

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE  $\alpha$ -AMILASE POR *Bacillus* sp.  
SMIA-2 TERMOFÍLICO UTILIZANDO PROTEÍNAS DO SORO DE  
LEITE, E ALGUMAS APLICAÇÕES DA ENZIMA

**RAQUEL VIEIRA DE CARVALHO**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE  
DARCY RIBEIRO - UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ  
FEVEREIRO - 2007

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE  $\alpha$ -AMILASE POR *Bacillus* sp.  
SMIA-2 TERMOFÍLICO UTILIZANDO PROTEÍNAS DO SORO DE  
LEITE, E ALGUMAS APLICAÇÕES DA ENZIMA

**RAQUEL VIEIRA DE CARVALHO**

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 Doutor em Produção Vegetal

Orientadora: Profa. Meire Lelis Leal Martins

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ  
FEVEREIRO – 2007

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE  $\alpha$ -AMILASE POR *Bacillus* sp.  
SMIA-2 TERMOFÍLICO UTILIZANDO PROTEÍNAS DO SORO DE  
LEITE, E ALGUMAS APLICAÇÕES DA ENZIMA

**RAQUEL VIEIRA DE CARVALHO**

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 Doutor em Produção Vegetal

Aprovada em 15 de fevereiro de 2007

Comissão Examinadora:

---

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

---

Profa. Karla Ferreira da Silva (Doutora, Ciência e Tecnologia dos Alimentos) -  
UENF

---

Sílvia Menezes de Faria Pereira (Doutora, Engenharia e Ciências dos Materiais) -  
UENF

---

Profa. Meire Lelis Leal Martins (Ph. D. Microbiologia) - UENF  
Orientadora

*A DEUS,*

*A MINHA FAMÍLIA,*

*AO MEU QUERIDO JEAN.*

## **AGRADECIMENTO**

A DEUS, por estar em todos os momentos ao meu lado. Pela vida, saúde, família maravilhosa e por todas as oportunidades que sempre me Deste.

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), pela oportunidade de realização do curso, assim como a concessão da bolsa de estudo.

À professora Meire Lelis Leal Martins, pela orientação, profissionalismo, conduta, apoio, confiança e amizade.

Aos professores integrantes da banca examinadora, Carlos Alberto Martins Cordeiro, Karla Silva Ferreira e Sílvia Menezes de Faria Pereira, por terem aceitado a contribuir com este trabalho.

À Ana Lúcia Paes Barbosa, pela amizade e colaboração na condução dos experimentos.

Aos colegas da pós-graduação e do Laboratório de Tecnologia de Alimentos, pela troca de experiência, apoio e companheirismo durante minha trajetória.

Ao secretário Paulo Sérgio, pela disponibilidade, atenção e presteza em todos os momentos.

Aos laboratórios de Fisiologia Vegetal (LMGV-CCTA), Melhoramento Vegetal (LMGV-CCTA), Fisiologia e Bioquímica Molecular (LFBM-CBB), pela

colaboração e amizade, em especial, aos colegas Maria Ângela, Suzana, Priscila, Felipe, Cláudia Pombo, Vitória e Ricardo.

À professora Marília, pelas contribuições e apoio para a concretização deste trabalho.

Ao professor Alexandre Pio Viana, pela atenção e orientações estatísticas.

Às estagiárias Thamy e Júlia, pela dedicação, interesse, pontualidade, disposição para trabalhar, acertar, errar e tentar novamente; agradeço também pelo imenso carinho e confiança.

Às amigas Wellingta e Claudinelli que, mesmo em pouco tempo puderam proporcionar momentos alegres e transmitir seus grandes conhecimentos.

À amiga Camila, pelo apoio, companheirismo, pela maravilhosa convivência e muitos momentos de descontração.

Às grandes amigas, que muito admiro pelo caráter, competência e dedicação, Lanamar e Sílvia. Agradeço também pelo apoio, incentivo, críticas, atenção, amizade e carinho. Além, é claro, pelas caronas para Cataguases e para a Uenf.

À amiga Roberta, com quem passei parte do curso, pela convivência, pelas horas de conversa, momentos de estudos e principalmente pela amizade.

Às amigas e vizinhas Karina e Beth, por estarem presentes em muitos momentos difíceis e também alegres, pelos conselhos e apoio. Pelos lanches da tarde e horas tranquilas de relaxamento.

Aos meus pais e irmãos, pelo imenso incentivo, respeito e amor sempre demonstrados. Agradeço por acreditarem em meu sonho.

Às minhas cunhadas, pelo respeito e carinho transmitidos nessa minha jornada.

E..., principalmente, ao meu noivo Jean. Agradeço-lhe pela paciência, compreensão, amizade, companheirismo, respeito, sinceridade, força e seu imenso amor.

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho, os meus sinceros agradecimentos.

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	x
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Importância dos microrganismos termofílicos em processos industriais.....	3
2.2. Enzimas microbianas.....	5
2.3. Amido.....	7
2.4. Enzimas amilolíticas ou amilases.....	9
2.5. Amilases termoestáveis.....	11
2.6. Influência da composição e das condições de cultivo para a produção de amilases.....	13
2.6.1. Efeito das fontes de carbono.....	14
2.6.2. Efeito das fontes de nitrogênio.....	15
2.6.3. Importância do cálcio e outros metais na estabilidade de $\alpha$ -amilase.....	16

2.7. Utilização de resíduos agroindustriais em processos biotecnológicos.....	17
2.8. Aplicação industrial de amilases.....	19
3. TRABALHOS.....	24
3.1. EFEITO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO SOBRE A PRODUÇÃO DE AMILASES PELO TERMOFÍLICO <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2 E HIDRÓLISE DE AMIDOS PELA AÇÃO DA ENZIMA.....	24
Resumo.....	24
Abstract.....	26
1. INTRODUÇÃO.....	26
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	28
2.1. Microrganismo e meio de manutenção.....	28
2.2. Meio de crescimento.....	29
2.3. Preparo do inóculo.....	29
2.4. Crescimento do microrganismo.....	30
2.5. Medida do crescimento.....	30
2.6. Ensaio enzimático.....	30
2.7. Efeito das condições de cultivo sobre o crescimento e a atividade da amilase.....	31
2.7.1. Influência da fonte de carbono.....	31
2.7.2. Efeito das concentrações de amido solúvel.....	31
2.7.3. Efeito da suplementação do meio de cultura com proteínas do soro de leite.....	31
2.7.4. Influência da fonte de nitrogênio.....	32
2.7.5. Influência dos parâmetros pH inicial e temperatura de incubação dos meios de cultivo na atividade amilolítica.....	32
2.8. Hidrólise de algumas fontes de amido.....	33
2.9. Delineamento experimental.....	33
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
3.1. Perfil do crescimento do microrganismo e atividade da amilase...	33
3.2. Influência da composição do meio de cultura sobre o crescimento e a atividade da amilase.....	36
3.2.1. Influência da fonte de carbono.....	36
3.2.2. Efeito das concentrações de amido solúvel na atividade da	

enzima.....	37
3.2.3. Efeito da suplementação do meio de cultura com proteínas do soro de leite.....	39
3.2.4. Influência da fonte de nitrogênio.....	41
3.2.5. Influência dos parâmetros temperatura de incubação e pH inicial dos meios de cultivo na atividade amilolítica.....	43
3.3. Hidrólise de algumas fontes de amido.....	46
4. CONCLUSÕES.....	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48
3.2. PROPRIEDADES DE UMA AMILASE PRODUZIDA POR UM <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2 TERMOFÍLICO E SUA COMPATIBILIDADE COM ALGUNS DETERGENTES COMERCIAIS.....	55
Resumo.....	55
Abstract.....	57
1. INTRODUÇÃO.....	57
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	58
2.1. Microrganismos e condições de cultivo.....	58
2.2. Determinação da atividade da $\alpha$ -amilase.....	59
2.3. Efeito do pH na atividade e estabilidade da $\alpha$ -amilase.....	60
2.4. Efeito da temperatura na atividade e estabilidade da $\alpha$ -amilase...	60
2.5. Efeito dos íons metálicos.....	61
2.6. Teste de tolerância salina.....	61
2.7. Efeito de alguns inibidores e agentes oxidantes na atividade da enzima.....	61
2.8. Avaliação da enzima para uso em formulações de detergentes...	61
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	62
3.1. Produção da enzima.....	62
3.2. Efeito do pH na atividade e estabilidade da $\alpha$ -amilase.....	63
3.3. Efeito da temperatura na atividade e estabilidade da $\alpha$ -amilase...	65
3.4. Efeito dos íons metálicos.....	68
3.5. Teste de tolerância salina.....	69
3.6. Efeito dos inibidores e alguns agentes oxidantes na atividade da enzima e compatibilidade com detergentes comerciais.....	71
4. CONCLUSÕES.....	73

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74
4. RESUMO E CONCLUSÕES.....	79
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81

