillus subtilis* em meio TSA. Autor E.W. Delgado, 2010.

A bactéria *Bacillus subtilis* pode crescer em uma ampla faixa de concentrações de íons de hidrogênio (pH). Geralmente crescem em uma faixa de pH 5 a pH 9. Embora sejam neutrofilas normalmente não crescem sob condições extremas de ácido ou base, podendo sobreviver a todas essas exposições em vários graus, se passarem por uma transição adaptativa na qual o pH muda gradualmente. (MOAT, 2002 p 615). Através das medições de pH, desde o início até o fim o meio de cultivo amiláceo variou de pH 4 até 6 possibilitando tanto a reação da enzima amilolítica bactéria na como a multiplicação e conversão de carboidratos em condições ácidas como mostra o gráfico 2.

Gráfico 2
Variação pH do Meio Amiláceo



Dias	pH			
	MA	MB	MC	MC-37
0	6,20	6,60	6,9	6,9
6	5,40	5,90	6,5	5,6
12	4,87	5,58	4,5	4,4

Gráfico 2-Fonte: Variação do pH do Meio Amiláceo. Autor E.W. Delgado, 2010

O Gráfico 3 mostra o resultado da refratometria medida em °Brix, dos meios amiláceos que reduziram os açúcares livres dissolvidos no meio, a medida que a bactéria *B. subtilis* cresceu e se multiplicou em uma faixa de 2,2 a 0,4 °Brix no período de 12 dias.

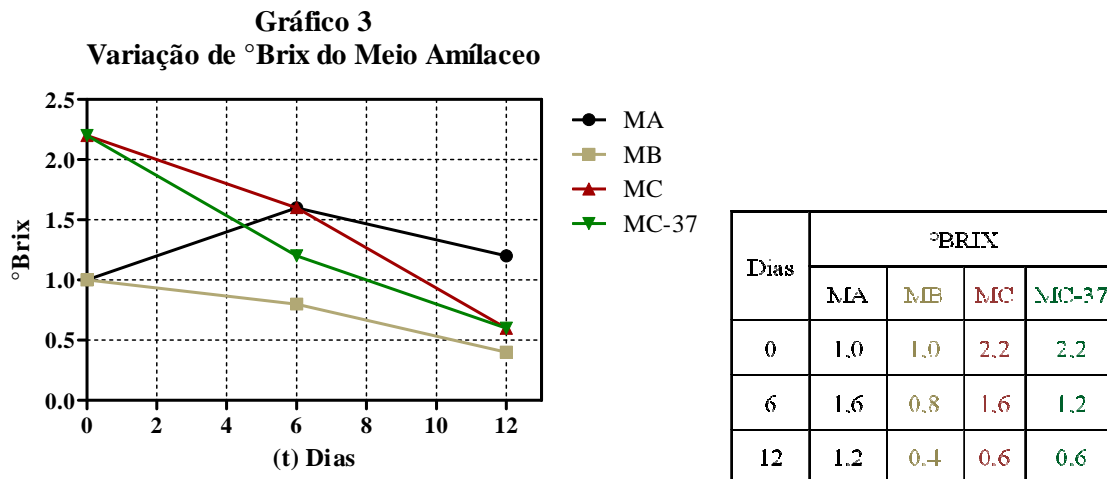


Gráfico 3- Fonte: Variação do °Brix do Cultivo Amiláceo. Autor E.W. Delgado, 2010

O Gráfico 4 mostra a variação da concentração dos açúcares totais livres em valores que vão diminuindo nos meios amiláceos utilizados na fermentação hidrolítica pela bactéria *B. subtilis* no período de 12 dias. De acordo com Silva (2003) os métodos tradicionalmente usados nas pesquisas de açúcares totais se fundamentam principalmente na hidrólise ou digestão dos compostos orgânicos pelo tratamento com ácidos, geralmente o ácido sulfúrico, produzindo cores devido à reação. Este método fenol sulfúrico é muito utilizado nas indústrias de alimentos, mas apresenta algumas desvantagens por trabalhar com grandes quantidades de ácido sulfúrico (TREVELYAN, 1952 *apud* SILVA, 2003 p 340).

