

UTILIZAÇÃO DE SORO DE LEITE PARA A PRODUÇÃO DE  
AMILASES POR *Bacillus* sp. SMIA-2

**LUCIANA RIBEIRO COUTINHO DE OLIVEIRA MANSUR**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY  
RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ  
ABRIL - 2006

UTILIZAÇÃO DE SORO DE LEITE PARA A PRODUÇÃO DE  
AMILASES POR *Bacillus* sp. SMIA-2

LUCIANA RIBEIRO COUTINHO DE OLIVEIRA MANSUR

Tese apresentada ao Centro de Ciências e  
Tecnologias Agropecuárias da Universidade  
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,  
como parte das exigências para obtenção do  
título de Mestre em Produção Vegetal

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Meire Lélis Leal Martins

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ  
ABRIL – 2006

UTILIZAÇÃO DE SORO DE LEITE PARA A PRODUÇÃO DE  
AMILASES POR *Bacillus* sp. SMIA-2

LUCIANA RIBEIRO COUTINHO DE OLIVEIRA MANSUR

Tese apresentada ao Centro de Ciências e  
Tecnologias Agropecuárias da Universidade  
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,  
como parte das exigências para obtenção do  
título de Mestre em Produção Vegetal

Aprovada em 06 de abril de 2006.

Comissão Examinadora:

---

Prof. Carlos Alberto Martins Cordeiro (Doutor, Produção Vegetal) – UNESA

---

Prof<sup>a</sup>. Karla Silva Ferreira (Doutora, Ciência e Tecnologia de Alimentos) – UENF

---

Prof<sup>a</sup>. Silvia Menezes de F. Pereira (Doutora, Engenharia e Ciências dos  
Materiais) – UENF

---

Prof<sup>a</sup>. Meire Lelis Leal Martins (Ph. D., Microbiologia Industrial) – UENF

Orientadora

## **AGRADECIMENTO**

A Deus, presente em todos os momentos da minha vida.

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, pela oportunidade de realização desse curso.

À professora Meire Lélis Leal Martins, pela orientação e conhecimentos transmitidos.

Aos professores Karla Silva Ferreira, Carlos Alberto Martins Cordeiro e Silvia Menezes de Faria Pereira, pela participação na defesa de tese e sugestões para este trabalho.

À Ana Lúcia, técnica do Laboratório de Microbiologia Industrial de Alimentos, que me acolheu com tanto carinho e por sempre estar disposta a nos ajudar.

Às amigas, Luciana Konda, Raquel e Camila, e estagiárias, pela amizade e ajuda prestada no laboratório.

Aos meus pais, Antônio e Aida, e a minha irmã, Juliana, pelo carinho e incentivo.

Ao meu marido, Emil, e aos meus sogros, Elizabeth e José Ricardo, pelo apoio.

A todos que, de uma forma ou de outra, colaboraram para a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	viii
ABSTRACT .....	x
1. INTRODUÇÃO .....	01
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	03
2.1. Microrganismos termofílicos .....	03
2.2. Enzimas .....	05
2.3. Enzimas produzidas por microrganismos termofílicos .....	06
2.4. Amilases .....	06
2.4.1. Utilização de amilases pelas indústrias .....	09
2.4.2. $\alpha$ -amilase .....	12
2.5. Utilização de resíduos agroindustriais em processos biotecnológicos .....	14
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	18
3.1. Microrganismo .....	18
3.2. Manutenção do microrganismo .....	18
3.3. Meio de crescimento .....	19
3.4. Preparo do inóculo .....	19
3.5. Crescimento do microrganismo .....	20

3.6. Determinação do pH .....	20
3.7. Determinação da atividade de $\alpha$ -amilase .....	20
3.8. Efeito da adição de água de maceração de milho ao meio de cultura sobre o crescimento do microrganismo e atividade da $\alpha$ -amilase .....	21
3.9. Efeito da adição de lactose ao meio de cultura sobre o crescimento do microrganismo e atividade da $\alpha$ -amilase .....	21
3.10. Efeito da adição de diferentes concentrações de soro de leite ao meio de cultura sobre o crescimento do microrganismo e atividade da $\alpha$ -amilase .....	22
3.11. Caracterização da $\alpha$ -amilase bruta .....	22
3.11.1. Efeito do pH na atividade e estabilidade da enzima .....	22
3.11.2. Efeito da temperatura na atividade e estabilidade da $\alpha$ -amilase .....	23
3.11.3. Efeito dos íons metálicos na atividade da $\alpha$ -amilase .....	23
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	24
4.1. Perfil do crescimento de <i>Bacillus</i> sp. no meio contendo soro de leite .....	24
4.2. Efeito da suplementação do meio de cultura com água de maceração de milho.....	26
4.3. Efeito da lactose sobre o crescimento e atividade de $\alpha$ -amilase de <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2.....	30
4.4. Influência da concentração do soro de leite no meio de cultura sobre o crescimento e atividade de $\alpha$ -amilase.....	32
4.5. Perfil do crescimento de <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2 e atividade de $\alpha$ -amilase em condições otimizadas do meio de cultura .....	34
4.6. Características da $\alpha$ -amilase bruta .....	35
4.6.1. Efeito da temperatura sobre a atividade da $\alpha$ -amilase e estabilidade térmica da enzima .....	35
4.6.2. Efeito do pH sobre a atividade e estabilidade da $\alpha$ -amilase .....	36
4.6.3. Efeito dos íons metálicos na atividade da $\alpha$ -amilase .....	38
5. RESUMO E CONCLUSÕES .....	40
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Crescimento (■), atividade de  $\alpha$ -amilase (▲) e pH (●) em função do período de crescimento de *Bacillus* sp. SMIA-2 em meio de cultura contendo soro de leite (meio 1).....25
- Figura 2 Crescimento de *Bacillus* sp. SMIA-2 (a) e atividade de  $\alpha$ -amilase (b) em meio de cultura contendo soro de leite (meio 1) e suplementado ou não com água de maceração de milho.....27
- Figura 3 Crescimento de *Bacillus* sp. SMIA-2 (a) e atividade de  $\alpha$ -amilase (b) em meio de cultura contendo soro de leite (meio 1) e suplementado com diferentes concentrações de água de maceração de milho.....28
- Figura 4 Crescimento de *Bacillus* sp. SMIA-2(a) e atividade de  $\alpha$ -amilase (b) em meio de cultura contendo soro de leite (meio 2) e lactose em diferentes concentrações .....31
- Figura 5 Crescimento de *Bacillus* sp. SMIA-2(a) e atividade de  $\alpha$ -amilase (b) em meio de cultura contendo lactose (0,2%) e soro de leite (meio 2) em diferentes concentrações .....33
- Figura 6 Crescimento (■), atividade de  $\alpha$ -amilase (▲), açúcar redutor (▼) e pH (●) em função do período de crescimento de *Bacillus* sp. SMIA-2



	em meio de cultura contendo soro de leite (0,1% - meio 2), água de maceração de milho (0,05%) e lactose (0,2%).....	34
Figura 7	Efeito da temperatura na estabilidade (■) e na atividade de $\alpha$ -amilase (▼) de <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2.....	36
Figura 8	Efeito do pH na estabilidade (■) e na atividade de $\alpha$ -amilase (▼) de <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2.....	37

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Exemplos de enzimas da família $\alpha$ -amilase que atuam em substratos contendo glicose.....	09
Tabela 2	Setores de aplicação de enzimas da família das $\alpha$ -amilases.....	12
Tabela 3	Propriedades gerais de amilases secretadas por algumas espécies de <i>Bacillus</i> .....	13
Tabela 4	Efeito de alguns íons metálicos, nas concentrações de 5 mM e 10 mM, na atividade da $\alpha$ -amilase de <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2.....	39

## RESUMO

MANSUR, Luciana Ribeiro Coutinho de Oliveira; M. Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; abril de 2006; Utilização de soro de leite para a produção de amilases por *Bacillus* sp. SMIA-2; Professora orientadora: Meire Lélis Leal Martins.

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), em Campos dos Goytacazes – RJ, com o objetivo de estudar a produção de amilases pelo termofílico *Bacillus* sp. SMIA-2, quando cultivado num meio de cultura contendo soro de leite. A produção de  $\alpha$ -amilase por esse microrganismo, em culturas líquidas contendo o soro de leite, alcançou o máximo após 12 horas de incubação, com níveis de 38  $\mu\text{mol}$  glicose/ml, quando o crescimento já havia sido cessado e a cultura encontrava-se na fase estacionária. A adição da água de maceração de milho (0,05%) ao meio de cultura contendo o soro de leite proporcionou um aumento dos valores da densidade ótica da cultura e da atividade de  $\alpha$ -amilase. Este aumento foi mais acentuado quando a atividade foi determinada após 24 horas de crescimento do microrganismo. O aumento na concentração da

água de maceração de milho de 0,05% até 0,4% não afetou o crescimento do microrganismo. Apenas quando esse resíduo foi utilizado na concentração de 0,5%, é que se observou um aumento do crescimento do microrganismo. Por outro lado, a atividade da  $\alpha$ -amilase não aumentou quando a concentração da água de maceração de milho no meio de cultura foi aumentada. Quando o microrganismo foi cultivado no meio contendo o soro de leite sem a presença da lactose, foi observado um baixo crescimento do mesmo. À medida que se aumentou a concentração desta fonte de carbono, a densidade ótica da cultura aumentou. Porém, em relação à secreção da enzima, foi verificado que, quando a lactose foi adicionada ao meio em concentrações de até 0,2%, houve um aumento da atividade da  $\alpha$ -amilase. Concentrações maiores que 0,2% inibiram a atividade da enzima. O aumento da concentração do soro de leite no meio de cultura de 0,02% a 0,2% não influenciou no crescimento de *Bacillus* sp. SMIA-2, embora tenha se observado um ligeiro decréscimo da densidade ótica na concentração de 0,2%. Por outro lado, à medida que a concentração deste resíduo foi aumentada no meio de cultura, a atividade da  $\alpha$ -amilase também aumentou. A caracterização da  $\alpha$ -amilase revelou que a enzima apresentou uma atividade crescente entre 50 °C e 90 °C, onde a atividade atingiu o seu valor máximo. Acima de 90 °C, ocorreu uma redução drástica da atividade da enzima, sendo que a 100 °C a  $\alpha$ -amilase foi completamente inativada. Em relação à estabilidade térmica da  $\alpha$ -amilase, verificou-se que esta enzima mostrou-se mais estável a 80 °C, mantendo 95% da sua atividade. Entretanto, a 90 °C a enzima perdeu 75% de sua atividade. O pH ótimo da enzima foi 8,5. Uma redução da atividade da ordem de 45% foi observada para valores de pH iguais a 9,0 e 9,5. A estabilidade da  $\alpha$ -amilase aumentou com o aumento do pH até, mais ou menos, 8,5. Já em pH 10, cerca de 76% da atividade enzimática foi perdida. Os íons metálicos  $Zn^{2+}$ ,  $Li^+$ ,  $Ba^{2+}$  e  $Na^+$  estimularam a atividade da  $\alpha$ -amilase de *Bacillus* sp. SMIA-2 em ambas as concentrações estudadas (5 e 10 mM) ou em apenas uma delas. Por outro lado, íons como o  $Ni^+$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  e  $Co^{2+}$  inibiram a atividade da  $\alpha$ -amilase.

## ABSTRACT

MANSUR, Luciana Ribeiro Coutinho de Oliveira; M. Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; April, 2006; Utilization of milk whey to production of amylases by *Bacillus* sp. SMIA-2; Orienting Professor: Meire Lélis Leal Martins.

The present work was carried out at the Laboratório de Tecnologia de Alimentos of the Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), Campos dos Goytacazes-RJ and had as the objective to study the production of  $\alpha$ -amylase by thermophilic bacterium, *Bacillus* sp SMIA-2, when growth in a medium containing milk whey. The production of  $\alpha$ -amylase by thermophilic *Bacillus* cultivated in liquid cultures containing milk whey reached a maximum activity after 12 h of incubation with levels of 38  $\mu\text{mol}$  glucose/mL, when the growth had stopped and the culture was in the stationary phase. The addition of corn steep liquor (0.05%) into the medium increased the growth of the microorganism and the activity of the  $\alpha$ -amylase. This increase was more pronounced when the activity was measured after 24 h of growth the microorganism. The increase in the corn steep liquor concentration from 0.05% to 0.4% did not increase the growth of the microorganism. Only when this residue

was utilized in the concentration of 0.5% was observed an increased in the growth of the microorganism. On the other hand, the activity of  $\alpha$ -amylase did not change with the increase of the corn steep liquor concentration. When the microorganism was cultivated in the medium containing milk whey without lactose was observed a low growth of this organism. With the increase of this source of carbon in the medium, the growth of the organism also increased, but the activity of  $\alpha$ -amylase increased until concentrations of 0.2%. Values higher than 0.2% inhibited the synthesis of the enzyme. The increased of the milk whey in the culture medium from 0.02% to 0.2% did not influence the growth of the organism, although was observed a slightly decreased in the optical density of the culture at 0.2% concentration. On the other hand, increasing the milk whey concentration in the medium, increased the activity of  $\alpha$ -amylase too. Studies on the  $\alpha$ -amylase characterization revealed that the enzyme increased the activity at temperatures between 50 °C and 90 °C, where the activity reached its maximum. Above 90 °C occurred a reduction in the activity of the enzyme and at 100 °C the amylase lost about 46% of its activity. Regarding the thermal stability of  $\alpha$ -amylase was observed that this enzyme showed more stable at 80 °C, maintaining 95% of its activity. However, at 90°C the enzyme lost about 75 % of its activity. The optimum pH of  $\alpha$ -amylase was found to be 8.5. At values of pH of 9.0 and 9.5 the enzyme lose about 45% of its activity. The stability of the enzyme increased with the increase of pH until 8.5. At pH 10 about 76% of the activity of the enzyme was lost. The metallic ions  $Zn^{2+}$ ,  $Ba^{2+}$  and  $Na^+$  stimulated the activity of  $\alpha$ -amylase in both or in one of the concentrations studied (5 mM and 10 mM). On the other hand, the ions like  $Ni^+$ ,  $Fe^2$ ,  $Cu^2$  and  $Co^2$  inhibited the enzyme activity.

## 1. INTRODUÇÃO

As  $\alpha$ -amilases são endoenzimas produzidas por bactérias, fungos, leveduras, animais e vegetais e têm ampla aplicação nas indústrias têxteis, de alimentos, papel, detergentes, farmacêutica e bioquímica, de couro, entre outras.

As amilases produzidas por microrganismos termofílicos têm recebido considerável atenção da indústria por serem termorresistentes e por possuírem características importantes como estabilidade à temperatura e ao pH. Entre as  $\alpha$ -amilases bacterianas, as secretadas pelo gênero *Bacillus* são as mais importantes industrialmente. Há citação na literatura de que mais de 60% das linhagens de *Bacillus* listadas na 8ª edição do “Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology (1975) são produtoras de  $\alpha$ -amilase. *Bacillus subtilis*, *Bacillus macerans*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus licheniformis*, dentre outras, são linhagens produtoras da enzima.