## LISTA DE TABELAS

1	Principais utilizações industriais de enzimas.....	7
2	Efeito da fonte de carbono para produção de $\alpha$ -amilase pelo <i>Bacillus sp.</i> SMIA-2, crescido a 50 °C.....	36
3	Efeito das diferentes concentrações de amido solúvel na produção de $\alpha$ -amilase pelo <i>Bacillus sp.</i> SMIA-2, crescido a 50 °C.....	38
4	Efeito das diferentes concentrações de proteínas do soro de leite na produção de $\alpha$ -amilase pelo <i>Bacillus sp.</i> SMIA-2, crescido a 50 °C.....	40
5	Efeito das diferentes fontes de nitrogênio na atividade da $\alpha$ -amilase produzida pelo <i>Bacillus sp.</i> SMIA-2, crescido a 50 °C por 24 horas.....	42
6	Efeito das diferentes temperaturas no cultivo do <i>Bacillus sp.</i> SMIA-2 para produção de $\alpha$ -amilase.....	44
7	Efeito dos diferentes valores de pH no início do cultivo do <i>Bacillus sp.</i> SMIA-2 crescido a 50 °C, para produção de $\alpha$ -amilase.....	45

## LISTA DE FIGURAS

1	Classificação das enzimas amilolíticas.....	10
2	Crescimento e atividade da $\alpha$ -amilase secretada por <i>Bacillus</i> sp. cepa SMIA-2, cultivado em amido solúvel (5 g/L) e proteínas do soro de leite (0,5 g/L) por 48 horas a 50 °C.....	34
3	Produção de açúcares redutores a 60 °C (a) e 70 °C (b) a partir de diversos amidos.....	47
4	Crescimento e atividade da $\alpha$ -amilase produzida pelo <i>Bacillus</i> sp. cepa SMIA-2, crescido por 48 horas a 50 °C.....	63
5	Efeito do pH na atividade (□) e estabilidade (■) da $\alpha$ -amilase parcialmente purificada produzida pelo <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2.....	64
6	Efeito da temperatura na atividade (■) e estabilidade (□) da $\alpha$ -amilase liofilizada, produzida pelo <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2.....	65
7	Estabilidade térmica da $\alpha$ -amilase em presença (■) ou ausência de íons $\text{Ca}^{2+}$ (□), incubada à temperatura de 90 °C.....	67
8	Efeito de diferentes íons metálicos na atividade da $\alpha$ -amilase parcialmente purificada produzida pelo <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2.....	69

9	Efeito da concentração de NaCl na atividade da $\alpha$ -amilase liofilizada, produzida pelo <i>Bacillus</i> sp. espécie SMIA-2, durante 2 horas de incubação a 45 °C.....	70
10	Efeito de alguns inibidores e agentes oxidantes, em diferentes tempos, na atividade da $\alpha$ -amilase.....	71
11	Compatibilidade da $\alpha$ -amilase de <i>Bacillus</i> sp. espécie SMIA-2 com detergentes comerciais.....	72
12	Estabilidade da $\alpha$ -amilase, produzida por <i>Bacillus</i> sp. espécie SMIA-2, em detergentes comerciais. (♦Ariel <sup>®</sup> , ■Biz <sup>®</sup> , ▲Cheer <sup>®</sup> , ×Tide <sup>®</sup> , ■Campeiro <sup>®</sup> , ●Omo <sup>®</sup> ).....	73

## RESUMO

CARVALHO, Raquel Vieira de; D.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; fevereiro, 2007; Produção e caracterização de  $\alpha$ -amilase por *Bacillus* sp. SMIA-2 termofílico utilizando proteínas do soro de leite, e algumas aplicações da enzima; Orientadora: Meire Lelis 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 da enzima  $\alpha$ -amilase pelo termofílico *Bacillus* sp. cepa SMIA-2 e avaliar algumas de suas características. A produção de  $\alpha$ -amilase por esse microrganismo, cultivado em meio líquido contendo baixa concentração de amido como fonte de carbono e suplementado com 0,5 g/L de proteínas soro de leite e 2 g/L de peptona, alcançou o máximo em 32 horas com níveis de 37 U/ml. O microrganismo foi capaz de utilizar uma grande variedade de fontes de carbono, porém a atividade da amilase variou em cada uma delas. O amido foi a melhor fonte de carbono neste estudo para a secreção da amilase, enquanto a sacarose, lactose, maltose, galactose e glicose não foram efetivas. Uma redução na concentração de amido de até 2,5 g/L, no meio de cultura, melhorou o crescimento do organismo e a atividade da enzima, visto que, em altas concentrações de amido, a produção da enzima foi comparativamente menor. Tendo em vista a quantidade de proteínas do soro de

leite no meio de cultivo, a concentração de 0,25 g/L foi considerada a mais efetiva para a secreção da  $\alpha$ -amilase pelo microrganismo. As fontes orgânicas de nitrogênio foram encontradas como as melhores para a produção da amilase, sendo a peptona (2 g/L) a melhor. A produção máxima de atividade enzimática pelo *Bacillus* sp. SMIA-2 foi observada quando o microrganismo foi crescido a temperatura de 50 °C e pH 8,5. Estudos sobre a caracterização da amilase revelaram que a temperatura ótima desta enzima foi 90 °C. A enzima foi estável por 1 hora a temperaturas de 40 °C e 50 °C enquanto a 90 °C, 66% da atividade máxima foi perdida. Entretanto, na presença de 5 mM de CaCl<sub>2</sub>, a enzima foi estável a 90 °C por 30 minutos e manteve cerca de 58% de sua atividade residual por 1 hora. O pH ótimo da enzima encontrado foi 8,5. Após a incubação da enzima por 2 horas em pH 9,5 e 11,0, foi observado um decréscimo de aproximadamente 6,3% e 16,5% da atividade original. Em pH 6,0, a enzima perdeu cerca de 36% de sua atividade original. A enzima foi fortemente inibida por Co<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Ba<sup>2+</sup> e Mn<sup>2+</sup>, porém pouco afetada por Mg<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup>, Zn<sup>2+</sup> e K<sup>+</sup>. Na presença de 2,0 M de NaCl, 63% da atividade da amilase foi mantida após 2 horas de incubação a uma temperatura de 45 °C. A amilase exibiu atividade acima de 70% quando incubada por 1 hora a 50 °C em presença de dodecil sulfato de sódio (SDS). Entretanto, uma baixa atividade residual foi obtida na presença do hipoclorito de sódio e uma completa inibição quando a enzima foi incubada em peróxido de hidrogênio. A compatibilidade da amilase produzida pelo *Bacillus* sp. SMIA-2 em relação a alguns detergentes comerciais mostrou que a enzima manteve 86%, 85%, e 75% da atividade após 20 minutos de incubação a 50 °C na presença dos detergentes Omo<sup>®</sup>, Campeiro<sup>®</sup> e Tide<sup>®</sup>, respectivamente.

## ABSTRACT

CARVALHO, Raquel Vieira de; D.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; February, 2007; Production and characterization of an  $\alpha$ -amylase from thermophilic *Bacillus* sp. SMIA-2 from whey protein and some applications of enzyme; Adviser: Meire Lelis Leal Martins.

This work was carried out at the Food Technology Laboratory of the Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), Campos dos Goytacazes–RJ, with the objective of studying the production of  $\alpha$ -amylase from thermophilic *Bacillus* sp. strain SMIA-2 and to evaluate some features.  $\alpha$ -Amylase production by microorganism cultivated in liquid cultures containing low starch concentration as a carbon source and supplemented with 0.5 g/L whey protein and 2 g/L peptone reached a maximum at 32 h, with levels of 37 U/ml. The microorganism was capable of utilizing a wide range of carbon sources, but activity of amylase varied with each carbon source. Starch was the best carbon sources in the present study for amylase secretion, while lactose, maltose, sucrose, galactose, and glucose were not very effective. Decreasing starch concentration in the medium until 2.5 g/L, improved the growth of the organism and the enzyme activity. At higher starch concentrations, enzyme production was comparatively lower. Regarding the amounts of whey protein in the medium, the concentration 0.25 g/L was considered the most effective for amylase secretion by

the organism. Among the various organic and inorganic nitrogen sources, peptone (2 g/L) was found to be the best. The maximum production of amylase activity by *Bacillus* sp SMIA-2 was observed at 50 °C and pH 8.5. The enzyme was able to degrade all the starches tested. Studies on the amylase characterization revealed that the optimum temperature of this enzyme was 90 °C. The enzyme was stable for 1 h at temperatures ranging from 40 °C – 50 °C while at 90 °C, 66% of its maximum activity was lost. However, in the presence of 5 mM CaCl<sub>2</sub>, the enzyme was stable at 90 °C for 30 min and retained about 58% residual activity after 1 h. The optimum pH of the enzyme was found to be 8.5. After incubation of enzyme for 2 h at pH 9.5 and 11.0 was observed a decrease of about 6.3% and 16.5% of its original activity. At pH 6.0 the enzyme lost about 36% of its original activity. The enzyme was strongly inhibited by Co<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Ba<sup>2+</sup> and Mn<sup>2+</sup>, but less affected by Mg<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup>, Zn<sup>2+</sup> and K<sup>+</sup>. In the presence of 2.0 M NaCl, 63% of amylase activity was retained after 2 h incubation at 45 °C. The amylase exhibited more than 70% activity when incubated for 1 h at 50 °C with sodium dodecyl sulphate (SDS). However, very little residual activity was obtained with sodium hypochlorite and with hydrogen peroxide the enzyme was completely inhibited. The compatibility of *Bacillus* sp. SMIA-2 amylase with certain commercial detergents was shown to be good as the enzyme retained 86%, 85% and 75% of its activity after 20 min incubation at 50 °C in the presence of the detergent brands, Omo<sup>®</sup>, Campeiro<sup>®</sup> and Tide<sup>®</sup> respectively.