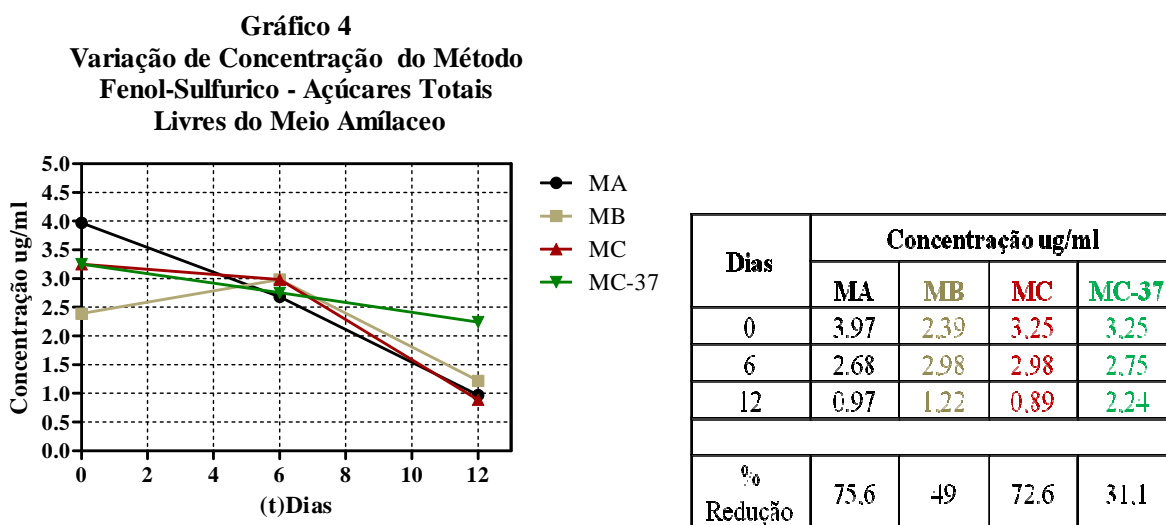
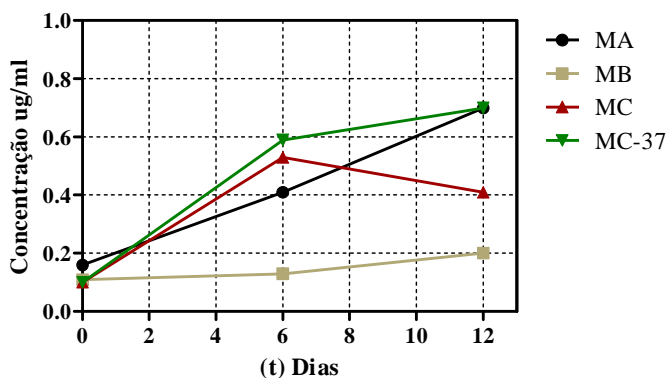


Gráfico 4 – Fonte: Variação concentração método Fenol-Sulfurico. Açúcares Totais Livres do Cultivo Amiláceo. Autor E.W. Delgado, 2010

A variação ascendente mostrada no gráfico 5 evidencia a liberação e atividade das exo-enzimas no meio amiláceo pela bactéria *B. Subtilis*, de todos os meios amiláceos destacou-se o meio MC-37 por ter sido condicionado a 37° C e por estar diluído a razão de 1:5. Já os meios MA, MB, MC que foram condicionados a temperatura ambiente, porém seu rendimento e variação deveu-se a forma de esterilização que sofreram os meios MA e MC que foram esterilizados por calor ao invés que meio amiláceo MB que foi esterilizado usando-se metabisulfito.

Gráfico 5
Varição da Concentração DNS
Açúcares redutores livres
do Meio Amiláceo



Dias	Concentração µg/ml			
	MA	MB	MC	MC-37
0	0,16	0,11	0,10	0,10
6	0,41	0,13	0,53	0,59
12	0,70	0,20	0,41	0,70
% Fermada	437,5	181,8	410	700

Gráfico 5- Fonte: Variação da concentração Método DNS. Açúcares Redutores Livres do Meio Amiláceo. Autor E.W. Delgado, 2010

Este estudo mostrou que há viabilidade no processo de digestão na fase de hidrólise por bactérias hidrolíticas da família *Bacillaceae* do gênero *Bacillus subtilis*, por converterem carboidratos em açúcares redutores, os quais são passíveis de quantificar, através de métodos espectrofotométricos, como Método Fenol-Sulfúrico para açúcares totais no gráfico 4 e DNS para açúcares redutores livres no gráfico 5. Por outro lado, verificou-se também a presença da enzima α -amilase, pela quantidade de açúcares redutores livres de acordo com o resultado do método mostrado no gráfico 5, a qual foi liberada pela célula bactéria na para degradar os polissacarídeos.

Comparando-se os gráficos 4 e 5, os resultados que indicam que houve redução dos açúcares totais livres e um aumento dos açúcares redutores livres, até os doze dias. Segundo Moat (2002 p 430, 596), a atividade enzimática da α -amilase bacteriana do *B. Subtilis* é de pH 5 a 7, o que mostrou que os meios amiláceos estiveram na faixa de pH mencionada, como indica os valores do gráfico 2, pela produção de acetato durante o crescimento exponencial.