A utilização de resíduos agroindustriais como substrato para a produção de amilases tem se mostrado uma grande alternativa na redução do custo de produção destas enzimas. O soro de leite, um resíduo altamente rico em proteínas, tem sido utilizado por diversos pesquisadores (Kosikowski, 1979; Feijoo et al., 1999; Romero et al., 2001) para a produção de amilases. Além disso, a água de maceração do milho, resíduo resultante do processamento dos grãos de

milho, tem sido adicionada ao meio de cultura para o crescimento de microrganismos e produção de enzimas.

Apesar de existirem muitos trabalhos sobre a produção e propriedades de  $\alpha$ -amilases bacterianas, as informações apresentadas, na maioria dos casos, dificilmente podem ser generalizadas para diferentes linhagens. Isto se deve ao fato de que os diferentes microrganismos se comportam de maneira diferente frente a uma mesma condição de incubação, podendo produzir enzimas com propriedades diversas.

Neste trabalho, foi pesquisado o efeito da adição de água de maceração de milho e lactose sobre a produção de  $\alpha$ -amilase por um microrganismo termofílico, *Bacillus* sp. SMIA-2, quando cultivado num meio de cultura contendo soro de leite. Algumas propriedades bioquímicas da enzima bruta, como estabilidade em diferentes temperaturas e pH, assim como o efeito de íons metálicos sobre a atividade de  $\alpha$ -amilase foram também investigadas.



## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Microrganismos termofílicos

Uma das mais surpreendentes propriedades dos microrganismos é a habilidade em se adaptar a ambientes extremos, nos quais fatores como pH, temperatura, pressão e concentração de sal ultrapassam valores considerados como padrão para a maioria dos organismos (Lasa e Berenguer, 1993).

A maioria dos organismos atualmente conhecidos pode crescer somente dentro de uma faixa estreita de temperatura. A existência de ambientes geotérmicos estáveis tem permitido a seleção ou a persistência de microrganismos que não apenas resistem, mas também requerem altas temperaturas para sobreviverem. A adaptação de microrganismos em condições ambientais extremas obrigou-os a desenvolver componentes celulares e estratégias bioquímicas para garantir sua sobrevivência. Essas estratégias implicam a estabilização de todos os componentes celulares de modo que sua funcionalidade seja mantida em condições que seriam danosas para a maioria das biomoléculas dos organismos mesofílicos (Santos et al., 2001). Por isto, estes microrganismos são chamados de termófilos ou termofílicos.

De acordo com sua faixa de temperatura de crescimento, os organismos termofílicos foram arbitrariamente divididos em três classes (Brock, 1978): moderadamente termofílicos, com crescimento ótimo em temperaturas entre 45-60 °C; extremamente termofílicos, com crescimento entre 60-95 °C; e hipertermofílicos, cuja temperatura ótima de crescimento supera 90 °C. Ressalta-se que a maioria das bactérias cresce mais rapidamente entre 25 e 40 °C e que ainda não se encontraram animais ou plantas multicelulares que vivam acima dos 50 °C (Bertoldo e Antranikian, 2002).

A temperatura é um dos fatores ambientais mais importantes que influenciam o crescimento e a sobrevivência dos organismos (Madigan et al., 1996). Em temperaturas elevadas, a maioria das enzimas e ácidos nucléicos dos microrganismos desnatura. O papel das proteínas na adaptação dos termofílicos é extremamente importante. Uma única mutação na seqüência de aminoácidos de uma proteína pode promover o aparecimento de uma fonte termossensível da mesma, impossibilitando a linhagem mutada de crescer na mesma temperatura da linhagem selvagem (Fontana, 1991). Assim, todas as evidências indicam que o aumento da estabilidade de enzimas termofílicas não pode ser atribuído a determinantes únicos, mas é o resultado de várias mudanças nos aminoácidos, com efeitos cumulativos na estabilidade em relação à estrutura de proteínas homólogas de mesófilos (Matsumura et al., 1986). Organismos termofílicos produzem enzimas que, em geral, são mais termestáveis que aquelas produzidas por mesofílicos (Legin et al., 1997).

Durante o crescimento dos microrganismos termofílicos, ao contrário do que ocorre com os mesofílicos, observa-se que a fase logarítmica é curta e, muitas vezes, difícil de ser medida. Os esporos germinam e as células multiplicam-se rapidamente. Alguns microrganismos termofílicos têm tempo de geração de 10 minutos em altas temperaturas. A velocidade da morte também é rápida. A perda da viabilidade ou auto-esterilização abaixo da faixa de temperatura de crescimento é característica desses microrganismos (Franco e Landgraf, 1996).

O isolamento de linhagens bacterianas a partir de amostras de solo tem sido freqüente (Soares et al., 1999; Soares et al., 2001; Gomes et al., 2001; Nunes e Martins, 2001). Isso é possível pela presença de esporos que conferem a esses microrganismos resistência às condições desfavoráveis que esses locais

podem oferecer. A busca em solos cultivados com plantações como de mandioca e milho, que têm o amido como substância de reserva, aumenta a possibilidade de serem encontradas linhagens amilolíticas, uma vez que o tipo de microrganismo que está presente na microflora do solo está relacionado às oportunidades nutricionais oferecidas pelo ambiente.

## **2.2. Enzimas**

As enzimas são catalisadores protéicos das reações bioquímicas. A maioria destas reações ocorreria muito lentamente se não fossem catalisadas por enzimas. Cada enzima catalisa um pequeno número de reações, portanto, são catalisadores com especificidade de reação (Murray et al., 1994).

Com base no local de ação, são considerados dois tipos de enzimas: enzimas intracelulares, que atuam no interior da célula, e enzimas extracelulares, que atuam fora da célula. A principal função das enzimas extracelulares é a de executar as alterações necessárias à penetração dos nutrientes para o interior das células. As enzimas intracelulares sintetizam o material celular e também realizam reações catabólicas que suprem as necessidades energéticas da célula (Pelczar et al., 1981).

As enzimas que são capazes de hidrolisar as ligações glicosídicas dos polissacarídeos que compõem o grânulo de amido, amilose e amilopectina são denominadas enzimas amilolíticas ou amilases. Conforme seu modo de ação, as enzimas amilolíticas podem ser divididas em duas grandes categorias: endoamilases, que hidrolisam ligações glicosídicas ao acaso ao longo das cadeias de amilose e amilopectina, e as exoamilases, que hidrolisam, sucessivamente, ligações glicosídicas a partir da extremidade não redutora das mesmas (Vihinem e Mäntsälä, 1989; Guzmán-Maldonado e Paredes-López, 1995). Para que ocorra uma conversão eficiente das macromoléculas do amido em compostos de baixo peso molecular, é necessária a ação coordenada de muitas enzimas.

A maioria das enzimas utilizadas como catalisadores para a biotransformação é obtida de microrganismos mesofílicos e, apesar das muitas vantagens que apresentam, sua aplicação é restrita pelo seu limite de

estabilidade à temperatura, pH e forças iônicas extremas (Hough e Danson, 1999).

### **2.3. Enzimas produzidas por microrganismos termofílicos**

As enzimas produzidas por microrganismos termofílicos são conhecidas como termoenzimas ou enzimas termestáveis e possuem uma temperatura ótima de atividade por volta de 60 °C (Vieille e Zeikus, 1996; Tolner et al., 1997; Andrade et al., 1999).

Enzimas de microrganismos termofílicos e extremotermofílicos têm recebido considerável atenção da indústria por causa de suas características especiais, como estabilidade térmica e alta estabilidade às mudanças de pH, conseqüentemente, essas moléculas têm considerável utilidade industrial, oferecendo melhores rendimentos sobre condições operacionais extremas (Andrade et al., 1999).

As termoenzimas possuem características como estabilidade à temperatura e a determinadas faixas de pH. Elas podem ser usadas em diversos processos industriais, nos quais, substituem as enzimas produzidas por microrganismos mesofílicos ou produzidas sinteticamente. A resistência térmica à desnaturação de uma enzima é considerada como um dos critérios mais importantes para sua aplicação industrial; o uso dessas enzimas em processos conduzidos a altas temperaturas reduz o risco de contaminação microbiana (Aguilar, 1996; Archana e Satyanarayana, 1997; Bruins et al., 2001; Lee et al., 2001).

Apesar das vantagens que as enzimas termofílicas oferecem para o uso rotineiro na indústria, a aplicação biotecnológica de microrganismos termofílicos tem sido muito limitada até agora. As razões para esta contradição são muitas, mas a principal delas está relacionada ao escasso número de linhagens termofílicas para a pesquisa de enzimas termestáveis específicas, disponíveis em coleções (Aquino, 2000).

### **2.4. Amilases**

As amilases, tanto no grupo dos eucariotos como no grupo dos procariotos, atuam como uma das principais enzimas responsáveis pela obtenção

de energia para as funções metabólicas a partir do amido como fonte de carbono. Porém, na maioria dos eucariotos, essas enzimas atuam em tecidos ou órgãos específicos relacionados à nutrição do organismo, o que inviabiliza, na maioria dos casos, a sua extração e purificação para o uso comercial. Assim, os microrganismos termofílicos surgem como uma alternativa simples e barata para a produção dessas enzimas, uma vez que requerem condições muitas vezes mínimas de nutrição e de manutenção, apresentam alta eficiência na produção, além de secretarem as enzimas para o meio extracelular.

Uma grande variedade de microrganismos produz um ou mais tipos de amilases. As amilases produzidas por microrganismos termofílicos apresentam características mais termoestáveis do que as produzidas pelos microrganismos mesofílicos. Essas amilases termestáveis são de grande interesse na indústria de processamento do amido, uma vez que a temperatura de gelatinização do mesmo fica em torno dos 70 °C. Inúmeros trabalhos têm reportado a produção de amilases por microrganismos termofílicos. Seus dados indicam que fungos e bactérias são capazes de produzir diferentes tipos de amilases termestáveis, as quais apresentam características físico-químicas variadas (Mamo et al., 1999; Mamo e Gessesse, 1999).

As amilases são enzimas de natureza extracelular, uma vez que o amido, o substrato das amilases, possui alto peso molecular, não podendo passar através da célula microbiana, sendo então essas enzimas produzidas dentro da célula e posteriormente excretadas para o meio. Para que o microrganismo acelere a síntese dessas enzimas, a célula recebe um sinal por meio de fragmentos de baixo peso molecular, formados pela ação de pequenas quantidades de enzimas produzidas constitutivamente (Goto et al., 1998).

As enzimas de maior importância na hidrólise do amido são:  $\alpha$ -amilases (E.C.3.2.1.1 1,4- $\alpha$ -D-glucano glucanohidrolase) - correspondem a endoamilases que atuam ao acaso ao longo das cadeias de amilose e amilopectina hidrolisando as ligações  $\alpha$ -1,4 e liberando maltose, glicose e dextrina (Antranikian et al., 1995; Vihinem e Mäntsälä, 1989). Também são chamadas enzimas dextrinizantes e são divididas em duas categorias de acordo com o grau de hidrólise do substrato:  $\alpha$ -amilases sacarificantes, que hidrolisam de 50 a 60% do substrato e as liqueficientes, que quebram cerca de 30 a 40% do substrato. São produzidas, principalmente, por bactérias do gênero *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Lactobacillus* e

por fungos como os *Aspergillus*;  $\beta$ -amilases (E.C.3.2.1.2 1,4- $\alpha$ -D-glucano maltohidrolase) - exoenzimas que hidrolisam a penúltima ligação  $\alpha$ -1,4 a partir da extremidade não redutora da molécula liberando maltose, não sendo capazes de hidrolisar ligações  $\alpha$ -1,6 dos substratos ramificados. São produzidas por algumas espécies de *Bacillus* e *Clostridium thermosulfurogenes* com características termotáveis; Glicoamilases (E.C.3.2.1.3 1,4- $\alpha$ -D-glucano glicohidrolase) - são exoamilases que produzem  $\beta$ -D-glicose a partir da extremidade não redutora da cadeia de amilose, e amilopectina e glicogênio através da hidrólise das ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4 removendo sucessivas unidades de glicose. As glicoamilases hidrolisam também ligações do tipo  $\alpha$ -1,6, mas com uma velocidade muito menor. Também chamadas de enzimas de sacarificação, são capazes de hidrolisar completamente amido em incubações por longos períodos; Pululanases (E.C.3.2.1.41 pullulan 6-glicohidrolase) - são enzimas desramificantes que quebram as ligações  $\alpha$ -1,6 do pululano, um polissacarídeo linear que consiste de maltotrioses unidas por ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,6 e que não pode ser degradado por  $\alpha$  ou  $\beta$ -amilase. O produto dessa hidrólise corresponde às maltotrioses. Dentro desta categoria, estão também as isopululanases (E.C.3.2.1.57 pululano-4-glicanohidrolase), que são enzimas que quebram também as ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4 do pululano, mas que não têm nenhuma atividade sobre o amido. O produto da ação desta enzima é a isopanose (Marchal et al., 1999).

Tabela 1 - Exemplos de enzimas da família  $\alpha$ -amilase que atuam em substratos contendo glicose

Enzima	Número EC	Substrato principal
Ciclodextrina glicosiltransferase	2.4.1.19	Amido
Amilomaltase	2.4.1.25	Amido, glicogênio
$\alpha$ -amilase	3.2.1.1	Amido
Oligo-1,6-glicosidase	3.2.1.10	Amilopectina
$\alpha$ -glicosidase	3.2.1.20	Amido
Amilopululanase	3.2.1.41	Pululano
Cyclomaltodextrinase	3.2.1.54	Ciclodextrina
Isopululanase	3.2.1.57	Pululano
Isoamilase	3.2.1.68	Amilopectina
Glucodextranase	3.2.1.70	Amido

Fonte: Marc et al., 2002.

### 2.4.1. Utilização de amilases pelas indústrias

A aplicação de enzimas microbianas em processos industriais é uma área que vem adquirindo crescente importância nos últimos anos. Cerca de 75% das enzimas industriais são hidrolíticas no seu modo de ação, sendo os setores de detergente (32%), de amido (15%), de laticínios (14%) e têxtil (10%) os principais. Os 29% restantes do mercado mundial abrangem os seguintes setores: álcool; alimentação animal; panificação; biotransformações; exames clínicos (análises); gorduras e óleos; aromatizantes; sucos e vinhos; couro; proteínas – outras que não sejam para a coagulação e detergentes; papel e celulose e tratamento de resíduos (Godfrey e West, 1996).

As amilases são amplamente distribuídas na natureza e, além de serem as responsáveis pela reciclagem do carbono contido nos amiláceos, em geral, exercem um importante papel na indústria de processamento de amido (Guzmán-Maldonado e Paredes-López, 1995).

Um dos processos que utilizam as amilases é o de conversão do amido em: dextrinas, que são utilizadas em formulações clínicas, como material para a sacarificação enzimática, estabilizadores etc.; maltose, usada em confeitarias,

refrigerantes, cervejaria, fermentações para produção de etanol, fabricação de geléias e sorvetes; glicose, usada em refrigerantes, na panificação, cervejarias e fermentações para produção de etanol; e frutose, usada em refrigerantes, geléias, iogurtes e frutas enlatadas (Glazer e Nikaido, 1995).

Na liquefação do amido, o amido é convertido em xarope de milho com alto teor de frutose, este processo requer uso da alta termoestabilidade da  $\alpha$ -amilase (Pandey et al., 2000a; Van der Maarel et al., 2002).