## 1. INTRODUÇÃO

As enzimas são catalisadores biológicos, versáteis, que apresentam várias propriedades que as tornam atrativas em processos de biotransformações. Sua aplicação na indústria é objeto de muitas investigações, devido à alta atividade catalítica em comparação com os catalisadores convencionais, e por atuarem com alta eficiência em condições reacionais amenas. Atualmente, as enzimas são usadas comercialmente em indústrias de alimentos, bebidas, farmacêutica, papel e celulose, têxtil, detergentes, entre outras.

As enzimas podem ser encontradas em células de tecidos animais e vegetais bem como em microrganismos, sendo que nestas últimas tornam-se uma opção particularmente atrativa, devido a razões como ampla disponibilidade, custo de produção relativamente baixo, condições suaves de síntese, ampla especificidade pelo substrato, diferentes características físico-químicas e suscetibilidade de manipulação genética.

As enzimas termoestáveis, obtidas de microrganismos termofílicos, vêm sendo investigadas em função, principalmente, das indústrias de base biotecnológica emergentes. Essas enzimas têm trazido diversas vantagens para a indústria, pois atuam em elevadas temperaturas reduzindo riscos de contaminação por microrganismos mesofílicos. O grande interesse por esse grupo

de microrganismos está relacionado ao seu grande potencial de aplicação nos processos industriais. Entretanto, alguns microrganismos produzem uma quantidade limitada de enzimas dificultando sua aplicação industrial. Além disso, fatores como pH, temperatura, componentes do meio de cultura como as fontes de carbono e nitrogênio, tempo de incubação, transferência de oxigênio entre outros podem comprometer a produção de enzimas. Assim, adotando-se métodos simples como a utilização de um meio de cultura específico e otimizado, é possível aumentar significativamente o rendimento enzimático.

As amilases estão entre os grupos mais importantes sob o ponto de vista biotecnológico, cujas aplicações crescem significativamente. A  $\alpha$ -amilase é uma enzima que cliva as ligações  $\alpha$ -1,4 do amido liberando unidades de glicose e dextrinas.

As  $\alpha$ -amilases produzidas por microrganismos termofílicos têm recebido uma considerável atenção da indústria por serem termorresistentes e por possuírem características importantes, como estabilidade à temperatura e ao pH. Entre as  $\alpha$ -amilases bacterianas mais importantes industrialmente estão as secretadas pelo gênero *Bacillus*.

Considerando a grande potencialidade do emprego industrial das enzimas  $\alpha$ -amilases, este trabalho teve como objetivo avaliar algumas condições para produção de  $\alpha$ -amilase pelo termofílico *Bacillus* sp. SMIA-2, isolado de amostras de solo de Campos do Goytacazes. Além disso, foram estudadas algumas propriedades bioquímicas da enzima, bem como sua compatibilidade com detergentes comerciais e sua eficiência em hidrolisar vários tipos de amido.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Importância dos microrganismos termofílicos em processos industriais

Os organismos capazes de sobreviverem em ambientes com temperaturas entre 50 °C e 110 °C são chamados de termofílicos, termofílicos extremos e hipertermofílicos. Existem espécies que foram isoladas em regiões vulcânicas continentais e submarinas, com temperaturas chegando até a 1.000 °C. São provenientes de fontes geotermiais ou mesmo de solos sob incidência de luz solar. Crescem em temperaturas entre 60 °C e 70 °C e agrupam-se em dois ramos filogenéticos: Eubactéria e Archaeabactéria (Archaea) (Woese et al., 1990). Geralmente, os chamados termofílicos moderados são bactérias primárias classificados como Eubactéria e apresentam crescimento ótimo em temperaturas que variam entre 60 °C e 80 °C (Andrade, et al., 1999; Bertoldo e Antranikian, 2002). Por outro lado, os termofílicos extremos são classificados como Archaeabactéria e crescem a temperaturas de 80 °C ou superiores (Woese et al., 1990).

Os microrganismos termofílicos apresentam mecanismos altamente especializados de adaptação e proliferação sob altas temperaturas, ao contrário de organismos que crescem em ambientes temperados, aeróbicos ou não, onde a

taxa metabólica é extensamente limitada pela temperatura (Kelly et al., 1994; Holst et al., 1997). Estudos de microrganismos termofílicos demonstraram que estes possuem proteínas que são termoestáveis e resistentes à desnaturação e proteólise (Kumar e Nussinov, 2001). A estabilidade térmica de suas proteínas tem sido atribuída à sua maior hidrofobicidade, maior enovelamento, redução dos pontos de ramificação, substituição de resíduos de aminoácidos na estrutura secundária externa, aumento nos resíduos de prolina, redução da ocorrência de resíduos termolábeis, aumento na quantidade de pontes de hidrogênio e maior formação de pontes salinas (Jaenicke e Böhm, 1998; Scandurra et al., 1998; Szilágil e Závodszky, 2000; Kumar e Nussinov, 2001).

Atualmente, a utilização de microrganismos termofílicos produtores de enzimas termoestáveis tem despertado um grande interesse biotecnológico e comercial. Isso se deve, entre outros fatores, ao fato de estes microrganismos, quando comparados aos mesófilos, possuírem uma maior velocidade de reação, apresentarem sistemas enzimáticos mais estáveis e serem capazes de catalisar reações bioquímicas em temperaturas mais elevadas (Oliveira et al., 2000). Além disso, a energia requerida para manter o sistema homogêneo é reduzida, pois, sob alta temperatura, a solubilidade da maioria dos compostos é aumentada, ocorrendo diminuição da viscosidade do meio de cultivo (Wiseman, 1985; Zamost et al., 1991; Lévêque et al., 2000; Lee et al., 2001; Asgher et al., 2007).

Cerca de mais de 200 espécies de termofílicos foram isoladas, cultivadas e, pelo menos, caracterizadas parcialmente, pertencendo a mais de 90 gêneros dos domínios Archaea e Bacteria (Amend e Plyasunov, 2001). A partir destas espécies identificadas, surgiram novas oportunidades para a descoberta de enzimas que apresentassem atividades em condições extremas de temperatura, possibilitando sua utilização em vários processos industriais onde esta condição é necessária (Hough e Danson, 1999; Andrade et al., 1999; Banerjee et al., 1999). Essas enzimas são de especial interesse biotecnológico devido a sua capacidade de atuar em condições em que enzimas produzidas por microrganismos mesofílicos são geralmente desnaturadas (Zeikus, 1979; Hough e Danson, 1999).

Dentre as bactérias termofílicas, espécies do gênero *Bacillus* constituem os maiores produtores de enzimas de ampla aplicação nas indústrias de alimentos e processamento de amido (Sarikaya et al., 2000). Nas indústrias de petróleo, química, de papel e celulose, por exemplo, as enzimas termoestáveis têm sido

utilizadas para eliminar os poluentes sulfurosos oriundos da biodegradação de determinados compostos (Haki e Rakshit, 2003), além das indústrias de detergentes, entre outras. Assim, o isolamento dessas espécies, a partir de uma variedade de ambientes, é incentivado para a obtenção de fontes de enzimas com atividades apropriadas, como amilases, lipases, proteases, xilanases e celulases utilizadas em diferentes processos industriais (Cordeiro et al., 2002; Kambourova et al., 2003; Nascimento e Martins, 2004; Asgher et al., 2007).

## **2.2. Enzimas microbianas**

O papel das enzimas é conhecido ao longo dos anos em muitos processos e, com o desenvolvimento de novas técnicas, como a purificação de enzimas, vem aumentando seu número de aplicações. Além disso, com a disponibilidade das enzimas termoestáveis, um número de novas possibilidades para processos industriais tem emergido (Haki e Rakshit, 2003).

Enzimas são proteínas presentes na natureza. Reações catalisadas por enzimas utilizando células microbianas vêm sendo empregadas ao longo da história, principalmente na fabricação de cervejas, vinhos e na panificação (Jaeger e Eggert, 2002). De uma maneira geral, as enzimas são utilizadas amplamente nos mais diversos processos industriais em razão da sua especificidade e do seu potencial catalítico. Entretanto, uma enzima adquire valor comercial somente se houver demanda ou possuir propriedades que atendam aos requerimentos técnicos e econômicos em escala industrial (Bravo et al., 2000).

As enzimas podem ser obtidas de fontes vegetais, animais e de microrganismos. Das enzimas de origem vegetal utilizadas pelas bio-indústrias destacam-se as proteases, como a papaína, bromelina e ficina, e o complexo amilolítico, malte de cereais que é utilizado na indústria cervejeira. Já as enzimas de origem animal, as de maior interesse industrial, são as pepsinas bovina e suína. Entretanto, são as enzimas microbianas que oferecem mais vantagens, como independência geográfica e sazonal, utilização de substrato barato, viabilidade da produção em larga escala em fermentador industrial, haja vista o processo fermentativo ser a fonte quase que exclusiva de obtenção de enzimas comerciais.

A seleção de cepas microbianas proporciona a produção de diversas enzimas com propriedades específicas e um aumento nos rendimentos de produção (Jaeger e Reetz, 1998; Sumerly et al., 2003). Além disso, estas enzimas são mais estáveis que seus homólogos obtidos de plantas e animais, e seu processo de produção é mais fácil e seguro (Wiseman, 1985).