Para termos um rendimento satisfatório foi necessário tomar em conta os fatores que influenciam na velocidade de crescimento, a temperatura e o meio para estimular a liberação de exo-enzimas como a α -amílase para hidrolisar moléculas de carboidratos e convertermos em açúcares redutores.

CONCLUSÃO

Neste trabalho verificou-se que a variação de pH de 4 a 7, propício a atividade enzimática, que mesmo estando ácida, teve-se a conversão dos carboidratos em açúcares redutores pela enzima α -amílase, evidenciado pelos métodos fenol-sulfúrico e DNS, confirmando a viabilidade destas fontes alternativas, para obtenção dos açúcares redutores e da enzima bacteriana do *B. Subtilis*. O condicionamento do meio amílaseo deve-se a falta de nutrientes complementares, essenciais para o metabolismo bacteriano e uma vez satisfeito esta necessidade o *B. Subtilis* libera para o meio as exo-enzimas α -amílase hidrolisando os carboidratos obtendo a energia necessária para seu desenvolvimento e multiplicação no meio amílaseo.

Por outro lado, as enzimas presentes no meio amílaseo já degradado poderão ser quantificadas e extraídas e os açúcares redutores podem vir a ser recuperados e utilizados como metabólicos primários por outros microrganismos para um novo processo de estudos posteriores.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CARVALHO, R.V.; CORRÊA, T.L.R.; SILVA, J.C.M.; VIANA, A.P. & MARTINS, M.L.L., **Otimização das condições de cultivo para a produção de amilases pelo termofílico *Bacillus* sp. e hidrólise de amidos pela ação da enzima**, Ciência e Tecnologia de Alimentos. ISSN 0101-2061, 2008.
- COSTA, J.A.V. **Estudo da Produção de Amiloglucosidase por *Aspergillus Níger* NRRL 3122 em Fermentação Semi-Sólida de Farelo de Arroz**. Tese de Doutorado em Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 203 p., 1996.
- DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. **Colorimetric Method form Determination of Sugars and Related Substances**. Nature, v. 28, n. 3, p. 350 — 356, 1956.

- EMBRAPA, 2007, **Operação, Monitoramento e Manutenção da Estação de Tratamentos de Esgotos na Embrapa milho e Sorgo**, Sete Lagoas, MG, Embrapa Milho e Sorgo, pp 24, 2007.
- GERARDI, MICHEL H., **The Microbiology of Anaerobic Digesters**", John Wiley & Sons, Inc. ISBN 0-471-20693-8, 2003.
- LIN, L. L.; CHYAU, C. C.; HSU, W. H., **Production and properties of a raw starch-degrading amylase from the thermophilic and alkalophilic Bacillus sp. TS-23**. *Biotechnology Applied and Biochemistry*, v. 28, n. 1, p. 61-68, 1998.
- MILLER, G.L. **Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. Analytical Chemistry**. v. 31, n.3, p. 426-429, 1959.
- MOAT, A. G.; FOSTER, J. W.; SPECTOR, M. P., **Microbial Physiology**, fourth edition, Wiley Liss, 2002.
- OLIVEIRA, A. N.; OLIVEIRA, L. A.; ANDRADE, J. S.; JUNIOR, C., **Produção de Amilase por Rizóbios, usando farinha de pupunha como substrato: Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 1, p. 61-66, jan./mar, 2007.
- PEREZ, A.R.; MELLO, A.A. & POGLIANO, K., **SpoIIB Localizes to Active Sites of Septal Biogenesis and Spatially Regulates Septal Thinning during Engulfment in Bacillus subtilis**, *Journal of Bacteriology*, p 1096-1108, vol 182, No 4, Feb, 2000.
- SAUCEDO-CASTANEDA, G. et al. **Maintenance Of Heat And Water Balances As A Scale-Up Criterion For The Production Of Ethanol By Schwanniomyces Castellii In A Solid State Fermentation System**. *Process Biochemistry*. v. 27, p. 97-107, 1992.
- SILVA, R.N.; MONTEIRO, V.N.; ALCANFOR, J.D.X.; ASSIS, E.M. & ASQUIERI, E.R., **Comparação de métodos para a determinação de açúcares redutores e totais em mel**, *Ciencia Tecnologia*, set.-dez. 2003.
- SPENCER, G.L.; MEADE, G.P., **Especial Reagens. Cane Sugar Handbook**, New York, Wiley, 1945.
- SPIER, MICHELE RIGON. **Produção de enzimas amilolíticas fúngicas α -amilase e amiloglicosidase por fermentação no estado sólido**. *Disertação para obtenção de Mestrado (Pós graduação em Tecnologia de alimentos)*. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.
- TREVELYAN, W.E.; HARRISON, T.S. **Dosagem de glicídios totais pelo método Antrona**. *J. Biochem.*, v. 50, p. 292, 1952.