A necessidade de aumentar a produtividade, diversificar e melhorar a qualidade dos “hidrolisados de amido” tem impulsionado o desenvolvimento de processos catalisados por enzimas, que, na maioria das vezes, têm substituído o processo ácido utilizado na conversão do amido (Hebeda et al., 1988).

O ácido não é um catalisador específico para a hidrólise do amido, de modo que reações indesejáveis podem ocorrer resultando na formação de subprodutos difíceis de serem removidos do produto final, como compostos coloridos, além da diminuição do *flavor*. Por sua vez, a hidrólise enzimática é muito mais específica que a ácida, e a introdução de enzimas visando à substituição da conversão ácida, mesmo que parcialmente, tem colaborado muito para minimizar a formação de cor, produtos de degradação e perda de *flavor*, resultando em produtos de melhor qualidade e reduzindo custos de refino (Hebeda, 1987).

As enzimas que atuam de algum modo na produção de xaropes de amido são  $\alpha$ -amilase bacteriana, glicoamilase, beta-amilase, pululanase e isolamilase  $\alpha$ -amilase fúngica. A produção industrial de glicose tem início com a liquefação do amido, geralmente realizada em dois passos: um primeiro estágio de 5 a 15 minutos a 105-107 °C seguido de um segundo estágio de 60 a 80 minutos a 95-98 °C, em concentrações de amido de no máximo 38% e pH com valores entre 5,8 e 6,2. As  $\alpha$ -amilases termestáveis, derivadas geralmente de *Bacillus licheniformis* e *Bacillus stearothermophilus*, são adicionadas ao processo, gerando, ao final da liquefação, um hidrolisado claro, negativo ao teste com iodo e com valor DE aproximadamente de 10 a 18 (valor equivalente em dextrose, que se refere à porcentagem de açúcares redutores, calculado como glicose) (Brumm, 1998). O objetivo da liquefação é converter uma suspensão concentrada de amido granular purificado em uma solução de solúveis, ou seja, dextrinas com comprimentos de cadeias curtas (Crabb e Mitchinson, 1997).



Além da indústria de alimentos, segundo Glazer e Nikaido (1995), a indústria têxtil tem utilizado as amilases para a remoção da pasta de amido aplicada ao fio, com a finalidade de aumentar a resistência do mesmo à fricção durante o processamento. Essa pasta, quando não totalmente removida, dificulta o processamento final das roupas (tingimento, clareamento ou outro tipo de acabamento).

Na indústria de papel, o uso de  $\alpha$ -amilases dá-se para a modificação do amido utilizado para revestir o papel. Assim como para o material têxtil, o amido é utilizado como protetor do papel contra danos mecânicos durante o processamento, o que aumenta a qualidade final do papel. A viscosidade do amido natural é alta e é ajustada por degradação parcial do polímero por meio da  $\alpha$ -amilase em um processo contínuo. As condições do processo dependem de acordo com da fonte do amido e da  $\alpha$ -amilase utilizadas (Bruinenberg et al., 1996; Tolan, J.S., 1996).

Na indústria de detergentes, as  $\alpha$ -amilases têm sido utilizadas em detergentes em pó de lavanderias desde 1975. Cerca de 90% dos detergentes líquidos contêm  $\alpha$ -amilase. Elas são utilizadas em detergentes para remoção de manchas contendo amido, chocolate, comida de bebê, entre outras (Kottwitz et al., 1994). Uma moderna tendência entre consumidores é usar água fria para lavar roupas e louças. Nessas baixas temperaturas, a remoção do amido das roupas e porcelanas torna-se mais problemática. Detergentes contendo  $\alpha$ -amilase otimizam o trabalho em temperaturas moderadas e pH alcalino podendo ajudar a resolver esse problema (Marc et al., 2002). Os diferentes campos de aplicação de enzimas da família das  $\alpha$ -amilases (Marc et al., 2002) são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Setores de aplicação de enzimas da família das  $\alpha$ -amilases

Aplicações	Enzimas
Liquefação do amido	$\alpha$ -amilase
Sacarificação do amido	$\alpha$ -amilase, isoamilase, amiloglicosidase, pullulanase
Detergentes, redução de escurecimento dos sucos, fermentação	$\alpha$ -amilase
Produção de ciclodextrinas	Ciclodextrina glicosiltransferase
Cicloamilose	Amilomaltase, ciclodextrina

Fonte: Marc et al., 2002.

#### 2.4.2. $\alpha$ -amilase

As  $\alpha$ -amilases secretadas por bactérias são mais termestáveis que as de origem fúngica. Entre as bacterianas, aquelas secretadas pelo gênero *Bacillus* são as mais termestáveis, aumentando ainda mais a sua aplicabilidade industrial. As  $\alpha$ -amilases produzidas por várias espécies de *Bacillus* diferem entre si quanto à faixa ótima de pH, temperatura, estabilidade da enzima, além de outros fatores fisiológicos inerentes a cada espécie. Portanto, as enzimas de diferentes origens têm aplicabilidades específicas em diferentes setores (Chandra et al., 1980).

Campbell (1995) isolou e purificou  $\alpha$ -amilase produzida pelo *Bacillus coagulans*. Esta enzima mantém 90% da sua atividade após uma hora a 90 °C.

Hartman et al. (1995) verificaram que  $\alpha$ -amilase de *Bacillus stearothermophilus* permaneceu ativa após 12 horas a 90 °C. A enzima produzida por este microrganismo é mais termestável do que a secretada pelo *Bacillus subtilis*.

Madsen et al. (1973) e Chiang et al. (1979) isolaram de diferentes linhagens de *Bacillus licheniformis* uma  $\alpha$ -amilase termestável e ativa em solução de amido a temperaturas superiores a 100 °C, que recebeu a denominação comercial de Thermamyl e Taka Therm.

Na Tabela 3, estão relacionadas as propriedades gerais de amilases secretadas por algumas espécies de *Bacillus* (Fogarty e Kelly, 1979).

Tabela 3 - Propriedades gerais de amilases secretadas por algumas espécies de *Bacillus*

Microrganismos	pH ótimo de atividade	pH ótimo de estabilidade	Temperatura ótima (°C)
<i>B. subtili</i>	6,5	< 7,1	50
<i>B. stearothermophilus</i>	4,6 - 5,1	-----	55 – 70
<i>B. licheniformis</i>	9,0	6,0 - 11,0	76
<i>Bacillus</i> sp. US 100	5,6	4,5 - 8,0	82

Fonte: Manning e Campbell, 1961; Saito, 1973; Marco et al., 1996; Ali et al., 1999.

A indução e a repressão catabólicas são os dois fatores principais que controlam a síntese das amilases em microrganismos. Quando essas enzimas são sintetizadas na presença de carboidratos contendo ligações glicosídicas do tipo  $\alpha$ -1,4, são consideradas indutivas (Saito e Yamamoto, 1975). A síntese de  $\alpha$ -amilase também pode ser constitutiva; neste caso, o microrganismo é capaz de sintetizá-la quando a única fonte de carbono é a glicose (Pelczar et al., 1996). As diferenças observadas quanto ao caráter constitutivo ou indutivo das  $\alpha$ -amilases bacterianas estão relacionadas, em parte, à diversidade das linhagens empregadas, às diferenças existentes entre os variados meios de cultura e às distintas condições experimentais (Saito e Yamamoto, 1975).

As  $\alpha$ -amilases são parcialmente indutíveis para algumas espécies de *Bacillus*. Como o amido não pode penetrar na célula bacteriana, ele não está diretamente envolvido no processo de indução. Essas bactérias sintetizam constitutivamente a  $\alpha$ -amilase em níveis bem mais baixos, mas o suficiente para quebrar o substrato exógeno, resultando em produtos de baixo peso molecular. Estes compostos resultantes da hidrólise entram na célula e estimulam a maior produção de  $\alpha$ -amilase (Priest, 1977).

Várias  $\alpha$ -amilases têm sido cristalizadas e todas contêm um átomo grama de cálcio por molécula. A  $\alpha$ -amilase do *B. subtilis* é a única que contém zinco, além do cálcio (Stein et al., 1964).

O íon cálcio está ligado firmemente à molécula e tem papel importante na preservação da integridade da enzima, tornando-a estável e imune aos ataques de enzimas proteolíticas, além de atuar em sua atividade catalítica (Stein et al., 1964).

A disponibilidade de fontes de carbono e nitrogênio são fatores decisivos para ótima produção da enzima (Krishnan e Chandra, 1982). A máxima atividade da  $\alpha$ -amilase de *Bacillus* sp. TS-23 foi obtida em meio contendo peptona e amido como fonte de nitrogênio e carbono, respectivamente; os autores sugeriram que a peptona favorece o crescimento microbiano e a síntese enzimática (Lin et al., 1998).

As fontes de carbono como glicose e maltose têm sido utilizadas para a produção de  $\alpha$ -amilase. Entretanto, o uso de resíduos de amido é promissor. Um número de outros substratos não convencionais como lactose (Kelly et al., 1997), frutose (Welker e Campbell, 1963), óleo de sementes (Krishnan e Chandra, 1982) e amido processado tem sido utilizado para produção de  $\alpha$ -amilase como subprodutos agroindustriais (Losane e Ramesh, 1990).

## **2.5. Utilização de resíduos agroindustriais em processos biotecnológicos**

A cada ano, a preocupação em relação à utilização mais eficiente dos resíduos agroindustriais vem aumentando. Resíduos como o bagaço de cana-de-açúcar, casca e polpa de café e maçã, polpa de beterraba e resíduos do processamento de mandioca, entre outros, são gerados em grandes quantidades (Pandey et al., 2000b).

Entretanto, vários processos que utilizam esses resíduos como substratos estão sendo desenvolvidos para a produção de substâncias químicas e produtos de maior valor comercial, como o etanol, proteína de biomassa microbiana, cogumelos, enzimas, ácidos orgânicos, aminoácidos, metabólitos secundários biologicamente ativos, etc. (Pandey et al., 1988; Pandey, 1992; Pandey, 1994; Pandey et al., 2000).

O lançamento indevido de resíduos sólidos, líquidos e gasosos de diferentes fontes ocasiona modificações nas características do solo, da água e do ar, podendo poluir ou contaminar o meio ambiente. Atualmente, algumas indústrias brasileiras estão realizando programas internos para reciclagem de seus resíduos, pois a segregação do material, ainda na fonte geradora, diminui o volume total de resíduos, reduz os gastos operacionais e, em alguns casos, pode gerar uma nova receita para a indústria (ANA, 2006).

Na busca de soluções alternativas para o problema do descarte dos resíduos, muitas indústrias têm optado pelo uso de microrganismos como agentes redutores de matéria orgânica desses materiais ou para a eliminação ou redução de compostos tóxicos, sendo as enzimas termofílicas de grande aplicação nesses processos (Tavares et al., 1998; Andrade et al., 1999).

A aplicação de resíduos agroindustriais em bioprocessos, por um lado fornece substratos alternativos e, por outro, ajuda a solucionar os problemas de poluição que sua deposição no meio ambiente poderia causar. Com o advento de inovações biotecnológicas, principalmente na área de tecnologia de enzimas e fermentação, muitos caminhos novos têm sido abertos para sua utilização (Pandey et al., 2000).

O Brasil é o sexto produtor de leite do mundo e apresenta, para este importante produto, uma taxa anual de crescimento da produção leiteira em torno de 4%, representando um valor superior ao de todos os países que ocupam os primeiros lugares (IDF, 2001). De acordo com Viotto e Roig (1994), cerca de 35% da produção leiteira brasileira é destinada à fabricação de queijo e esta última apresenta uma taxa média significativa de crescimento – em contínua ascensão – de 4,6% ao ano, superior ao da própria produção leiteira.

O soro de leite é a fase aquosa, opaca e de coloração verde-amarelada, obtida durante a produção de queijo ou de caseína, resultante da coagulação do leite por ácido ou enzimas proteolíticas (Scott, 1989). Sua composição varia substancialmente dependendo da variedade de queijo ou caseína produzida (Zadow, 1994). O soro de leite contém quase a metade dos nutrientes originais do leite, sendo rico em componentes não caseicos do leite, tais como proteínas do soro, vitaminas hidrossolúveis, minerais e lactose, porém, não contém quantidades significativas de lipídios ou vitaminas lipossolúveis (Scott, 1989). O soro de leite contém 20% das proteínas encontradas no leite. Deste montante, as proteínas mais abundantes são a  $\beta$ -lactoglobulina (50%),  $\alpha$ -lactoalbumina (12%), imunoglobulinas (10%), albuminas (5%) e peptonas (0,23%) (Siso, 1996). O pior destino que se pode dar ao soro de leite é o seu descarte em lagoas e rios, pois trata-se de um dos dejetos industriais que promovem o desenvolvimento de biomassa dos depósitos naturais de água, causando o esgotamento de oxigênio dissolvido, com conseqüente desastre ecológico (FI South América, 2002).

O soro lácteo é, sobretudo, uma matéria-prima nobre e rica, da qual se pode ainda obter muito em termos quantitativos e qualitativos. Do soro rejeitado anualmente no Brasil (1.000.000 t), poderiam ser extraídas 70.000 t de materiais, correspondendo a 50.000 t de lactose e 7.500 t de proteínas. A utilização do soro na elaboração de produtos lácteos ou como substrato biotecnológico para produção de enzimas contribui para a redução do custo operacional da produção, bem como para a preservação do meio ambiente (Ferreira e Mosquim, 1998).

Um dos principais problemas associados à produção de queijo é a geração do subproduto denominado soro de queijo (soro de leite), que apresenta elevado poder poluente devido à presença de proteínas, gordura, lactose e sais minerais (Khamrui et al., 2001). Sua demanda biológica de oxigênio varia de 30.000 a 50.000 mg de oxigênio por litro de soro, valor aproximadamente 100 vezes maior ao do esgoto doméstico. Assim sendo, uma fábrica, com produção média de 10.000 litros de soro ao dia, provoca a mesma carga poluente de uma população de 5.000 habitantes (Knipschildt e Andersen, 1994). Portanto, o volume de soro produzido é elevado e seu tratamento é dispendioso. Por isso, para as empresas brasileiras, independentemente do seu porte, o descarte total do soro representa uma grave agressão ambiental ou, quando feito o seu tratamento adequado para posterior descarga do efluente tratado, implica um custo muito alto.

Em média, para a fabricação de um quilo de queijo, são necessários 10 litros de leite, levando à produção de 8 a 9 litros de soro. Considerando-se que a produção de queijo no Brasil está em torno de 450 mil toneladas/ano, esta quantidade corresponde a 4.050.000 toneladas de soro de leite. Descartar este volume de soro sem um tratamento eficiente não é só um crime ambiental previsto por lei, mas também significa rejeitar um alimento de alto valor nutricional. As proteínas do soro de leite possuem um dos mais altos índices de valor biológico em comparação com outras fontes de proteínas. Desse modo, é urgente a viabilização de unidades industriais destinadas à produção de produtos ricos em proteínas de soro, aliviando consideravelmente o custo do tratamento (Santos e Ferreira, 2001; Richards, 1997).

A produção de enzimas microbianas utilizando soro de leite foi realizada por diversos pesquisadores (Kosikowski, 1979; Feijoo et al., 1999; Romero et al., 2001), e a produtividade enzimática aumentou com o uso deste substrato.

O milho ocupa posição estratégica na agropecuária e na economia brasileiras, sendo o Brasil o terceiro maior produtor mundial desse grão, com produção inferior somente à dos Estados Unidos e à da China (Abimilho, 2006).