O isolamento e a seleção de organismos capazes de proporcionar mudanças desejadas de um produto e expressar uma enzima com propriedades adaptadas às necessidades industriais têm sido realizados por meio da utilização de agentes mutagênicos, como radiação, luz ultravioleta e substâncias químicas, com posterior seleção daqueles que obtiveram as modificações desejadas (Nthangeni et al., 2001). Hoje, com o advento e evolução da tecnologia do DNA recombinante, as enzimas derivadas de microrganismos disponíveis para uso industrial são fontes de novos e interessantes produtos, permitindo novas aplicações, com alto ganho nos processos biotecnológicos; maior eficiência, com aumento na produção de enzimas de interesse industrial e conseqüente redução de gastos; menor necessidade de utilização de reagentes químicos perigosos, apresentando vantagens ao meio ambiente; e ainda a manipulação genética (Jaeger e Reetz, 1998; Jaeger e Eggert, 2002).

Com base no local de ação, as enzimas podem ser consideradas de dois tipos: enzimas intracelulares, com atuação dentro da célula, e enzimas extracelulares, com atuação fora da célula. As enzimas intracelulares sintetizam o material celular e também realizam reações catabólicas que suprem as necessidades energéticas da célula. Por outro lado, a principal função das enzimas extracelulares é a de executar as alterações necessárias à penetração dos nutrientes para o interior das células (Pelczar et al., 1998).

Aproximadamente 80% das enzimas produzidas por fermentação, em escala industrial, são hidrolíticas e quase todas são extracelulares (Arbige e Pitcher, 1989). Dentre as indústrias que utilizam enzimas em larga escala incluem-se as de alimentos (laticínios, processamento de amido, cervejarias e padarias), de detergentes, de couro e têxteis (Nielsen e Borchert, 2001; Kirk et al., 2002; Nielsen et al., 2003; Saxena et al., 2007).

O mercado mundial de enzimas é responsável por mais de cinco bilhões de dólares, sendo dois bilhões de dólares pertencentes ao mercado de enzimas industriais (enzimas para a indústria de alimentos e enzimas para ração animal) e

três bilhões de dólares ao de enzimas especiais (enzimas terapêuticas, enzimas para diagnósticos e enzimas para química quiral) (Bon, 2006).

As principais enzimas utilizadas industrialmente são:  $\alpha$ -amilase, glicoamilase, glicose isomerase e várias proteases. A Tabela 1, a seguir, mostra as principais indústrias consumidoras de enzimas.

Tabela 1 - Principais utilizações industriais de enzimas

<b>Indústria</b>	<b>Consumo em %</b>
Detergentes	40-45
Processamento de amido	20-25
Laticínios	12-15
Cervejarias	2-4
Suco de frutas e vinho	3-5
Panificação	1-2
Têxtil e papel	4-6
Couro	1-2
Outras	6-10

Fonte: Lima et al., 2001.

### 2.3. Amido

O amido é um dos principais componentes da maioria dos vegetais. Entre os vegetais amiláceos mais usados na alimentação humana, destacam-se os cereais, como arroz, milho e trigo, os tubérculos e as raízes, como a batata, mandioca, cará e as leguminosas (Cruz e Ciacco, 1980).

O amido é um hidrato de carbono, composto por carbono, hidrogênio e oxigênio, de fórmula geral,  $(C_6H_{10}O_5)_n$ . As unidades de glicose estão ligadas entre si pelo carbono 1 ( $C_1$ ) e carbono 4 ( $C_4$ ) através do oxigênio formando uma ligação glicosídica (Sumerly et al., 2003).

O grânulo de amido natural é essencialmente constituído de dois polissacarídeos, a amilose e a amilopectina. A proporção destes polissacarídeos no grânulo é controlada geneticamente, existindo, hoje em dia, plantas desenvolvidas pelo homem com maior ou menor proporção de um destes componentes. Além dos polissacarídeos, o grânulo de amido contém compostos

nitrogenados, lipídeos e minerais que, apesar de estarem presentes em baixas concentrações, podem ter uma influência marcante nas propriedades do amido (Cruz e Ciacco, 1980).

Os grânulos de amido são insolúveis em água fria. A água, quando penetra nas áreas amorfas do grânulo, forma ligações de hidrogênio com os grupos hidrofílicos livres da molécula do amido. A força de ligação do hidrogênio é do tipo fraca, mas o número de ligações no grânulo é tão alto que impede sua dissolução (Sumerly et al., 2003). Quando a temperatura da suspensão é maior que a força de ligação de hidrogênio, o grânulo de amido começa a inchar irreversivelmente, e ocorre a gelatinização. Esta propriedade depende da origem do amido e determina seu aproveitamento em um processamento específico. O comportamento do amido pode, entretanto, ser alterado através da introdução de determinados compostos na sua estrutura ou por meio de tratamentos físicos. Durante a gelatinização, ocorre a formação de ligações entre moléculas de água e grupamentos hidroxilas liberados pela entrada de água (Sumerly et al., 2003). A gelatinização de um amido é o primeiro passo para o processo de hidrólise, pois a atuação das enzimas sobre o amido na forma granular ocorre muito lentamente.

O amido é largamente utilizado na indústria alimentícia, sendo empregado na produção de hidrolisados que funcionam como adoçantes em refrigerantes e doces, e como espessantes em alimentos semi-sólidos, estabilizantes, agentes gelificantes, diluentes, entre outros. Cerca de um terço da produção de amido é utilizado em outros tipos de indústria, principalmente as indústrias de papel, tecido e embalagens, que utilizam o amido como aglutinante de fibras e como adesivo. Entretanto, o maior uso do amido processado é para produção de glicose, a qual pode ser subseqüentemente convertida por fermentação em etanol, gás, hidrogênio e antibiótico; por isomerização em frutose; e por hidrogenação química, em sorbitol (Bigelis, 1993).

Os amidos são facilmente hidrolisados por ácidos, mas a aplicação de biocatalisadores nestes processos tem conduzido ao uso de enzimas em substituição aos produtos químicos na produção de uma variedade de produtos à base de glicose (Guzmán-Maldonado e Paredes-López, 1995).

## 2.4. Enzimas amilolíticas ou amilases

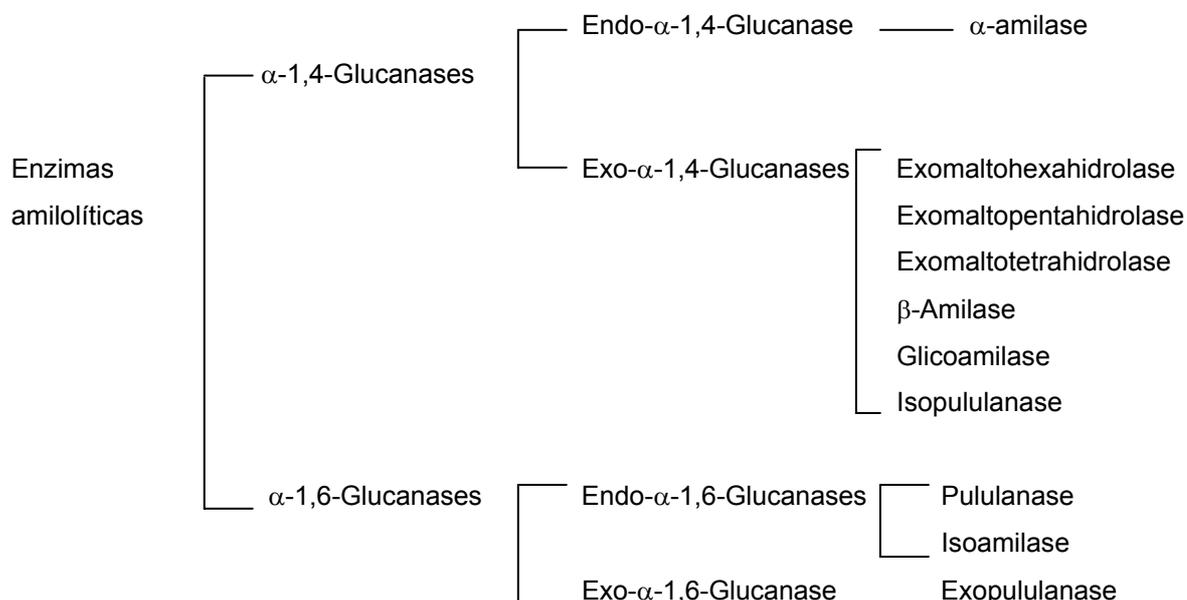
As amilases são um dos mais importantes e antigos grupos de enzimas industriais com aplicações em diferentes ramos industriais, como alimentos, têxtil, química, farmacêutica e detergentes (Nielsen e Borchert, 2001; Kirk et al., 2002; Surmely et al., 2003; Gupta et al., 2003; Szakacs, 2004; Demirkan et al., 2005; Soccol et al., 2005; Pandey et al., 2005). Sua produção teve início no começo do século passado em decorrência do interesse industrial da produção de glicose a partir de materiais amiláceos. O pesquisador Takamine desenvolveu o primeiro método para a produção microbiológica, em grande escala, da enzima  $\alpha$ -amilase fúngica, denominada Takadiastase, citado por Soccol et al. (2005). Desde então, as técnicas e os processos utilizados para este fim foram aprimorados.

As enzimas amilolíticas são responsáveis por 25-33% da produção mundial de enzimas, vindo em segundo lugar, após as proteases (Nguyen et al., 2002). Dentre as amilolíticas, a mais importante é a  $\alpha$ -amilase, pois desempenha um papel fundamental na conversão do amido em produtos de baixo peso molecular, que podem ser utilizados por outras enzimas do mesmo grupo.