O processo industrial de moagem úmida é o segundo maior setor de consumo do grão após a alimentação animal, utilizando 12% do total produzido (Abimilho, 2006). Este envolve transformações químicas, bioquímicas e operações mecânicas, com o objetivo de separar o grão do milho em suas frações relativamente puras: germe, fibra, amido e glúten (Singh et al., 1997).

Os produtos primários de moagem úmida são amidos alimentícios e industriais, os quais podem ser convertidos em xaropes e etanol. Os co-produtos incluem o óleo de milho e os produtos destinados à produção de rações animais, tais como o glúten de milho, farelo do glúten de milho, farelo do germe de milho, fibras e água de maceração, sendo os últimos sólidos solúveis removidos durante a maceração e concentrados por evaporação. A água de maceração de milho, usualmente vendida na base de 50% de sólidos, é rica em vitaminas, especialmente do complexo B. Além de ser usada em rações, a água de maceração de milho também é aplicada na produção de antibióticos, produtos farmacêuticos e fermentos (Abimilho, 2006).

A água de maceração do milho, resultante do processamento dos grãos de milho, é um subproduto rico em carboidratos, aminoácidos, peptídeos, minerais, metais, vitaminas e fosfato (Kona et al., 2001). Burkert et al. (2004) e Lee et al. (2001) sugerem a utilização da água de maceração de milho para a redução do custo do meio de cultura empregado para o crescimento e produção de enzimas por microrganismos.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Microrganismo**

O microrganismo utilizado neste estudo foi uma bactéria termofílica, *Bacillus* sp. SMIA-2, isolada por Nunes e Martins (2001) no Laboratório de Tecnologia de Alimentos do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, na Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, a partir de amostras de solo do município de Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil.

#### **3.2. Manutenção do microrganismo**

O microrganismo foi mantido em tubos de ensaio contendo meio TSY (triptona 20 g/L; NaCl 10 g/L; extrato de levedura 10 g/L; ágar 20 g/L e água 1 L), sob temperatura de refrigeração (7 °C).



### 3.3. Meio de crescimento

Os meios de cultura utilizados para o crescimento do microrganismo tinham a seguinte composição (g/L):

Meio 1: soro de leite (70% de proteína, 3% de umidade, 15% de lactose, 2% de gordura e 10% de sais minerais) 1,0; peptona 1,0; KCl 0,3; MgSO<sub>4</sub> 0,5; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2,0; CaCl<sub>2</sub> 0,5; ZnO-2.03x10<sup>-3</sup>; FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O-2.7x10<sup>-2</sup>; MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O-1.0x 10<sup>-2</sup>; CuCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O-8.5x10<sup>-5</sup>; CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O-2.4x10<sup>-3</sup>; NiCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O-2.5x10<sup>-4</sup> e H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>-3.0x10<sup>-4</sup>.

Meio 2: soro de leite (4% de cálcio, 1,7% de sódio, 6,3% de potássio, 5,42% de gorduras totais, 81% de proteínas e 1,58% de umidade) 1,0; peptona 1,0; KCl 0,3; MgSO<sub>4</sub> 0,5; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2,0; CaCl<sub>2</sub> 0,5; ZnO-2.03x10<sup>-3</sup>; FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O-2.7x10<sup>-2</sup>; MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O-1.0x10<sup>-2</sup>; CuCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O-8.5x10<sup>-5</sup>; CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O-2.4x10<sup>-3</sup>; NiCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O-2.5x10<sup>-4</sup> e H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>-3.0x10<sup>-4</sup>.

O soro de leite do meio 2 não continha lactose em sua composição para que se pudesse avaliar a influência da adição deste composto ao meio em diferentes concentrações.

Os meios foram preparados utilizando água destilada e esterilizados em autoclave a 121 °C por 15 minutos. O soro de leite foi esterilizado separadamente e adicionado asépticamente ao meio de cultura.

O pH final do meio foi ajustado para 7,2 com NaOH 2M, antes da esterilização.

### 3.4. Preparo do inóculo

O inóculo foi preparado germinando-se o microrganismo em placas de Petri contendo o meio TSY (triptona 20 gL<sup>-1</sup>, NaCl 10 gL<sup>-1</sup>, extrato de levedura 10 gL<sup>-1</sup>, ágar 20 gL<sup>-1</sup> e água 1 L) descrito por Liao et al. (1986). As placas foram incubadas em uma estufa QUIMIS modelo Q 315 D26 a 50 °C. Após 18 horas de incubação, as células foram transferidas para outras placas contendo meio TSY

com 1% de amido e incubadas por mais 18 horas em uma estufa QUIMIS modelo Q 315 D26 a 50 °C. Após este tempo de incubação, 5 ml do meio de crescimento foram pipetados para dentro das placas e as células sugadas junto com este meio, usando uma pipeta estéril. Estas células foram inoculadas em frascos erlenmeyers de 250 ml contendo 50 ml do meio de crescimento e estes incubados por mais 18 horas a 50 °C em “shaker” rotatório (Thermo Forma Orbital Shaker, Ohio, EUA) operando a 180 rpm. Este meio, denominado pré-inóculo, foi utilizado para inocular o meio de crescimento (volume suficiente para que a absorbância inicial, ou seja, o valor de D.O. 600 nm do meio inoculado menos o valor de D.O. 600 nm do meio sem inóculo, fosse igual a 0,1).

### **3.5. Crescimento do microrganismo**

O microrganismo foi cultivado nos meios descritos anteriormente em incubadora horizontal TECNAL TE 420 a 180 rpm e à temperatura de 50 °C. Todos os experimentos foram realizados em triplicata, sendo cada amostra constituída de 50 ml de meio de cultura, em erlenmeyer de 250 ml. A intervalos de tempo determinados, foram retirados frascos para medida da densidade ótica a 600 nm, utilizando um espectrofotômetro Hitachi modelo U-2000, e a dosagem da atividade da  $\alpha$ -amilase nos filtrados da cultura.

### **3.6. Determinação do pH**

As variações dos valores de pH, durante o crescimento celular, foram determinadas utilizando o pHmetro da marca WTW pH330.

### **3.7. Determinação da atividade da $\alpha$ -amilase**

Amostras em triplicata (10 ml) foram centrifugadas em centrífuga CENTRIFUGE 5415 C, a 4.500 rpm, a 5 °C por 15 minutos. A atividade da  $\alpha$ -amilase foi dosada no sobrenadante (extrato livre de células) de acordo com o método descrito por Cordeiro e Martins (2002).

Uma mistura contendo 0,3 ml do sobrenadante, 0,5 ml de solução de amido 1,0% em tampão fosfato 0,05 M e pH 7,0 e mais 0,2 ml do tampão fosfato 0,05 M e pH 7,0 foi incubada a 70 °C por 10 minutos. Após o tempo de incubação, a reação foi paralisada pela adição de 1,0 ml de uma solução de ácido 3,5-dinitrossalicílico 0,5% (DNS). A mistura foi rapidamente resfriada e colocada em água em ebulição por 10 minutos e, em seguida, resfriada em banho de gelo. A coloração desenvolvida foi medida através de espectrofotômetro HITACHI – modelo U 2000 utilizando comprimento de onda de 540 nm. O mesmo procedimento foi realizado com o controle, sendo, entretanto, o reagente de Miller (DNS) adicionado juntamente com o sobrenadante à solução de amido 1,0%, e esta mistura foi colocada em água em ebulição, como descrito anteriormente.

O teor de açúcares redutores foi determinado por meio de uma curva padrão de glicose nas concentrações de 0, 30, 50, 70, 100, 120, 150, 200, 250, e 300  $\mu\text{mol/ml}$ . Uma unidade de  $\alpha$ -amilase foi definida como a quantidade necessária para produzir 1  $\mu\text{mol}$  de açúcar redutor por minuto a partir do amido solúvel nas condições do ensaio.

### **3.8. Efeito da adição da água de maceração de milho ao meio de cultura sobre o crescimento do microrganismo e a atividade da $\alpha$ -amilase**

Para estudar a influência da água de maceração de milho sobre a secreção da  $\alpha$ -amilase, o microrganismo foi cultivado no Meio 1 descrito anteriormente, acrescido deste resíduo em várias concentrações (0,05%; 0,1%; 0,2%; 0,3%; 0,4% e 0,5%). A cultura foi incubada a 50 °C em “shaker” rotatório (Thermo Forma Orbital Shaker, Ohio, EUA) operando a 180 rpm, e, a intervalos de tempo definidos, foram retirados frascos para medida do crescimento e atividade da  $\alpha$ -amilase, conforme o método descrito anteriormente.

### **3.9. Efeito da adição da lactose ao meio de cultura sobre o crescimento do microrganismo e a atividade da $\alpha$ -amilase**

Várias concentrações de lactose (0%, 0,1%, 0,2% e 0,5%) foram adicionadas individualmente ao meio de crescimento (Meio 2) para avaliar o seu

efeito sobre a secreção da enzima. Após o cultivo do microrganismo nestes meios por 24 horas a 50 °C em “shaker” rotatório (Thermo Forma Orbital Shaker, Ohio, EUA) operando a 180 rpm, foram medidos o crescimento e a atividade da enzima.

### **3.10. Efeito da adição de diferentes concentrações do soro de leite sobre o crescimento do microrganismo e a atividade da $\alpha$ -amilase**

Diferentes concentrações do soro de leite (0,025%; 0,05%; 0,1% e 0,15%) foram adicionadas ao meio de crescimento (Meio 2) a fim de estudar o seu efeito sobre a secreção da enzima e o crescimento do microrganismo. As culturas foram incubadas por 24 horas a 50 °C em “shaker” rotatório (Thermo Forma Orbital Shaker, Ohio, EUA) operando a 180 rpm e, após este período, a densidade ótica e a atividade da  $\alpha$ -amilase foram determinadas, como descritas anteriormente.

### **3.11. Caracterização da $\alpha$ -amilase bruta**

#### **3.11.1. Efeito do pH na atividade e estabilidade da enzima**

O efeito do pH na atividade de  $\alpha$ -amilase foi avaliado na faixa de pH 6,0 a 10,0 com intervalo de 0,5 unidade. O substrato foi preparado numa mistura tamponante contendo acetato de sódio (pH 5,0-5,5), fosfato (pH 6,0-8,0) e tris/HCl (pH 8,5-10,0) na concentração final de 50 mM. Os valores de pH da mistura de reação foram ajustados com NaOH ou HCl 1N.

O pH ótimo foi determinado pela incubação de 0,3 ml do sobrenadante e 0,8 ml de tampões (6,0 a 10,0) contendo 0,5% de amido solúvel. Depois da incubação a 70 °C por 10 minutos, foi analisada a atividade enzimática, conforme descrita no item 3.6.

A estabilidade da enzima a diferentes valores de pH (6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0; 8,5; 9,0; 9,5; 10,0) foi também determinada pela incubação da enzima em vários valores de pH por 2h em temperatura ambiente e, então, estimada a atividade residual conforme descrito no item 3.6.

### **3.11.2. Efeito da temperatura na atividade e estabilidade da $\alpha$ -amilase**

A mistura de reação foi incubada em banho-maria, em temperaturas que variaram de 40 a 100 °C, com intervalos de 10 °C. Após 10 minutos de incubação nestas temperaturas, a atividade enzimática foi determinada, conforme descrita no item 3.6.

A estabilidade térmica foi avaliada pela incubação da mistura de reação em temperaturas que variaram de 40 a 100 °C (tubo de ensaio com tampa rosqueada), com intervalos de 10 °C por 1h. A intervalos de tempo determinados, as amostras foram transferidas para o banho-maria a 90 °C por 10 minutos, e a atividade residual da enzima foi determinada.

### **3.11.3. Efeito de íons metálicos na atividade da $\alpha$ -amilase**

O efeito de íons sobre a atividade de  $\alpha$ -amilase foi determinado pela incubação da mistura de reação, na presença dos seguintes íons, nas concentrações de 5 mM e 10 mM: cloretos de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cs}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Na}^{2+}$ ,  $\text{Li}^{+}$ ,  $\text{K}^{+}$ . Uma amostra controle (ausência de metais) foi considerada como 100% da atividade.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Perfil do crescimento de *Bacillus* sp. no meio contendo soro de leite

O crescimento do *Bacillus* sp. SMIA-2 e a atividade da  $\alpha$ -amilase em função do tempo de fermentação foram observados por 56 horas em meio líquido contendo 0,1% de soro de leite (Meio 1). De acordo com os resultados apresentados na Figura 1, o crescimento foi iniciado imediatamente após a incubação do meio de cultura. Entretanto, a secreção da  $\alpha$ -amilase foi iniciada posteriormente ao crescimento, indicando que, para a secreção da mesma, há necessidade de uma massa mínima de células.

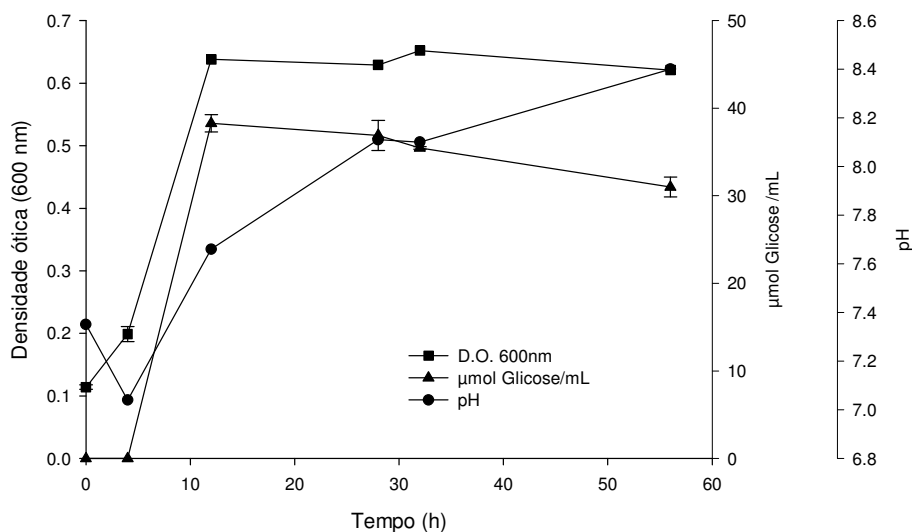


Figura 1 - Crescimento (■), atividade de  $\alpha$ -amilase (▲) e pH (●) em função do período de crescimento de *Bacillus* sp. SMIA-2 em meio de cultura contendo soro de leite (Meio 1).

O crescimento exponencial do microrganismo foi observado por um período de tempo relativamente curto, iniciando após 4 horas de crescimento e finalizando após 12 horas. A partir deste tempo, a cultura entrou na fase estacionária.

A produção enzimática aumentou ao final da fase exponencial e início da fase estacionária de crescimento. A atividade máxima da  $\alpha$ -amilase foi alcançada após 12 horas de incubação do microrganismo, com níveis de 38  $\mu\text{mol}$  glicose/ml, quando o crescimento já havia sido cessado e a cultura se encontrava na fase estacionária. Durante esta fase, quando a cultura já havia alcançado a máxima produtividade enzimática, a atividade da  $\alpha$ -amilase foi reduzida, o que sugere que a produção da enzima está associada ao crescimento e que a mesma foi produzida quando a cultura estava metabolicamente ativa.

De acordo com vários autores, a síntese de  $\alpha$ -amilase por microrganismos do gênero *Bacillus*, de modo geral, ocorre de duas maneiras, dependendo das condições do experimento e do microrganismo utilizado. Na primeira, a formação da enzima é lenta durante a fase logarítmica de crescimento, seguida de um aumento da velocidade de síntese na medida em que a velocidade de crescimento diminui e atinge a fase estacionária (Mahon et al., 1997; Egas et

al., 1998; Bajpai e Bajpai, 1998; Legin et al., 1998). Na segunda maneira, a síntese da enzima acompanha o crescimento microbiano e diminui sua velocidade à medida que a cultura entra na fase estacionária (Welker e Campbell, 1964; Cork et al., 1980; Baig et al., 1984; Emanuilova e Toda, 1984; Cheng et al., 1989; Stephenson et al., 1998). Este comportamento foi similar ao encontrado para a  $\alpha$ -amilase de *Bacillus* sp. SMIA-2.

Em relação à variação do pH do meio em função do tempo de fermentação, foi observado um decréscimo dos valores no início do crescimento microbiano e, posteriormente, com o início da produção enzimática, os valores aumentaram novamente. De acordo com Ming Chu (1992), durante o crescimento da cultura, a acidificação ou alcalinização do meio reflete o consumo de substrato. Quando íons amônio estão sendo utilizados, o meio torna-se mais ácido e, quando nitrogênio orgânico (aminoácidos e peptídeos) está sendo assimilado, o meio torna-se mais alcalino. Devido a essa relação entre a síntese de  $\alpha$ -amilase e a utilização de compostos nitrogenados, a variação do pH é utilizada para fornecer informações importantes sobre a produção de  $\alpha$ -amilase, como o início e o final de sua síntese (Nascimento, 2005).

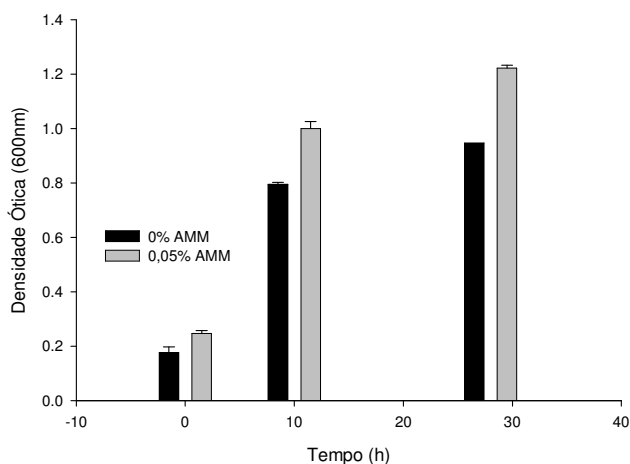
#### **4.2. Efeito da suplementação do meio de cultura com a água de maceração de milho**

A adição da água de maceração de milho (0,05%) ao meio de cultura contendo o soro de leite (Meio 1) proporcionou um aumento dos valores da densidade ótica da cultura (Figura 2a). Segundo Kumar e Takagi (1999), a água de maceração de milho é considerada uma fonte de nitrogênio, vários micronutrientes, vitaminas e fatores estimulantes do crescimento microbiano.

Em relação à secreção da  $\alpha$ -amilase pelo microrganismo, foi observado que a atividade desta enzima também aumentou quando o meio foi suplementado com a água de maceração de milho (Figura 2b). Este aumento foi mais acentuado quando a atividade foi determinada após 24 horas de crescimento do microrganismo.



(a)



(b)

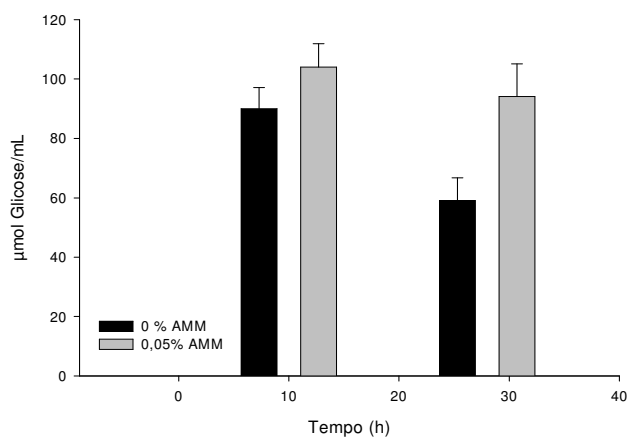


Figura 2 - Crescimento de *Bacillus* sp. SMIA-2 (a) e atividade de  $\alpha$ -amilase (b) em meio de cultura contendo soro de leite (Meio 1) e suplementado ou não com a água de maceração de milho.

Vários autores (Kona et al., 2001; Liu et al., 2002; Lee et al., 2003; Burkert et al., 2004) sugerem a utilização da água de maceração de milho (Corn steep liquor), que é um subproduto rico em carboidratos, aminoácidos, peptídeos, minerais, metais, vitaminas e fosfato, para a redução do custo do meio de cultura utilizado para o crescimento dos microrganismos.

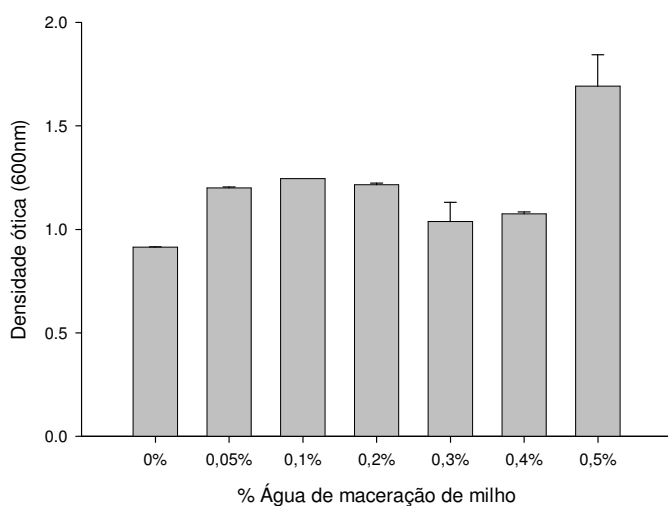
Portanto, a água de maceração de milho, além de beneficiar o meio de crescimento pelo fornecimento de uma fonte de nutrientes relativamente baratos, pode ser utilizada para a produção de amilases. Desta maneira, em todos os

experimentos que se seguiram, a água de maceração de milho foi adicionada ao meio de cultura.

A água de maceração de milho foi utilizada no meio de cultura como fonte de nitrogênio para a secreção de amilase por *Bacillus* sp. IMD 435 (Hamilton, 1999). Foram utilizadas outras fontes de nitrogênio, como extrato de levedura e bactopectona; a fonte de nitrogênio mais eficiente para a produção de amilase foi o extrato de levedura, que rendeu 12 units/ml; enquanto que, com água de maceração de milho como fonte de nitrogênio, a produção foi de 10 units/ml.

Foi investigado o efeito da concentração inicial da água de maceração de milho, no meio de cultura, sobre o crescimento do microrganismo e a atividade da  $\alpha$ -amilase. De acordo com os resultados apresentados na Figura 3, a adição de água de maceração de milho em concentrações de até 0,4% não proporcionou aumento dos valores da densidade ótica da cultura. Apenas quando este resíduo foi utilizado na concentração de 0,5%, é que se observou um aumento do crescimento do microrganismo (Figura 3a). Por outro lado, a atividade da  $\alpha$ -amilase não aumentou quando a concentração da água de maceração de milho no meio de cultura foi aumentada.

(a)



(b)

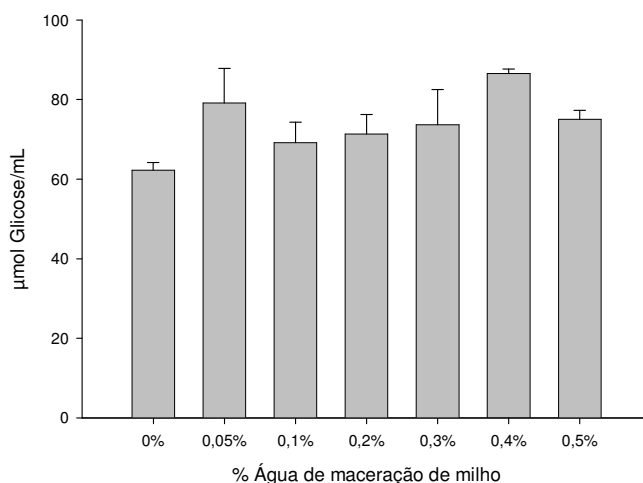


Figura 3 - Crescimento de *Bacillus* sp. SMIA-2 (a) e atividade de  $\alpha$ -amilase (b) em meio de cultura contendo soro de leite (Meio 1) e suplementado com diferentes concentrações de água de maceração de milho, com 24 horas de crescimento.

De acordo com alguns autores, a água de maceração de milho favorece uma máxima produção de  $\alpha$ -amilase por bactérias (Krishnan e Chandra, 1982; Emanuilova e Toda, 1984).

Segundo Priest (1977), um meio de cultura de composição pobre pode reduzir o crescimento microbiano e, conseqüentemente, as diferenças de velocidade de síntese da  $\alpha$ -amilase nas diversas fases de crescimento. Salva (1990) ressalta que nutrientes como o extrato de levedura e a peptona, dependendo da concentração em que são utilizados no meio, não afetam a síntese de  $\alpha$ -amilase por *Bacillus subtilis* ATCC 601B, mas apenas o crescimento celular. Afetando o crescimento celular, no entanto, esse componente do meio de cultura afetou a quantidade total da enzima produzida. No caso da influência da água de maceração de milho, que tem um papel similar ao do extrato de levedura no meio de cultura, pode-se sugerir que a adição da mesma ao meio é importante para o desenvolvimento do microrganismo e para a produção da enzima. No entanto, a concentração na qual este composto é adicionado ao meio é

igualmente importante, uma vez que quantidades maiores que 0,05% deste resíduo não proporcionam aumentos na atividade da  $\alpha$ -amilase.

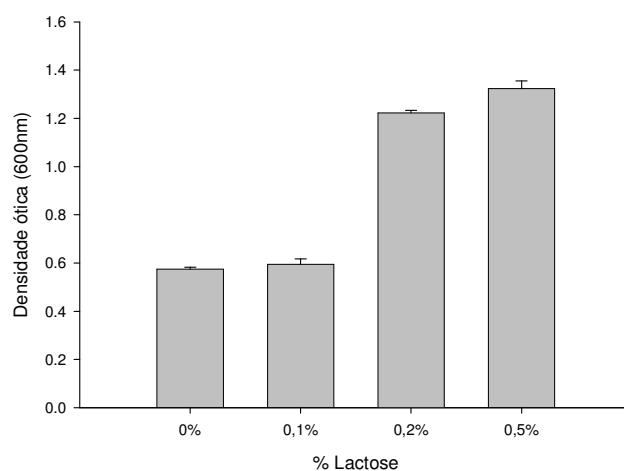
#### **4.3. Efeito da lactose sobre o crescimento e atividade de $\alpha$ -amilase de *Bacillus* sp. SMIA-2**

Para estudar o efeito da lactose sobre a secreção da  $\alpha$ -amilase, *Bacillus* sp. SMIA-2 foi cultivado no Meio 2, cuja composição do soro de leite não continha lactose. Então, diferentes concentrações desta fonte de carbono foram adicionadas ao meio individualmente e, após a incubação por 24 horas a 50 °C, o crescimento e atividade da enzima foram determinados. Os resultados deste experimento são mostrados na Figura 4.

Quando o microrganismo foi cultivado no meio contendo o soro de leite sem a presença da lactose, observou-se um baixo crescimento do mesmo. Resultados similares foram encontrados para a atividade da  $\alpha$ -amilase em que a mesma foi detectada em baixos níveis.

A adição de lactose ao meio de cultura aumentou a densidade ótica da cultura, sugerindo que a mesma foi importante para o crescimento do microrganismo. À medida que se aumentou a concentração desta fonte de carbono, a densidade ótica da cultura também aumentou. Em relação à secreção da enzima, foi observado que, quando a lactose foi adicionada ao meio em concentrações de até 0,2%, houve um aumento da atividade da  $\alpha$ -amilase. Concentrações maiores que 0,2% inibiram a atividade da enzima. Portanto, conclui-se que, muito embora se tenha no meio de cultura uma maior concentração celular, quando maiores concentrações da lactose são utilizadas, se tem uma menor concentração enzimática. Esta inibição da síntese de  $\alpha$ -amilase provavelmente é causada pela própria lactose remanescente no meio de cultura. Em *Bacillus licheniformis*, ocorreu uma diminuição da síntese da  $\alpha$ -amilase com o aumento da concentração inicial de lactose no meio de cultura, na faixa de 1,0 a 5,0 g/L (Chandra et al., 1980). Portanto, *Bacillus* sp. SMIA-2 parece ser menos sensível ao efeito repressor da lactose sobre a síntese da  $\alpha$ -amilase do que a linhagem de *Bacillus licheniformis*, estudada por Chandra et al. (1980).

(a)



(b)

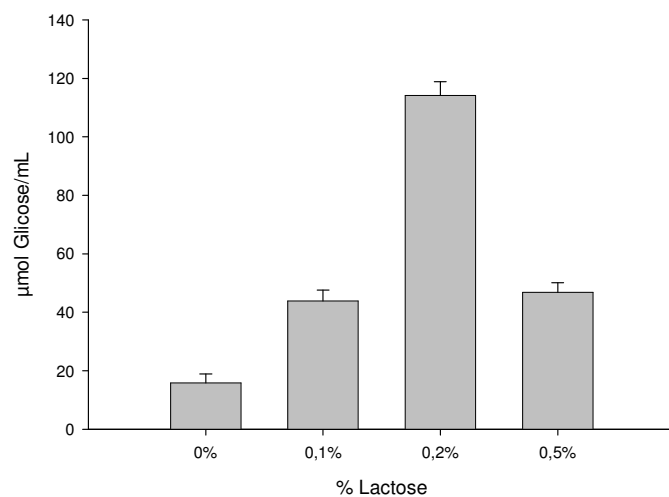


Figura 4 - Crescimento de *Bacillus* sp. SMIA-2 (a) e atividade de  $\alpha$ -amilase (b) em meio de cultura contendo soro de leite (Meio 2) e lactose em diferentes concentrações, após a incubação por 24 horas a 50 °C.

De acordo com Kelly et al. (1997), a lactose também foi selecionada como uma das melhores fontes de carbono para a produção de  $\alpha$ -amilase por *Bacillus flavothermus*, quando comparada com o amido solúvel, maltose, frutose, glicose e sacarose.

Segundo Bajpai e Bajpai (1989), a utilização de fontes de carbono, como glicose, frutose e sacarose, promove um melhor crescimento do microrganismo com concomitante redução na produção de  $\alpha$ -amilase; por outro lado, fontes de carbono, como glicogênio, lactose, galactose, rafinose e xilose, são pobremente utilizadas como fonte de energia para o crescimento, porém, maiores quantidades da enzima são sintetizadas.

No estudo realizado por Lynn et al. (1999), a máxima produção de  $\alpha$ -amilase por *Bacillus* sp. IMD 435 foi proporcionada pela concentração de 4% de lactose (26 units/ml).