As enzimas amilolíticas compreendem as hidrolases, que hidrolisam as moléculas de amido em produtos, como dextrinas, e pequenos polímeros compostos por unidades de glicose (Gupta et al., 2003).

Conforme o seu modo de ação, as enzimas amilolíticas podem ser divididas em duas grandes categorias: as endoamilases e exoamilases. As endoamilases catalisam a hidrólise das ligações glicosídicas do tipo  $\alpha$ -1,4, de uma maneira aleatória, no interior da molécula de amido. Sua ação resulta na formação de oligossacarídeos ramificados e lineares de vários comprimentos de cadeias. Por outro lado, as exoamilases hidrolisam, sucessivamente, ligações glicosídicas a partir da extremidade não redutora das mesmas, resultando em produtos finais pequenos (Gupta et al., 2003). A Figura 1 apresenta um resumo das enzimas que degradam o amido.

Figura 1 - Classificação das enzimas amilolíticas



Fonte: Nigham e Singh, 1995.

Para a conversão eficiente do amido em compostos de baixo peso molecular, é necessária uma ação coordenada das enzimas citadas anteriormente na Figura 1. Algumas dessas enzimas são descritas a seguir em relação a sua especificidade:

As  $\alpha$ -amilases (EC 3.2.1.1,  $\alpha$ -1,4-D-glicano glicanoidrolase) correspondem a endoamilases, que atuam ao acaso ao longo da cadeia de amilose e amilopectina hidrolisando as ligações  $\alpha$ -1,4 e liberando maltoligossacarídeos. Também chamadas de enzimas dextrinizantes, estas enzimas são divididas em duas categorias, de acordo com o grau de hidrólise do substrato:  $\alpha$ -amilases sacarificantes, que hidrolisam 50 a 60% do amido produzindo glicose e maltose, e as liquidificantes, que quebram cerca de 30 a 40% do substrato produzindo, predominantemente, maltoligossacarídeos, sendo responsáveis pela rápida redução da viscosidade do amido em comparação com as primeiras (Declerck et al., 2000).

As  $\beta$ -amilases (EC 3.2.1.2,  $\alpha$ -1,4-D-glicano-maltoidrolase) são exoenzimas que hidrolisam a penúltima ligação  $\alpha$ -1,4, a partir da extremidade não redutora da molécula de amilose, separando-a em duas unidades de glicose, por inversão, na forma de  $\beta$ -maltose (Harger, 1982). Esse tipo de amilase está

distribuído nos tecidos das plantas onde hidrolisa amido em  $\beta$ -maltose, sendo particularmente abundante em soja, trigo e cevada, principalmente durante a germinação.

As glicoamilases (EC 3.2.1.3,  $\alpha$ -1,4-D-glicano-glicoidrolase) são enzimas extracelulares que rompem as ligações  $\alpha$ -1,4 e  $\alpha$ -1,6 do amido; esta última em menor velocidade, a partir da extremidade não redutora, levando à produção de glicose (Lin et al, 1993; Pandey et al., 2005). Além das frações amilose e amilopectina do amido, outras moléculas, como maltose, dextrinas e glicogênio, são hidrolisadas pela enzima. Também chamadas de enzimas de sacarificação, elas são capazes de hidrolisar completamente o amido em incubações por longos períodos. Ocorrem em muitos microrganismos, principalmente em alguns fungos (*Aspergillus*, *Rhizopus*), bactérias e trato digestivo de mamíferos (Cruz e Ciacco, 1980).

Pululanases (EC 3.2.1.4  $\alpha$ -dextrina-6-glicanoidrolase) são enzimas desramificantes que clivam 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. É a principal enzima extracelular de certas linhagens de *Aerobacter aerogenes* e, provavelmente, ocorre largamente nas bactérias que metabolizam glicanos (Cruz e Ciacco, 1980).

## 2.5. Amilases termoestáveis

A velocidade de uma reação enzimática mediada por uma enzima termofílica dobra, aproximadamente, a cada aumento de 10 °C na temperatura. Considerando que a enzima é estável a elevadas temperaturas, a velocidade de reação pode ser aumentada grandemente ao se operar a uma temperatura relativamente elevada. Conseqüentemente, a estabilidade térmica é uma característica desejável das enzimas (Janssen et al., 1994).

A resistência térmica é considerada um dos critérios mais importantes de aplicação industrial da enzima, pois a maioria dos processos requer o uso de temperaturas elevadas (Ray e Nanda, 1996). Entretanto, a utilização de altas temperaturas para a atividade de tais enzimas depende do limite de estabilidade da proteína, pois esta possui uma faixa dentro da qual a sua estrutura é mantida.

Fora desta faixa, ocorreria a desnaturação resultando uma perda de atividade. Um aumento na utilização da enzima  $\alpha$ -amilase na biotecnologia tem ocorrido devido à grande variedade de condições de atuação, tais como alta temperatura, extremo de pH e a presença de surfactantes e solventes orgânicos (Tanaka e Hoshino, 2002).

As amilases estão entre as enzimas industriais mais importantes (Van der Maarel et al., 2002; Aquino et al., 2003) e podem ser obtidas a partir de várias fontes (Pandey et al., 2000). As amilases termoestáveis são produzidas por um pequeno número de organismos mesofílicos. Porém, existe um grande interesse por organismos termofílicos como produtores de novas enzimas amilolíticas, visto que as enzimas produzidas por estes organismos são geralmente mais estáveis quando comparadas às dos mesofílicos (Forgaty e Kelly, 1980; Medda e Chandra, 1980; Krishnan e Chandra, 1983).

As amilases produzidas por microrganismos termofílicos têm recebido uma considerável atenção da indústria por serem termorresistentes e possuírem características importantes, como estabilidade à temperatura e ao pH. Entre as  $\alpha$ -amilases bacterianas mais importantes industrialmente, estão as secretadas pelo gênero *Bacillus*, destacando-se as amilases ativas em altas temperaturas produzidas por *B. amyloliquefaciens*, *B. stearothermophilus*, *B. subtilis* e *Bacillus licheniformis* (Nigan e Singh, 1995; Haki e Rakshit, 2003; Sajedi et al., 2005).

Alguns autores basearam-se na diminuição da viscosidade para a classificação das amilases. Segundo eles, as amilases liquidificantes diminuem a viscosidade do amido mais rapidamente que as sacarificantes. Estas, por sua vez, agem sobre a enzima  $\beta$ -dextrina cíclica, abrindo o anel e liberando 7 unidades de glicose, mas não possuem propriedades liquidificantes (Manning et al., 1961; Medda e Chandra, 1980).

A produção de  $\alpha$ -amilase termoestável capaz de operar em altas temperaturas é vantajosa para a conversão industrial do amido em açúcares simples (Crabb e Mitchinson, 1997). A temperatura ideal para a produção e atividade de  $\alpha$ -amilase varia com a espécie e dentro de uma mesma espécie.

As  $\alpha$ -amilases termoestáveis produzidas por *Bacillus* são amplamente utilizadas na liquefação do amido, nas indústrias de papel, têxtil, detergentes, alimentos, adesivos, química fina, farmacêutica e bioquímica. Também possuem grande aplicação na produção de combustível etanol, xarope de frutose e de

glicose (Sarıkaya et al., 2000; Van der Maarel et al., 2002; Gupta et al., 2003; Nielsen et al., 2003; Saxena et al., 2007). Entretanto, estudos têm sido necessários para aumentar sua estabilidade sob altas temperaturas (Sidhu et al., 1997; Sarıkaya et al., 2000; Peixoto et al., 2003).

## **2.6. Influência da composição e das condições de cultivo para a produção de amilases**

A aplicação industrial de enzimas pode ser dificultada devido à quantidade limitada produzida por alguns microrganismos, além dos custos dos substratos utilizados para o seu cultivo. Estima-se que cerca de 30 a 40% do custo envolvido na produção de enzimas estejam relacionados ao meio de cultura utilizado para o crescimento do microrganismo. Contudo, na maioria dos casos, adotando-se métodos simples como a utilização de um meio de cultura específico e otimizado, é possível aumentar significativamente o rendimento enzimático e reduzir os custos de produção (Kumar e Takagi, 1999; Joo e Chang, 2005).

De todos os organismos vivos, os microrganismos são os mais versáteis e diversificados em sua exigência nutricional, enquanto outros microrganismos assemelham-se aos organismos superiores na sua necessidade de compostos orgânicos complexos. Essas exigências químicas juntamente com as condições físicas devem ser fornecidas pelo meio onde o organismo se encontra, permitindo assim o seu desenvolvimento (Madigan et al., 1996; Lima et al., 2001).

As bactérias termofílicas podem ser cultivadas numa variedade de fontes de energia. Dentre os substratos, incluem-se: biopolímeros comuns, açúcares, polipeptídeos, aminoácidos, álcoois, ácidos carboxílicos, aromáticos, monóxidos de carbono e lipídios. Como todos os organismos, as bactérias requerem certa quantidade de energia para manutenção de determinados processos, como a renovação de constituintes celulares e preservação da composição iônica. Assim, em temperaturas extremas, os termofílicos têm seus requerimentos aumentados para preservar a organização espacial de componentes específicos da membrana e podem aumentar em taxas maiores do que a eficiência catalítica global (Zeikus, 1979).

Priest (1977) atribui à composição do meio de cultura o fato de alguns pesquisadores terem observado que a síntese de  $\alpha$ -amilase por *Bacillus subtilis* é

linear durante todo o ciclo de crescimento. Conforme este autor, um meio de cultura de composição pobre pode reduzir o crescimento microbiano e, conseqüentemente, as diferenças de velocidade de síntese da enzima nas diversas fases de crescimento.

### 2.6.1. Efeito das fontes de carbono

Na produção de amilases por fungos e bactérias, o efeito da fonte de carbono na indução e repressão da enzima é muito importante como fonte de regulação da biossíntese. Amido e substâncias amiláceas têm sido descritos como os substratos mais adequados para a alta produtividade de amilases (Cherry et al., 2004; Messaoud et al., 2004; Tanyldizi et al., 2005; Agrawal et al., 2005; Konsula e Liakopoulou-Kyriakides, 2007; Saxena et al., 2007), podendo ser aproveitados resíduos agrícolas ou de processamento de amido, os quais contêm quantidades residuais de amido suficientes para esse fim (Haq et al., 2003; Kunamneni et al., 2005; Djekrif-Dakhmouche et al., 2006; Konsula e Liakopoulou-Kyriakides, 2007).

A indução e a repressão catabólicas são os dois fatores principais que controlam a síntese da amilase em microrganismos. De acordo com Gancedo (1992), a utilização de glicose e outras fontes de carbono rapidamente metabolizáveis reprime a expressão de genes que codificam as enzimas relacionadas ao metabolismo de outras fontes de carbono.

A produção de  $\alpha$ -amilase em muitas espécies de *Bacillus* também está sujeita à repressão catabólica pela glicose e outros substratos, como a xilose e a frutose, que podem reprimir a sua produção (Gupta et al., 2003; Bernhardsdotter, et al., 2005).

De fato, há uma tendência de polissacarídeos, como amido solúvel, dextrina e glicogênio, proporcionarem uma maior produção da enzima por microrganismos do gênero *Bacillus* do que mono ou dissacarídeos, como glicose, frutose, lactose, galactose e sacarose. Não se sabe, no entanto, se nesses casos são os polissacarídeos adicionados ao meio de cultura em si, ou se são seus produtos de degradação ou metabólitos formados durante a fermentação que estimulam a síntese da enzima (Tsuchiya et al., 1975).

Quando as  $\alpha$ -amilases são sintetizadas na presença de carboidratos contendo ligações glicosídicas do tipo  $\alpha$ -1,4, são consideradas indutivas. A síntese dessas enzimas também pode ser constitutiva; neste caso, o microrganismo é capaz de sintetizá-la quando a única fonte de carbono é a glicose (Ray e Nanda, 1996).

Muitas pesquisas avaliam a indução de  $\alpha$ -amilase em presença de amido, maltose, lactose, trealose e  $\alpha$ -metil-D-glicosídeo. Porém, o uso do amido e, ou, as fontes de carbono amiláceas são os principais substratos para a sua produção (Gupta et al., 2003).

Saxena et al. (2007), estudando o efeito de diferentes fontes de carbono sobre a produção de  $\alpha$ -amilase por *Bacillus* sp. PN5, verificaram que o amido induziu fortemente a síntese da enzima enquanto que a frutose e glicose inibiram sua produção. Resultado semelhante foi encontrado por Teodoro e Martins (2000) e Lin et al. (1998) em *Bacillus* sp. e *Bacillus* sp. TS-23, respectivamente. A secreção de amilases no meio de cultivo quando o amido é utilizado como fonte de carbono tem sido descrita, em várias cepas de *Bacillus*, por vários autores (Santos, 2000; Cordeiro et al., 2002; Messaoud et al., 2004; Cherry et al., 2004; Agrawal et al., 2005; Tanyldizi et al., 2005; Konsula e Liakopoulou-Kyriakides, 2007).

### **2.6.2. Efeito das fontes de nitrogênio**

Muitos organismos utilizam o nitrogênio orgânico e inorgânico para produzir, principalmente, ácidos nucleicos, aminoácidos, proteínas e componentes de parede celular.

As fontes de nitrogênio orgânico têm sido descritas por vários pesquisadores como sendo as preferidas para a produção de  $\alpha$ -amilase (Pedersen e Nielsen, 2000; Jin et al., 2001; Kunamneni et al., 2005; Goyal et al., 2005; Konsula e Liakopoulou-Kyriakides, 2007).

O extrato de levedura tem sido usado em meios de cultura para a produção de  $\alpha$ -amilase em *Streptomyces* sp. (McMahon et al., 1999), *Bacillus* sp. IMD 435 (Hamilton et al., 1999) e *Hadomonas meridiana* (Coronado et al., 2000). Também tem sido usado conjugado com outras fontes de nitrogênio, como a peptona em *Bacillus* sp. (Tanyldizi et al., 2005; Cordeiro et al., 2002, Santos,

2000), as bactopeptona no caso de *Bacillus* sp. IMD 434 (Hamilton et al., 1999), mostrando aumentar a atividade enzimática. Em contrapartida, vários sais inorgânicos, tais como sulfato de amônio, nitrato de amônio, têm sido relatados para a melhor produção de  $\alpha$ -amilase por fungos e alguns tipos de bactérias como em *Bacillus subtilis* (Dercova et al., 1992; Gupta et al., 2003).

### 2.6.3. Importância do cálcio e outros metais na estabilidade de $\alpha$ -amilase

Os íons metálicos possuem uma variedade de funções nas proteínas. Esses íons podem estar diretamente envolvidos no processo catalítico durante a reação enzimática ou podem participar nas reações de transferência de elétrons ou reações redox (Nazmi et al., 2006).

A estabilização de algumas enzimas pode ser induzida, principalmente, por íons divalentes como  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ . Estes íons, usados em baixas concentrações, podem estabilizar a estrutura terciária da proteína promovendo a formação de ligações cruzadas, que conferem a ela uma maior estabilidade (Tomazic, 1991).

Diversos íons metálicos têm sido estudados com o objetivo de aumentar a atividade e a estabilidade térmica das amilases, porém, íons metálicos, principalmente, de metais pesados são fortes inibidores de  $\alpha$ -amilase. O íon magnésio ( $\text{Mg}^{2+}$ ) é um elemento importante na produção de  $\alpha$ -amilase, apresentando um aumento da produção da enzima na sua presença. Sódio ( $\text{Na}^+$ ) e magnésio ( $\text{Mg}^{2+}$ ) mostraram ser ativadores da produção da enzima por *Bacillus* sp. Potássio ( $\text{K}^+$ ), sódio ( $\text{Na}^+$ ), ferro ( $\text{Fe}^{2+}$ ), manganês ( $\text{Mn}^{2+}$ ), molibdênio ( $\text{Mo}^{2+}$ ), cloreto ( $\text{Cl}^-$ ) e sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) não apresentaram efeito sinérgico, enquanto o cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) foi inibidor para a produção de amilase por *A. oryzae* (Gupta et al., 2003). Entretanto, certas amilases não requerem obrigatoriamente nenhum tipo de íon metálico divalente para a atividade, e nem são estimuladas na presença desses íons (Yang e Liu, 2004; Najafi et al., 2005).

Vários íons metálicos têm sido utilizados com o objetivo de aumentar a atividade e termoestabilidade das amilases. Os íons cálcio têm um importante papel na manutenção da atividade enzimática e na integridade estrutural das amilases, em várias espécies de *Bacillus* (Konsula e Liakopoulou-Kyriakides,

2004; Sodhi et al., 2005; Demirkan et al., 2005; Goyal et al., 2005; Djekrif-Dakhmouche et al., 2006).

A enzima  $\alpha$ -amilase é uma metaloproteína que contém pelo menos um íon  $\text{Ca}^{2+}$  (Vallee et al., 1959). A afinidade da  $\alpha$ -amilase por  $\text{Ca}^{2+}$  é mais forte do que por qualquer outro íon. As amilases de diferentes origens se diferenciam pela força de ligação com o cálcio. Segundo Bruchmann (1980), tem sido demonstrado que as  $\alpha$ -amilases privadas deste íon não possuem atividade, ou então, possuem baixa atividade. A remoção do cálcio pode levar à queda da atividade enzimática e aumentar a susceptibilidade da enzima à degradação proteolítica (Saboury e Karbassi, 2000).

O cálcio não influi somente na atividade da enzima como também aumenta sua estabilidade frente a trocas de temperatura e de pH. Portanto, o cálcio não participa diretamente na formação do complexo enzima-substrato, mas mantém a molécula da enzima na conformação ótima para a máxima atividade e estabilidade (Lévêque et al., 2001).

Na prática, é importante a presença de cálcio para garantir que a enzima permaneça completamente ativa. Na verdade, traços de cálcio presentes no amido são geralmente suficientes para compensar as enzimas, sem a necessidade de adicioná-lo. Entretanto, a adição de sais de cálcio é recomendada para alcançar máxima proteção das enzimas contra desnaturação pelo calor (Lévêque et al., 2001).

Em contrapartida, diversos pesquisadores verificaram que o  $\text{Ca}^{2+}$  não tem nenhum efeito sobre a atividade da  $\alpha$ -amilase, ou ainda pode ter um efeito inibitório quando utilizado em altas concentrações. Alguns estudos mostram também que a estabilidade da  $\alpha$ -amilase é comprometida na presença de pequenas quantidades deste íon (Yang e Liu, 2004; Bernhardsdotter et al., 2005; Hashim et al., 2005).

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

Vários resíduos agroindustriais são usados como fontes alternativas de substratos para a produção de enzimas, devido à disponibilidade local e por representarem uma fonte alternativa de baixo valor comercial, principalmente

quando o objetivo é a produção dessas enzimas em larga escala (Bocchini et al., 2005; Hernandez et al., 2006).