De acordo com Roychoudhury et al. (1989), a lactose foi a melhor fonte de carbono utilizada para a produção de  $\alpha$ -amilase por *Bacillus amiloliquefaciens*.

#### **4.4. Influência da concentração do soro de leite no meio de cultura sobre o crescimento e a atividade da $\alpha$ -amilase**

O aumento da concentração do soro de leite, no meio de cultura de 0,025% a 0,15%, não influenciou o crescimento de *Bacillus* sp. SMIA-2, embora tenha sido observado um ligeiro decréscimo da densidade ótica na concentração de 0,15% (Figura 5). Por outro lado, à medida que a concentração deste resíduo foi aumentada no meio de cultura, a atividade da  $\alpha$ -amilase também aumentou.

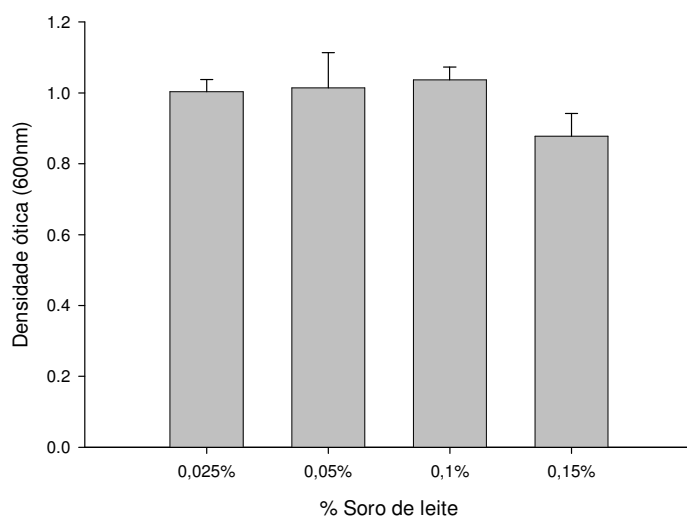
A adição do soro de leite na concentração de 0,1% promoveu um aumento na densidade ótica, mostrando que esta foi a melhor concentração para o crescimento do microrganismo.

O soro de leite contém quase a metade dos nutrientes originais do leite, sendo rico em componentes não caseicos do leite, tais como proteínas do soro, vitaminas hidrossolúveis, minerais e lactose, porém, não contém quantidades significativas de lipídios ou vitaminas lipossolúveis (Scott, 1989).

A utilização do soro na elaboração de produtos lácteos ou como substrato biotecnológico para produção de enzimas contribui para a redução do custo operacional da produção bem como para a preservação do meio ambiente (Ferreira e Mosquim, 1998).

A produção de enzimas microbianas utilizando soro de leite foi realizada por diversos pesquisadores (Kosikowski, 1979; Feijoo et al., 1999; Romero et al., 2001), e a produtividade enzimática aumentou com o uso deste substrato.

(a)



(b)

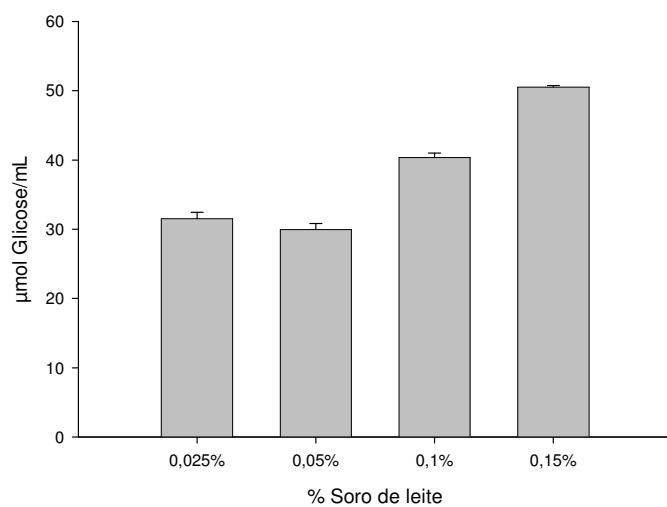


Figura 5 - Crescimento de *Bacillus sp. SMIA-2* (a) e atividade de  $\alpha$ -amilase (b) em meio de cultura contendo lactose (0,2%) e soro de leite (Meio 2), em diferentes concentrações.

De acordo com os resultados demonstrados na Figura 5, houve uma maior atividade da  $\alpha$ -amilase no meio contendo 0,15% de soro de leite.

#### 4.5. Perfil do crescimento de *Bacillus* sp. SMIA-2 e atividade de $\alpha$ -amilase em condições otimizadas do meio de cultura

A Figura 6 mostra as curvas de crescimento e de atividade da  $\alpha$ -amilase em função do tempo de fermentação. A atividade máxima da enzima foi alcançada quando a densidade ótica da cultura já havia se estabilizado.

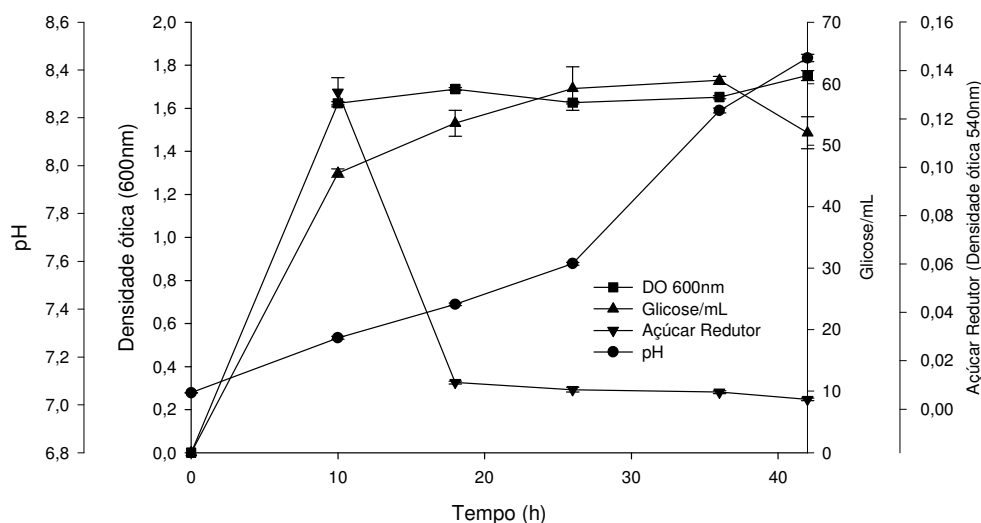


Figura 6 - Crescimento (■), atividade de  $\alpha$ -amilase (▲), açúcar redutor (▼) e pH (●) em função do período de crescimento de *Bacillus* sp. SMIA-2 em meio de cultura contendo soro de leite (0,1% - Meio 2), água de maceração de milho (0,05%) e lactose (0,2%).

A introdução no meio de cultura da água de maceração de milho (0,05%) e de lactose (0,2%) proporcionou um aumento do crescimento do microrganismo e da atividade da  $\alpha$ -amilase. Entretanto, a secreção da enzima ocorreu mais tardiamente comparada a do meio inicial utilizado neste trabalho. Estes resultados são similares aos encontrados para o *Bacillus subtilis* ATCC 601B (Salva, 1994) em que a produção de  $\alpha$ -amilase tem início na fase exponencial de crescimento, com um grande aumento da velocidade de síntese na fase estacionária. Segundo estes mesmos autores, a maior velocidade da síntese enzimática ocorre ao mesmo tempo em que ocorre a esporulação deste microrganismo, sugerindo que



a esporulação e a síntese de  $\alpha$ -amilase são fenômenos interdependentes, de modo que a esporulação fosse imprescindível para a síntese da enzima ou vice-versa. Entretanto, Dancer e Mandelstam (1975) e Shaeffer (1977) relataram que, em *Bacillus subtilis*, a produção de  $\alpha$ -amilase ocorreu mesmo em condições onde não ocorria a esporulação. Concluíram então que, embora se dêem ao mesmo tempo, a esporulação e a síntese de  $\alpha$ -amilase são fenômenos independentes que se manifestam como conseqüência de mudanças nas funções vegetativas da célula, decorrentes de alterações no meio de cultura ao final da fase exponencial.

#### **4.6. Características da $\alpha$ -amilase bruta**

##### **4.6.1. Efeito da temperatura sobre a atividade da $\alpha$ -amilase e estabilidade térmica da enzima**

A  $\alpha$ -amilase mostrou uma atividade crescente entre 50 °C e 90 °C em que a atividade atingiu o seu valor máximo. Acima de 90 °C, ocorreu uma redução drástica da atividade da enzima, sendo que, a 100 °C, a  $\alpha$ -amilase perdeu em torno de 46% de sua atividade (Figura 7).

A temperatura ótima de 90 °C, encontrada para a  $\alpha$ -amilase de *Bacillus* sp. SMIA-2, foi superior à de outras  $\alpha$ -amilases de *Bacillus* sp., cuja temperatura ótima para a produção da  $\alpha$ -amilase foi de 70 °C (Kelly e Forgart, 1997; Sidhu et al., 1997; Lin et al., 1998; Konsula Z. e Liakopoulou-Kyriakides M., 2004).

Resultados semelhantes aos encontrados neste trabalho foram relatados por Uguru et al. (1996) para a  $\alpha$ -amilase produzida por *Thermoactinomyces thalophilus* em que a temperatura ótima para a atividade desta enzima foi de 90 °C.

Em relação à estabilidade térmica da  $\alpha$ -amilase, foi observado que essa enzima mostrou-se mais estável a 80 °C, mantendo 95% da sua atividade. Entretanto, a 90 °C, a enzima perdeu 75% de sua atividade.

Segundo Krishnam e Chandra (1982), a  $\alpha$ -amilase é mais estável em temperaturas entre 60-90 °C. As  $\alpha$ -amilases secretadas por bactérias são mais termestáveis que as de origem fúngica. Entre as bacterianas, aquelas secretadas

pelo gênero *Bacillus* são as mais termestáveis, aumentando ainda mais a sua aplicabilidade industrial (Chandra et al., 1980).

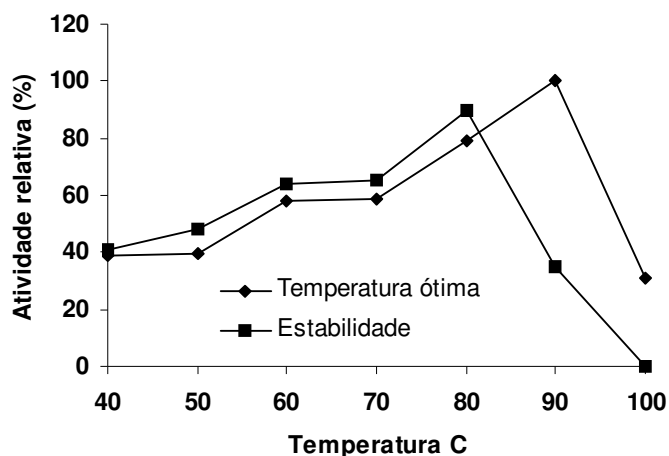


Figura 7 - Efeito da temperatura na estabilidade (■) e na atividade de  $\alpha$ -amilase (▼) de *Bacillus* sp. SMIA-2, em meio de cultura contendo 0,1% de soro de leite (Meio 1), 0,05% de água de maceração de milho e 0,2% de lactose, cultivado por 24h a 50 °C. 100% de atividade = 49,81  $\mu$ mol glicose/ml.

#### 4.6.2. Efeito do pH na atividade e estabilidade da $\alpha$ -amilase

O perfil da atividade da  $\alpha$ -amilase secretada por *Bacillus* sp. SMIA-2 com o pH do meio de hidrólise é mostrado na Figura 8. O pH ótimo da enzima foi 8,5. Uma redução da atividade da ordem de 45% foi observada para valores de pH iguais a 9,0 e 9,5.

Resultados semelhantes foram encontrados por Saito (1973) para  $\alpha$ -amilase de *Bacillus licheniformis*, e por Shinke et al. (1996) para amilases de *Bacillus* sp.. Segundo estes autores, o pH ótimo para a atividade da  $\alpha$ -amilase foi 8,0.

Kang et al. (1997) reportaram que a  $\alpha$ -amilase produzida por *Bacillus stearothermophilus* apresentou atividade máxima no pH 7-8.

Para avaliar a estabilidade da  $\alpha$ -amilase ao pH, o extrato enzimático sem o substrato foi incubado em soluções tampão a diversos valores de pH (6,0 – 10,0). Em seguida, a atividade enzimática foi determinada usando-se o substrato preparado no pH ótimo e à temperatura de 90 °C.

A estabilidade da  $\alpha$ -amilase aumentou à medida que os valores do pH também aumentaram, sendo que, em pH 8,5, a enzima manteve 65% de sua atividade após 2 horas de incubação. Já em pH 10, cerca de 76% da atividade enzimática foi perdida (Figura 8).

Segundo Mamo e Gessesse (1999), a  $\alpha$ -amilase de um *Bacillus* termofílico foi estável na faixa de pH 5,5-9,0, com valores de aproximadamente 100% de atividade. De acordo com resultados encontrados por Burhan et al. (2003), a amilase de *Bacillus* sp. é mais estável a pH 9,0, mantendo cerca de 58% da atividade.

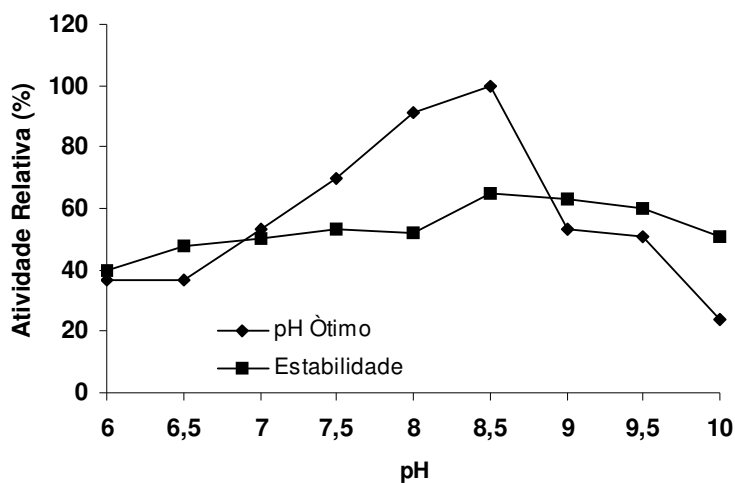


Figura 8 - Efeito do pH na estabilidade (■) e na atividade de  $\alpha$ -amilase (▼) de *Bacillus* sp. SMIA-2, em meio de cultura contendo soro de leite (Meio 2), suplementado com traços de metais, água de maceração de milho (0,05%) e lactose (0,2%). 100 % de atividade = 77,47  $\mu$ mol glicose/ml.

#### 4.6.3. Efeito dos íons metálicos na atividade da $\alpha$ -amilase

O efeito de diferentes íons metálicos sobre a atividade da  $\alpha$ -amilase foi determinado incubando-se a enzima a 90 °C/10minutos (em banho-maria) na presença do respectivo íon, nas concentrações de 5 e 10mM, seguido da determinação da atividade enzimática residual (%) na mesma temperatura. Um controle, conduzido na ausência dos metais, foi também feito e considerado como 100% da atividade da enzima. Os resultados deste trabalho são mostrados na Tabela 4.