De modo geral, a preocupação em relação à utilização mais eficiente de resíduos agroindustriais vem aumentando a cada ano. 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., 2000; Dey et al., 2001; Haq et al., 2003; Kunamneni et al., 2005; Konsoula e Liakopoulou-Kyriakides, 2007). O soro de leite, um resíduo altamente rico em proteínas, tem sido utilizado por diversos pesquisadores com diferentes objetivos em processos biotecnológicos (Bajpai e Bajpai, 1989; Romero et al., 2001; Nascimento e Martins, 2004; Ustáriz et al., 2004; Wu et al., 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 (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 disposição 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 soro de leite é um produto de composição química definida, cujas concentrações, de seus diversos componentes, variam consideravelmente de acordo com o produto do qual é derivado, como o queijo ou caseína, bem como do seu processo de obtenção. Logo, diferentes tipos de queijo produzem diferentes tipos de soro (Knipschildt e Andersen, 1994). As diferenças na matéria-prima, assim como as diferenças nos sistemas de processamento, podem originar variações nas propriedades funcionais e nutricionais do soro.

Com base nestas características, os produtos do soro podem ser classificados em 7 categorias: soro doce em pó, soro ácido em pó, soro com baixo teor de lactose, soro desmineralizado, concentrado de proteínas do soro, isolado de proteínas do soro e lactose (Scott, 1989).

Em geral, pode-se dizer que o soro é altamente rico em proteínas, respondendo por 20% das proteínas encontradas no leite. Dessas, as mais abundantes são a  $\beta$ -lactoglobulina (50%),  $\alpha$ -lactoalbumina (12%), as imunoglobulinas (10%), albuminas (5%) e peptonas (0,23%) (Siso, 1996).

O soro apresenta um elevado poder poluente devido à presença de proteínas, gordura, lactose e sais minerais (Scott, 1989). Sua demanda biológica de oxigênio varia de 30.000 a 50.000 miligramas de oxigênio por litro de soro, valor aproximadamente 100 vezes maior ao do esgoto doméstico (Knipschildt e Andersen, 1994). Considerando-se a alta produção de queijo no Brasil, sabe-se que, para a fabricação de um quilo de queijo, são necessários dez litros de leite, levando à produção de oito a nove litros de soro. Se a produção de queijo está em torno de 450 mil toneladas por ano, a quantidade de soro de queijo corresponde a 4.050.000 toneladas. O descarte deste volume de soro sem um tratamento eficiente não é só um crime previsto por lei, mas também significa rejeitar um alimento de alto valor nutricional. As proteínas de soro possuem um dos mais altos índices de valor biológico em comparação com outras fontes de proteínas (Santos e Ferreira, 2001).

O soro é uma fonte econômica de proteína que oferece uma série de benefícios funcionais em inúmeras aplicações alimentícias (solubilidade, viscosidade, emulsificação, gelificação, entre outros) e, apesar disso, é descartado. Muitos autores sugerem a utilização desse subproduto para produção de enzimas microbianas, encontrando resultados favoráveis na produtividade enzimática (Feijoo et al., 1999; Romero et al., 2001; Ustáriz et al., 2004; Nascimento, 2005; Eissa e Khan, 2006; Mota et al., 2006).

## **2.8. Aplicação industrial de amilases**

As amilases estão entre as mais importantes enzimas hidrolíticas utilizadas nas indústrias de amido. Hoje em dia, elas são aplicadas em vários segmentos industriais, como em indústrias de alimentos, detergentes, indústrias têxteis e de papéis, com maior aplicação na indústria de amido. Neste sentido, as amilases microbianas substituíram completamente a hidrólise química na indústria de processo de goma (Gupta et al., 2003). Com o advento de novas fronteiras

biotecnológicas, a gama de aplicações de  $\alpha$ -amilase tem também se expandido para áreas medicinais e química fina e farmacêutica.

O maior mercado para a aplicação das  $\alpha$ -amilases está na produção de amido hidrolisado na forma de glicose e frutose. O amido é convertido em xarope de milho com alto teor de frutose. Devido a sua alta propriedade adoçante, a glicose e a frutose são usadas como adoçantes na indústria de refrigerantes. O processo de liquefação do amido requer o uso de  $\alpha$ -amilase juntamente com a glicoamilase que necessariamente devem apresentar elevada termoestabilidade. O uso destas enzimas na liquefação do amido tem sido amplamente estudado e comentado (Pandey et al., 2000; Van der Maarel et al., 2002).

Na indústria de panificação, as amilases proporcionam melhor coloração, volume e textura do miolo de pães. O emprego dessas enzimas na preparação do pão pode retardar o processo de envelhecimento, mantendo o pão “fresco” por mais tempo. A  $\alpha$ -amilase fúngica confere maior potencial fermentativo, já a amiloglicosidase confere melhora do sabor e aroma de pães e também proporciona crosta com melhor coloração (Novozymes, 2005). De acordo com Cruz e Ciacco (1980), as enzimas  $\alpha$  e  $\beta$ -amilases atuam sobre a farinha de trigo, mais especificamente sobre as moléculas de amido. Estas enzimas aceleram o processo de fermentação, promovendo a hidrólise do amido, que gera dextrinas, maltose e glicose; dessa forma, ocorre a redução da viscosidade da massa de pão, acelerando o processo de fermentação e, conseqüentemente, a liberação de gás carbônico, um dos metabólitos produzidos durante a fermentação pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*, como também em processos de fermentação natural (Quaglia et al., 1991).

Durante a germinação da cevada para a produção de malte, que constitui um dos ingredientes para a produção de cerveja, são produzidas enzimas amilolíticas, que são importantes durante a fermentação. As amilases degradam as frações de amilose e amilopectina do amido em uma mistura de maltose, maltotriose, maltotetraose, maltopentaose e dextrinas, importantes para a fermentação da cerveja pelas leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces carlsbergensis* (Reed, 1975; Wainwright, 1995). As amilases fúngicas, na indústria cervejeira, convertem substratos amiláceos a açúcares antes da fermentação alcoólica, além de controlarem a turbidez devido ao amido presente, são utilizadas na produção de cervejas livres de dextrinas

(denominadas cervejas de baixa caloria ou cervejas *light*) (Wainwright, 1995). Conforme Ward (1989), nas cervejas tradicionais, de um terço a um quarto dos carboidratos do mosto encontram-se na forma de dextrinas limite, que não fermentam e permanecem no produto final. Então, a amiloglucosidase de *Aspergillus niger* hidrolisa essas dextrinas em açúcares fermentáveis, permitindo a obtenção de um mosto mais diluído, com menor conteúdo calórico e mesmo teor alcoólico que a cerveja normal.

Outro mercado para as amilases é o processo de fabricação dos cereais para alimentação infantil, tais como farinha láctea (à base de trigo), mingau de milho, arroz e misturas de cereais. As amilases são adicionadas para diminuir a viscosidade da mistura de cereais durante o processo de pré-gelatinização, facilitando o escoamento pela tubulação. De acordo com Surmely et al. (2003), a  $\alpha$ -amilase é considerada uma enzima liquidificante, porque reduz drasticamente a viscosidade de pastas gelificadas de amido. As amilases são inativadas com o aquecimento durante a etapa final do processo de secagem desses cereais, por isso são consideradas coadjuvantes tecnológicas de fabricação.

Na indústria têxtil, o uso de amilases para a quebra de amido é conhecido desde 1910 e serve para a eliminação de gomas de amido ou gomas de derivados de amido, ao invés do uso de oxidantes, ácidos ou bases, que danifica em maior proporção a celulose ao proteger as fibras. As  $\alpha$ -amilases são empregadas na degomagem de tecidos e de jeans (Novozymes, 2005), assim como são empregadas, historicamente, na limpeza de tecidos.

O uso da  $\alpha$ -amilase para a remoção da cobertura de amido usada no processamento de papel é descrito em Novozymes (2005). Como ocorre com os produtos têxteis, a cobertura do papel é feita para protegê-lo contra danos mecânicos durante o processamento, para melhorar sua apagabilidade e qualidade final (Gupta et al., 2003). A temperatura desse processo ocorre entre 45 e 60 °C. Para a reprodutibilidade dos resultados nesse estágio, é importante que o filme de amido possua viscosidade constante, podendo ser variada de acordo com o tipo de papel. A viscosidade natural do amido é muito alta para a cobertura no papel, sendo ajustada pela degradação parcial do polímero com o emprego de  $\alpha$ -amilases, tanto em batelada como em processos contínuos. As condições dependem freqüentemente da fonte de amido e do uso da  $\alpha$ -amilase (Tolan, 1996).

A indústria de detergentes está em grande desenvolvimento, com destaque especial para a aplicação de enzimas como um dos ingredientes empregados em sua constituição. De um modo geral, os produtos que contêm enzimas respondem por 89% do mercado de detergentes fabricados nos Estados Unidos, Europa e Japão (Stoner et al., 2004).

No início do século XX, Röhm (1913) desenvolveu o primeiro método de lavagem de tecidos com detergentes que continham enzimas, fabricando a primeira formulação desses detergentes. A Empresa de Röhm patenteou o produto em 1913, e a preparação foi comercializada até os anos sessenta.