Os íons metálicos  $Zn^{2+}$ ,  $Li^+$ ,  $Ba^{2+}$  e  $Na^+$  estimularam a atividade da  $\alpha$ -amilase em ambas as concentrações estudadas ou em apenas uma delas. Por outro lado, íons como o  $Ni^+$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  e  $Co^{2+}$  inibiram a atividade da  $\alpha$ -amilase.

Segundo Hayashida et al. (1988), os íons  $Zn^{2+}$  e  $Ca^{2+}$  estabilizaram a atividade da  $\alpha$ -amilase de *Bacillus* sp. Por outro lado, de acordo com estudos realizados por Mamo e Gessesse (1999), os íons  $Fe^{3+}$ ,  $Hg^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  na concentração de 5mM inibiram a atividade da  $\alpha$ -amilase de *Bacillus* sp.; e os íons que aumentaram a atividade enzimática foram  $Ca^{2+}$ ,  $Na^+$ ,  $Co^{2+}$  e  $Ba^{2+}$ .

De acordo com Heinem e Lauwers (1975), o cálcio das enzimas livres pode ser reativado pela adição de íons  $Ca^{2+}$ . Alguns estudos sobre a habilidade de outros íons substituir  $Ca^{2+}$ , como por exemplo o  $Sr^{2+}$  nas amilases de *Bacillus caldoyticus*, têm sido conduzidos.

Tabela 4 – Efeito de alguns íons metálicos, nas concentrações de 5 mM e 10 mM, na atividade da  $\alpha$ -amilase

<b>METAIS</b>	<b>% Atividade residual [5 mM]</b>	<b>% Atividade residual [10 mM]</b>
Controle	100% $\pm$ 1,73	100% $\pm$ 1,73
ZnCl <sub>2</sub>	111,41 $\pm$ 1,19	42,95 $\pm$ 1,34
LiCl	106,16 $\pm$ 2,36	72,20 $\pm$ 0,30
BaCl <sub>2</sub>	102,26 $\pm$ 3,96	118,75 $\pm$ 1,33
SrCl <sub>2</sub>	95,92 $\pm$ 3,58	69,39 $\pm$ 0,48
KCl	96,10 $\pm$ 2,39	67,58 $\pm$ 1,96
NaCl	83,16 $\pm$ 1,78	118,75 $\pm$ 2,60
CaCl <sub>2</sub>	88,41 $\pm$ 2,88	83,07 $\pm$ 3,40
CsCl	79,06 $\pm$ 2,66	74,91 $\pm$ 1,40
HgCl <sub>2</sub>	75,00 $\pm$ 2,71	28,46 $\pm$ 1,01
NiCl <sub>2</sub>	68,03 $\pm$ 1,15	44,12 $\pm$ 2,02
FeCl <sub>2</sub>	44,03 $\pm$ 0,18	52,86 $\pm$ 2,07
CuCl <sub>2</sub>	42,76 $\pm$ 1,14	0
CoCl <sub>2</sub>	31,44 $\pm$ 0,84	35,34 $\pm$ 2,32
MnCl <sub>2</sub>	27,46 $\pm$ 0,48	0
MgCl <sub>2</sub>	-----	63,69 $\pm$ 1,35

A enzima foi pré-incubada com o íon metálico a 90 °C por 10 minutos. A atividade é expressa como porcentagem da atividade obtida em ausência de metais. O controle (atividade da enzima na ausência de íons) foi considerado como 100% de atividade e correspondeu a 41  $\mu$ mol glicose/ml.

## 5. RESUMO E CONCLUSÕES

As  $\alpha$ -amilases são endoenzimas produzidas por bactérias, fungos, leveduras, animais e vegetais e têm ampla aplicação nas indústrias têxteis, de alimentos, papel e detergentes, farmacêutica e bioquímica, de couro, entre outras.

Considerando a grande potencialidade da utilização industrial das amilases, este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar a produção  $\alpha$ -amilase por um microrganismo termofílico, *Bacillus* sp. SMIA-2, quando cultivado num meio de cultura contendo o soro de leite. Algumas propriedades bioquímicas da enzima foram também estudadas.

A adição da água de maceração de milho (0,05%) ao meio de cultura contendo o soro de leite proporcionou um aumento dos valores da densidade ótica da cultura e da atividade de  $\alpha$ -amilase. Porém, o aumento na concentração da água de maceração de milho de 0,05% até 0,4% não afetou o crescimento do microrganismo nem a atividade da  $\alpha$ -amilase.

Na ausência da lactose no meio de cultura, um baixo crescimento do microrganismo foi observado. À medida que se aumentou a concentração desta fonte de carbono, a densidade ótica da cultura aumentou. Entretanto, para a síntese da  $\alpha$ -amilase, a melhor concentração da lactose no meio foi de 0,2%. Concentrações maiores que esta inibiram a atividade da enzima.

O aumento da concentração do soro de leite no meio de cultura de 0,025% a 0,15% não influenciou o crescimento de *Bacillus* sp. SMIA-2. Por outro lado, a atividade da  $\alpha$ -amilase aumentou quando se adicionou 0,15% de soro de leite ao meio de crescimento.

Estudos sobre a caracterização da  $\alpha$ -amilase revelaram que a enzima mostrou uma atividade crescente entre 50 °C e 90 °C, em que a atividade atingiu o seu valor máximo. Acima de 90 °C, ocorreu uma redução drástica da atividade da enzima, sendo que, a 100 °C, a  $\alpha$ -amilase foi completamente inativada. A enzima mostrou-se mais estável a 80 °C, mantendo 90% da sua atividade.

O pH ótimo da enzima foi 8,5. Uma redução da atividade da ordem de 45% foi observada para valores de pH iguais a 9,0 e 9,5. A estabilidade da  $\alpha$ -amilase aumentou com o aumento do pH até mais ou menos 8,5. Já em pH 10, cerca de 76% da atividade enzimática foi perdida.

Os íons metálicos  $Zn^{2+}$ ,  $Li^+$ ,  $Ba^{2+}$  e  $Na^+$  estimularam a atividade da  $\alpha$ -amilase de *Bacillus* sp. SMIA-2 em ambas as concentrações estudadas ou em apenas uma delas. Por outro lado, íons como o  $Ni^+$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  e  $Co^{2+}$  inibiram a atividade da  $\alpha$ -amilase.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agência Nacional de Águas. <http://www.ana.gov.br> em 11/01/2006.
- Aguilar, A. (1996) Extremophile research in the European Union: from fundamental aspects to industrial expectations. *FEMS Microbiology Reviews*, 18:89-92.
- Ali, M.B., Mezghani, M., Bejar, S. (1999) A thermostable alpha amylase producing maltohexose from a newly isolated *Bacillus* sp. US100: study of activity and molecular cloning of the corresponding gene. *Enzyme Microb. Technol.* 24:584-589.
- Andrade, C.M.M.C., Pereira-Jr., N., Antranikian, G. (1999) Extremely thermophilic microorganisms and their polymer-hydrolytic enzymes. *Revista de Microbiologia*, 30:287-298.
- Antranikian, G., Rudiger, A., Canganella, F., Klingenberg, M., Sunna, A. (1995) Biodegradation of polymers at temperatures up 130-degrees-C. *J. Macromol. Sc. Pure and Appl. Chem.* 32:661-669.
- Apar, D.K., Özbeh, B. (2005)  $\alpha$ -Amilase inactivation during rice starch hydrolysis. *Process Biochemistry*, 40:1367-1379.



- Aquino, A.C.M.H. (2000) *Purificação e determinação de propriedades bioquímicas das atividades da glucoamilase e  $\alpha$ -amilase produzidas pelo fungo termofílico Scytalidium thermophilum 15.1*. Tese (Mestrado em Biologia Comparada) – Ribeirão Preto – SP, FFCLRP/USP, 121p.
- Archana, A., Satyanarayana, T. (1997) Xylanase production by thermophilic *Bacillus licheniformis* A99 in solid-state fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, 21:12-17.
- Associação Brasileira das indústrias de moagem de milho. <http://www.abimilho.com.br/setor.html> em 11/01/2006.
- Baig, M.A., Paz larvná, J., Votruba, J. (1984) Kinetics of  $\alpha$ -amilase production in a batch and a fed-batch culture of *Bacillus subtilis*. *Folia Microbiológica*, 29:359-364.
- Bajpai, P., Bajpai, P. (1989) High-temperature alkaline  $\alpha$ -amilase from *Bacillus licheniformis* TCRDC-B13. *Biotechnology and Bioengineering*, 33:71-78.
- Bertoldo, C., Antranikian, G. (2002) Starch-hydrolyzing enzymes from thermophilic archaea and bacteria. *Current Opinion in Chemical Biology*, 6:151-160.
- Bigelis, R. (1993) Carbohydrases. In: Nagodawithana, T., Reed, G. (eds.) *Enzymes in food processing*. 3. ed. New York: Academic Press, p. 121-158.
- Bolton, J.D., Kelly, C.K., Fogarty, W.M. (1997) Purification and characterization of the  $\alpha$ -amilase of *Bacillus flavothermus*. *Enzyme and Microbial Technology*, 20:340-343.
- Brock, T.D. (1978) *Thermophilic microorganism and life at high temperatures*. New York: Springer-Verlag, 121p.
- Bruinenberg, P.M., Hulst, A.C., Faber, A., Voogd, R.H. (1996) A process for surface sizing or coating of paper. *European Patente Application EP 0,690,170* A1.
- Bruins, M.E., Janssen, A.E., Boom, R.M. (2001) Thermozyms and their applications: a review of recent literature and patents. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 90:155-186.

- Brumm, P.J. (1998) Enzymatic production of dextrose. *Cereal Food World*, 40:804-807.
- Burhan, A., Nisa, U., Gökhan, C., Ömer, C., Ashabil, A., Osman, G. (2003) Ezymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkaliphilic *Bacillus* sp. Isolate ANT6. *Process Biochemistry*, 38:1397-1403.
- Burkert, J.F.M., Maugeri, F., Rodrigues, M.I. (2004) Optimization of extracellular lipase production by *Geotrichum* sp. using factorial design. *Bioresource Technol.* 77-84.
- Campbell, L.L. (1995) Purification and properties of an  $\alpha$ -amylases from facultative thermophilic bacteria. *Arch. Biochem. Biophys.* 154-161.
- Chandra, A.K., Medda, S., Bhadra, A.K. (1980) Production of extraxcelular thermostable  $\alpha$ -amilase by *Bacillus licheniformis*. *J. Ferment. Technol.* 1-10.
- Cheng, C.Y., Yable, I., Toda, K. (1989) Predominant growth of  $\alpha$ -amilase regulation mutant in continuous culture of *Bacillus caldolyticus*. *J. Ferment. Bioeng.* 67:176-181.
- Chiang, J.P., Alter, J.E., Sternberg-Elkahart, M. (1979) Purification and characterization of a thermostable alfa-amylase from *Bacillus licheniformis*. *Die Starke*, 86-92.
- Cordeiro, C.A.M., Martins, M.L.L. (2002) Production and properties of  $\alpha$ -amilase from thermophilic *Bacillus* sp. *Braziliam archives of biology and technology*, 45:413-418.
- Crabb, W.D., Mitchinson, C. (1997) Enzymes involved in the processing of starch to sugars. *Tibtech*, 15:349-352.
- Dancer, B.N., Mandelstam, J. (1975) Criteria for categorizing early biochemical events occurring during sporulation of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 121:411-415.
- Egas, M.C.V., Costa, M.S.S., Cowan, D.A., Pires, E.M.V. (1998) Extracellular  $\alpha$ -amilase from *Thermus filiformis* Ork A2: purification and biochemical characterization. *Extremophiles*, 2:23-32.

- Emanuilova, E.I., Toda, K. (1984)  $\alpha$ -Amilase production in batch and continuous cultures by *Bacillus flavothermus* in batch fermentation. *Appl. Microbiol Biotechnol.* 19:301-305.
- Evans, C.G.T., Herbert, D., Tempest, D.W. (1970) The continuous cultivation of microorganisms. Construction of a chemostat. *Methods in Microbiology*, 2:275-327.
- Feijoo, G., Moreira, M.T., Roca, E., Lema, J.M. (1999) Use of cheese whey as a substrate to produce megenese peroxidase by *Bjerkandera* sp. BOS55. *Journal of Industrial Microbiology e Biotechnology*. 23:86-90.
- Ferreira, C.L.L.F., Mosquim, M.C.A.V. (1996) Aproveitamento tecnológico racional de efluentes de laticínios. *III Encontro Digital de Tecnologia de Laticínios*, Viçosa: UFV.
- FI – Food Ingredients, South America* (2002) Brasil, n.17, p. 31-33.
- Fischer, E.H., Stein, E.A. (1971) Bacterial and mold amylases. *In: The enzymes*. New York: Academic Press, p. 25-32.
- Fogarty, W.M., Kelly, C.T. (1979) Developments in microbial extracellular enzymes. *In: Topics in enzyme and fermentation biotechnology-3*. J. Wiley, England, 3:45-102.
- Fomenkova, N.P., Nevskaya, N.A., Nikulin, A.D., Nikonov, S.V. (1998) Strutral aspects of protein thermostability. *Molecular Biology*, 32:265-272.
- Fontana, A. (1991) Analysis and modulation of protein stability. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2:551-560.
- Franco, B.D.G., Landgraf, M. (1996) *Microbiologia dos Alimentos*. São Paulo: Editora Atheneu, 181p.
- Glazer, A.N., Nikaido, H. (1995) *Microbiol. and Biotechnol.* New York: W.H. Freeman and Company, 662p.
- Godfrey, T., West, S. (1996) *Industrial Enzymology*. 2. ed. New York: Stockyon Press, 609p.

- Gomes, E., Da Silva, R., Lembo, T. (2001) The production, characterization and properties of depolymerizing enzymes from a strain of *Curvalaria inaequalis*. *Folia Microbiol.*, 46:303-308.
- Goto, C.E., Barbosa, E.P., Kistner, L.C.L., Gandra, R.F., Arrias, V.L., Peralta, R.M. (1998) Production of amylases by *Aspergillus fumigatus*. *Revista de Microbiologia*, 29:99-103.
- Guzmán-Maldonado, H., Paredes-López, O. (1995) Amylolytic enzymes and products derived from starch: A review. *Crit. Rev. Food Science Nutr.* 35:373-403.
- Hamilton, L.M., Kelly, C.T., Fogarty, W.M. (1999) Production and properties of the raw starch-digesting  $\alpha$ -amilase of *Bacillus* sp. IMD435. *Process Biochemistry*. 35:27-31.
- Hartman, P.A., Wellerson, R., Tetrault, P.P. (1995) *Bacillus stearothermophilus*. I. – Thermal and pH stability of the amylase. *Appl. Microbiol.* 7-10.
- Hayashida, S., Teramoto, Y., Inoue, T. (1988) Production and characteristics of raw potato starch digesting  $\alpha$ -amilase from *Bacillus subtilis* 65. *Appl Environ. Microbiol.* 54:1516-1522.
- Hebeda, R.E. (1987) Corn sweeteners. In: Watson, S.A., Ramstad, P.E. (eds.) *Corn chemistry and technology*. St Paul, Minnesota: American Association of Cereal Chemistry, Inc. p. 65-84.
- Hebeda, R.E., Styrlund, C.R., Teague, W.M. (1988) Benefits of *Bacillus megaterium* amylase in dextrose production. *Starch/Stärke*, 40:33-35.
- Heinem, W., Lauwers, A.M. (1975) Amylase active and stability at high and low temperature depending on calcium and other divalent cations. *Experientia*, 26:77.
- Hough, D.W., Danson, M.J. (1999) Extremozymes. *Current opinion in chemical biology*, 3:39-46.
- IDF - Bulletin of the international dairy federation (2001) *General Trends 1990 - 1999*, Part 1, Belgium, n. 359, p. 1-48.

- Kang, G.J., Kim, M.J., Kim, J.W., Park, K.H. (1997) Immobilization of thermostable maltogenic amylase from *Bacillus stearotherophilus* for continuous production of branched oligosaccharides. *Journal of Agricultural and food chemistry*, 45:4168-4172.
- Kelly, C.T., Bolton, D.J., Fogarty, W.M. (1997) Biphasic production of  $\alpha$ -amylase of *Bacillus flavothermus* in batch fermentation. *Biotechnol Lett.* 19:675-677.
- Khamrui, K., Pal, D., Rajorhia, G.S. (2001) Production of ready – to – reconstitute beverages from Cheddar cheese whey and Kinnow mandarin juice. *Milk science international*, 56:541-600.
- Knipschildt, M.E., Andersen, G.G. (1994) Drying of milk and milk products. *Modern Dairy Technology*, 1:34-41.
- Kona, R.P., Qureshi, N., Pai, J.S. (2001) Production of glucose oxidase using *Aspergillus niger* and corn steep liquor. *Bioresource Technology*, 123-126.
- Konsula Z., Liakopoulou-Kyriakides, M. (2004) Hydrolysis of starches by the action of an  $\alpha$ -amylase from *Bacillus subtilis*. *Process Biochemistry*, 39:1745-1749.
- Kosikowski, F.V. (1979) Our Industry Today. *J. Dairy Sci.* 62:1149-1160.
- Kottwitz, B., Upadek, H., Carrer G. (1994) Applications and benefits of enzymes in detergent. *Chim Oggi.* 12:21-24.
- Krishnan, T., Chandra, A.K. (1982) Effect of oilseed cakes on  $\alpha$ -amylase production by *Bacillus licheniformis* CUMC305. *Applied and Environmental Microbiology*, 270-274.
- Kumar, C.G., Takagi, H. (1999) Microbial alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint. *Biotechnol Adv.* 17:561-594.
- Lasa, I., Berenguer, J. (1993) Thermophilic enzymes and their biotechnological potential. *Microbial. Sem.* 9:77-89.
- Lee, D-W., Kim, H-W., Lee, K-W., Kim, B-C., Choe, E-A., Lee, H-S., Kim, D-S., Pyun, Y-R. (2001) Purification and characterization of two thermostable lipases from the gram-positive thermophilic bacterium *Bacillus thermoleovorans* ID-1. *Enzyme and Microbial Technology*, 29:363-371.

- Legin, E., Copinet, A., Duchurion, F. (1998) Production of thermostable mylolitic enzymes by *Thermococcus hydrothermalis*. *Biotechnol. Lett.* 20:363-367.
- Legin, E., Ladrat, C., Godfroy, A., Barbier, G., Duchiron, F. (1997) Thermostable amyloitic enzymes of thermophilic microorganisms from deep-sea hydrothermal vents. *C. R. Acad. Sci.* 320: 893-898.
- Liao, H., Mc Kenzie, T., Hageman, R. (1986) Isolation of a thermostable enzyme variante by cloning and selection in a thermophile. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83:576-580.
- Lin, L.L., Chyau, C.C., Hsu, W.H. (1998) Production and properties of a raw-starch-degrading amylase from thermiphilic and alkaliphilic *Bacillus* sp. TS-23. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 61-68.
- Losane, B.K., Ramesh, M.V. (1990) Production of bacterial thermostable  $\alpha$ -amylase by solid state fermentation: a pontential tool for achieving economy in enzyme production and starch hydrolysis. *In: Advances in applied microbiology*. San Diego: California Academic Press, p. 1-56.
- Lynn, M.H., Catherine, T.K., William, M.F. (1999) Production and properties of raw starch-digesting  $\alpha$ -amilase of *Bacillus* sp. IMD 435. *Process Biochemistry*. 35:29-30.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J., Brock, T.D. (1996) *Biology of microorganisms*. 8. ed. New Jersey: Prentice-Hall, 986p.
- Madsen, G.B., Norman, B.E., Slott, S. (1973) A new heat stable bacterial amylase and its use in high temperature liquefaction. *Die Starke*,304-308.
- Mamo, G., Gashe, B.A., Gessesse, A. (1999) A high thermostable amylase from newly isolated thermophilic *Bacillus* sp. WN11. *J. Appl. Microbiol.* 86 (4):557-560.
- Mamo, G., Gessesse, A. (1999) Purification and characterization of two raw-starch-digesting thermostable  $\alpha$ -amilases from a thermophilic *Bacillus*. *Enzyme and Microbial Technology*, 25:433-438.

- Manning, G.B., Campbell, L.L. (1961) Thermostable  $\alpha$ -amilase of *Bacillus stearothermophilus*. I. Crystallization and some general properties. *J. Biol Chem.* 236:2952-2957.
- Manoj, A.S., Pradeep, S., Chandraraj, K., Sathyanarayanna, N.G. (2005) Hydrolysis of starch by amylase from *Bacillus* sp. KCA102: a statistical approach. *Process Biochemistry*, 40:2499-2507.
- Marc, J.E.C., Joost, C.M.U., Hans Leemhuis, L.D. (2002) Properties and applications of starch-converting enzymes of the  $\alpha$ -amilase family. *Journal of Biotechnology*, 94:137-155.
- Marchal, L.M., Van de Laar, A.M.J., Goetheer, E., Schimmelpennink, E.B., Bergsma, J., Beeftink, H.H., Tramper, J. (1999) Effect of temperature on saccharide composition obtained after  $\alpha$ -amylolysis of starch. *Biotechnology and Bioengineering*, 63:344-455.
- Marco, J.L., Bataus, L.A., Valencia, F.F., Ulho, C.J., Astolfi-Filho, S., Felix, C.R. (1996) Purification and characterization of a truncated *Bacillus subtilis*  $\alpha$ -amylase produced by *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 44:746-752.
- Matsumura, M., Yasumura, S., Aiba, S. (1986) Cumulative effect of intragenic amino-acid replacements on the thermostability of a protein. *Nature*, 323:356-358.
- McMahon, H.E.M., Kelly, C.Y., Fogarty, W.M. (1997) Effect of growth rate on  $\alpha$ -amylase production by *Streptomyces* sp. IMD2679. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 48:504-509.
- Ming Chu, I., Lee, C., Li, T.S. (1992) production and degradation of alkaline protease in batch cultures of *Bacillus subtilis* ATCC 14416. *Enzyme Microb. Technol.* 14:755-761.
- Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, P.A., Rodwell, V.W. (1994) *Harper: Bioquímica*. 7. ed. São Paulo: Atheneu, 763p.
- Nascimento, W.C.A. (2005) *Estudos sobre a secreção de proteases por Bacillus sp. SMIA-2 e sua compatibilidade com detergentes comerciais*. Tese

- (Doutorado em Produção Vegetal) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, 79p.
- Nunes, A.S., Martins, M.L.L. (2001) Isolation, properties and kinetics of growth of a thermophilic *Bacillus*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 32:271-275.
- Pandey, A. (1992) Recent process development in solid state fermentation. *Process Biochemistry*, 27:109-117.
- Pandey, A. (1994) Solidstate fermentation: An overview. *Solid State Fermentation*. Wiley Eastern, New Delhi, 3-10.
- Pandey, A., Nigam, P., Soccol, C.R., Soccol, V.T., Singh, D., Mohan, R. (2000a) Advances in microbial amylases. *Biotechnol Appl. Biochem.* 31:135-152.
- Pandey, A., Nigam, P., Vogel, M. (1988) Simultaneous saccharification and protein enrichment fermentation of sugar beet pulp. *Biotechnol. Lett.* 10:67-72.
- Pandey, A., Soccol, C.R., Nigam, P., Soccol, V.T., Vandenberghe, L.P.S., Mohan, R. (2000b) Biotechnological potential of agro-industrial residues. II: cassava bagasse. *Bioresour. Technol.* 74:81-87.
- Pelczar, M.J., Reid, R., Chan, E.C.S. (1981) *Microbiologia*. 1. ed. São Paulo: Makron Books do Brasil, 522p.
- Pelczar, M.J., Chan, E.C.S., Krieg, N.R. (1996) *Microbiologia: conceitos e aplicações*. 2. ed. São Paulo: MAKRON Books do Brasil, 524p.
- Priest, F.G. (1977) Extracellular enzyme synthesis in the Genus *Bacillus*. *Bacteriol. Reviews*, 711-53.
- Richards, N.S.P.S. (1997) Emprego racional do soro lácteo. *Rev. Indústria de laticínios*, (9):67-69.
- Romero, F.J., Garcia, L.A., Salas, J.A., Díaz, M., Quirós, L.M. (2001) Production purification and partial characterization of two extracellular proteases from *Serratia marcescens* grown in whey. *Process Biochemistry*, 6:507-515.
- Roychoudhury, S., Parulekar, S.J., Weigand, W.A. (1989) Cell growth and  $\alpha$ -amilase production characteristics of *Bacillus amyloliquefaciens*. *Biotechnology and Bioengineering*, 33:197-206.



- Saito, N.A. (1973) Thermophilic extracellular  $\alpha$ -amilase from *Bacillus licheniformis*. *Arch. Biochem. Biophys.* 155:290-298.
- Saito, N.A., Yamamoto, K. (1975) Regulatory factors affecting  $\alpha$ -amilase production in *Bacillus licheniformis*. *Journal of Bacteriology*, 848-856.
- Salva, T.J.G. (1990)  *$\alpha$ -Amilase de Bacillus subtilis ATCC 601B: Produção e propriedades da enzima não purificada*. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Campinas – SP, Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, 128p.
- Salva, T.J.G., Moraes, I.O. (1994) Effect of pH and temperature on *Bacillus subtilis* ATCC 601  $\alpha$ -amilase production. Some properties of the crude enzyme. *Revista de microbiologia*, 25:119-125.
- Santos, H., Lamosa, P., Costa, M. (2001) *Extremófilos: microrganismos à prova de agressões ambientais extremas*. Biotecnologia Microbiana: Boletim de Biotecnologia. n. 2.
- Santos, J.P.V., Ferreira, C.L.L.F. (2001) Alternativas para o aproveitamento de soro de queijo nos pequenos e médios laticínios. *Ver. Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, (321):44-50.
- Schaeffer, P. (1977) Asporogenous mutants of *Bacillus subtilis* Marburg. *Folia Microbiology*, 12:291-296.
- Scott, K.J. (1989) Micronutrients in milk products. *Elsevier Science Publishr.* 71-124.
- Shinke R., Aoki, K., Murokam, S., Inoue, T., Babat, T. (1996) Alkaline and thermophilic amylases of industrial use. *Enzyme engineering XIII. Annals of the New York Academy of Sciences*, New York, v. 779, p. 332-40.
- Sidhu, G.S., Sharma, P., Chakrabarti T., Grupta, J.K. (1997) Strain improvement for the production of a thermostable  $\alpha$ -amilase. *Enzyme and microbial technology*. 21:525-530.
- Singh, S.K., Johnson, L.A., Pollak, L.M., Fox, S.R., Bailey, T.B. (1997) Comparison of laboratory and pilot-plant corn wet-milling procedures. *Cereal Chem.* 74:40-48.

- Soares, M.M.C.N., Da Silva, R., Gomes, E. (1999) Screening of bacterial strains for pectinolytic activity: characterization of the polygalacturonase produced by *Bacillus* sp. *Revista de Microbiologia*, 30:225-230.
- Soares, M.M.C.N., Da Silva, R., Gomes, E. (2001) Pectinolytic enzyme production by *Bacillus* species and their potential application on juice extraction. *World Journal Biotechnol.* 17:79-82.
- Solomon, B. (1978) Starch hydrolysis by immobilized enzymes industrial applications. *Adv. Biochem. Eng.* 132-72.
- Souza, A.N., Martins, M.L.L. (2001) Isolation, properties and kinetics of growth of a thermophilic *Bacillus*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 32:271.
- Stein, E.A., Hsiu, J., Fischer, E.H. (1964) Alpha-amylases as calcium metalloenzymes. I – Preparation of calcium free apoamylases by chelation and electro dialysis. *Biochemistry*, 56-61.
- Stephenson, K., Carter, N.M., Harwood, C.R., Petit-Glatron, M.F., Chambert, ?. (1998) The influence of protein folding on late stages of the secretion of  $\alpha$ -amylase from *Bacillus subtilis*. *FEBS Letters*, 430:385-389.
- Tavares, V.B., Silvieri, K., Ceron, C.R., Silva, R., Trabuco, E., Lombardi, F.R., Gomes, E. (1998) Utilização de resíduo líquido de indústria de processamento de suco de laranja como meio de cultura de *Penicillium citrinum*: depuração biológica do resíduo e produção de enzima. *Química Nova*, 21:722-725.
- Tolan, J.S. (1996) Pulp and paper. In: Godfrey, T., West, S., (eds.) *Industrial enzymology*. 2. ed. New York: Stockton Press, p. 327-38.
- Tolner, B., Poolman, B., Konings, W.N. (1997) Adaptation of microorganisms and their transport systems to high temperatures. *Comp. Biochem. Physiol.* 118:423-428.
- Uguru, G.C., Akinyanju, A.J., Sani, A. (1996) The use of sorghum for thermostable amylase production from *Thermoactinomyces thalophilus*. 96:13-16.
- Vallee, B.L., Stein, E.A., Sumerwell, W.N., Fischer, E.H. (1959) Metal content of  $\alpha$ -amilases of various origins. *J. Biol. Chem.* 2901-2905.

- Van der Maarel, M.J.E.C., Van der Veen, B., Uitdehaag, J.C.M., Leemhuis, H., Dijkhuizen, L. (2002) Properties and applications of starch converting enzyme of  $\alpha$ -amilase family. *J. Biotechnol.* 94:137-55.
- Vieille, C., Zeikus, J.G. (1996). Thermozyms: indentifying, molecular determinants of protein structural and functional stability. *Tibtech.* 183-190.
- Vihinem, M, Mäntsälä, P. (1989) Microbial Amylolitic Enzymes. *Issue*, 24:329-418.
- Viotto, H.W., Roing, S.M. (1994) Efeito de pré-tratamentos no fluxo de permeado durante ultrafiltração de soro de queijo. *Bol. da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 28:47-55.
- Welker, N.E., Campbell, L.L. (1963) Effect of carbon sources on formation of  $\alpha$ -amilase by *Bacillus stearothermophilus*. *J. Bacteriol.* 44:270-274.
- Welker, N.E., Campbell, L.L. (1964) Preferential synthesis of  $\alpha$ -amylase by *Bacillus stearothermophilus* in the presence of 5-methylthryptophane. *J. Bacteriol.* 87:828-831.
- Zadow, J.G. (1994) Utilization of milk components. *In: Whey*, R.K., Robinson, M. *Modern dairy technology advances in milk processing*, 7:63-72.