Os detergentes modernos apresentam um espectro de ação e utilização bastante amplo, havendo, conseqüentemente, necessidade de especialização das formulações. A substituição de produtos cáusticos, ácidos e solventes tóxicos, que agredem o meio ambiente e provocam o desgaste de materiais e de instrumentos tornou-se um grande atrativo para as indústrias de detergentes devido à preocupação crescente com o ambiente. Este fator tem levado os fabricantes a reavaliarem as formulações já existentes. O uso de enzimas, em particular as amilases, em processos industriais, satisfaz as exigências das normas de ISO 9000 e 14000 de baixo impacto ambiental, além da redução de gastos energéticos associados ao aumento da qualidade do produto (Bon, 1995).

As  $\alpha$ -amilases têm sido usadas em detergentes em pó para lavanderias desde 1975. Cerca de 90% de todos os detergentes líquidos contêm  $\alpha$ -amilase (Kottwitz et al., 1994), e a demanda por elas para uso em detergentes em lavagens automáticas tem crescido nos últimos anos. Porém, uma das limitações do emprego de  $\alpha$ -amilases em detergentes é que a enzima mostra uma sensibilidade ao cálcio, e sua estabilidade é gravemente comprometida em meio contendo este composto em pequenas quantidades. Além disso, alguns tipos de  $\alpha$ -amilase selvagem são sensíveis a oxidantes, os quais geralmente são componentes da formulação de detergentes. A estabilidade contra os oxidantes, em detergentes de uso doméstico, foi alcançada pela utilização de estratégias bem sucedidas seguidas do uso com outras enzimas, como as proteases (Gupta et al., 2003).

Ultimamente cientistas das duas maiores fabricantes de enzimas, Novozymes e Genencore International, utilizam a engenharia protéica para melhorar a estabilidade das  $\alpha$ -amilases em alvejantes (Gupta et al., 2003). Eles,

independentemente, substituíram um aminoácido sensível à oxidação por outro aminoácido. A substituição corresponde à posição 197 por leucina em amilase de *Bacillus licheniformis*, o que produz uma amilase com maior resistência contra componentes oxidantes. Isso aperfeiçoou a estabilidade de oxidação, resultando em melhor estabilidade de armazenamento e no desempenho das enzimas mutantes em alvejantes contidos na formulação de detergentes.

O uso diversificado das enzimas deve-se a sua propriedade de atuarem como biocatalisadores especializados. Devido à sua eficiência, ação específica, condições moderadas nas quais atuam e à alta biodegradabilidade, as enzimas são ferramentas importantes para uma extensiva aplicação industrial. As projeções indicam que combinações variadas de misturas de enzimas venham a substituir, cada vez mais, os componentes menos aceitáveis do ponto de vista ambiental, nas formulações de detergentes.

### 3. TRABALHOS

#### 3.1. EFEITO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO SOBRE A PRODUÇÃO DE AMILASES PELO TERMOFÍLICO *Bacillus* sp. SMIA-2 E HIDRÓLISE DE AMIDOS PELA AÇÃO DA ENZIMA

**Raquel Vieira de Carvalho, Thamy Livia Ribeiro Corrêa, Júlia Caroline Matos da Silva, Alexandre Pio Viana e Meire Lelis Leal Martins\***

\*Laboratório de Tecnologia de Alimentos, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Av. Alberto Lamego, 2000, CEP 28015-620, Campos dos Goytacazes – RJ, Brasil.

#### RESUMO

A produção de  $\alpha$ -amilase por um termofílico *Bacillus* sp. cepa SMIA-2, cultivado em meio líquido contendo baixa concentração de amido como fonte de carbono e suplementado com proteínas do soro de leite (0,5 g/L) e peptona (2 g/L), alcançou o máximo em 32 horas com níveis de 37 U/ml. O microrganismo foi capaz de utilizar uma grande variedade de fontes de carbono, porém a atividade

da amilase variou em cada fonte. O amido foi a melhor fonte de carbono, neste estudo, para a secreção da amilase, enquanto a sacarose, lactose, maltose, galactose e glicose não foram muito efetivas. Uma redução na concentração de amido em até 2,5 g/L, no meio de cultura, não alterou o crescimento do organismo e aumentou a atividade da enzima. Em altas concentrações de amido, a produção da enzima foi comparativamente menor. Em relação às fontes de nitrogênio orgânico e inorgânico, a peptona (2 g/L) foi a melhor. Considerando a quantidade de proteínas do soro de leite no meio de cultivo, a concentração de 0,25 g/L foi a mais efetiva para a secreção da  $\alpha$ -amilase pelo microrganismo. A produção máxima da atividade enzimática foi observada a 50 °C e pH 8,5. A hidrólise do amido de batata resultou num alto rendimento de açúcares redutores em comparação às outras fontes de amido. Amido solúvel e amido de mandioca ocuparam, respectivamente, a segunda e terceira posições em relação à liberação dos açúcares redutores, enquanto que a amilase estudada mostrou apenas uma ligeira afinidade pelo amido de milho. Com o aumento da temperatura da reação para 70 °C, a hidrólise dos substratos, em menor extensão, resultou em maiores quantidades de açúcares redutores.

**Palavras-chave:** amilase; *Bacillus*; proteínas do soro de leite; amido; hidrólise.

## **EFFECT OF THE CULTURE CONDITIONS ON THE PRODUCTION OF AMYLASES BY THERMOPHILIC *Bacillus* sp. SMIA-2 AND HYDROLYSIS OF STARCHES BY THE ACTION OF THE ENZYMES**

**Raquel Vieira de Carvalho, Thamy Livia Ribeiro Corrêa, Júlia Caroline Matos da Silva, Alexandre Pio Viana and Meire Lelis Leal Martins\***

\*Laboratório de Tecnologia de Alimentos, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Av. Alberto Lamego, 2000, CEP 28015-620, Campos dos Goytacazes – RJ, Brasil.

## ABSTRACT

$\alpha$ -Amylase production by thermophilic *Bacillus* sp. strain SMIA-2 cultivated in liquid cultures containing low starch concentration as a carbon source and supplemented with whey protein (0.5 g/L) and peptone (2 g/L) reached a maximum at 32 h, with levels of 37 U/ml. The microorganism was capable of utilizing a wide range of carbon sources, but activity of amylase varied with each carbon source. Starch was the best carbon sources in the present study for amylase secretion, while lactose, maltose, sucrose, galactose, and glucose were not very effective. Decreasing starch concentration in the medium until 2.5 g/L, not affected the growth of the organism and improved the enzyme activity. At higher starch concentrations, enzyme production was comparatively lower. Among the various organic and inorganic nitrogen sources, peptone (2 g/L) was found to be the best. Regarding the amounts of whey protein in the medium, the concentration 0.25 g/L was considered the most effective for amylase secretion by the organism. The maximum production of amylase activity was observed at 50 °C and pH 8.5. Potato starch hydrolysis resulted in a higher yield of reducing sugars in comparison to the other starches. Soluble and cassava starch took, respectively, the second and third position regarding reducing sugars liberation, while the amylase studied showed slightly lower affinity for corn starch. Upon increase of reaction temperature to 70 °C, the substrates hydrolysis resulted in higher levels of reducing sugars.

**Key-words:** amylase; *Bacillus*; whey protein; starch; hydrolysis.

## 1. INTRODUÇÃO

As amilases constituem um dos mais importantes grupos de enzimas industriais e têm aplicações em diferentes indústrias, como de alimentos, têxtil, química, farmacêutica e de detergentes (Nielsen e Borchert, 2001; Gupta et al.,

2003; Surmely et al., 2003; Demirkan et al., 2005; Soccol et al., 2005; Pandey et al., 2005).

As enzimas amilolíticas são responsáveis por 25-33% da produção mundial de enzimas, vindo em segundo lugar, após as proteases (Nguyen et al., 2002). Dentre as amilolíticas, a mais importante é a  $\alpha$ -amilase, pois desempenha um papel fundamental na conversão do amido em produtos de baixo peso molecular, que podem ser utilizados por outras enzimas do mesmo grupo. É desejável que a  $\alpha$ -amilase seja ativa em altas temperaturas, para a gelatinização (100-110 °C) e liquefação (80-90 °C) do amido (Sidhu et al., 1997; Sarikaya et al., 2000; Peixoto et al., 2003).

As amilases produzidas por microrganismos termofílicos têm recebido uma considerável atenção da indústria por serem termorresistentes e possuírem características importantes, como estabilidade à temperatura e ao pH. Entre as  $\alpha$ -amilases bacterianas mais importantes industrialmente, estão as secretadas pelo gênero *Bacillus*. Dentro deste gênero, *B. amyloliquefaciens*, *B. stearothermophilus*, *B. subtilis* e *Bacillus licheniformis* são as espécies mais utilizadas freqüentemente na produção comercial de  $\alpha$ -amilase (Sajedi et al., 2005). As vantagens em se usar  $\alpha$ -amilase termoestável em processos industriais incluem diminuição do risco de contaminação, aumento da taxa de difusão dos reagentes e diminuição dos custos com refrigeração externa (Lin et al., 1998).

Alguns microrganismos produzem uma quantidade limitada de enzimas, dificultando sua aplicação industrial, porém, na maioria dos casos, adotando-se métodos simples como a utilização de um meio de cultura específico e otimizado, é possível aumentar significativamente o rendimento enzimático (Kumar e Takagi, 1999). A produção industrial de enzimas é freqüentemente limitada devido aos custos dos substratos utilizados para o cultivo dos microrganismos. Estima-se que por volta de 30-40% do custo envolvido na produção de enzimas esteja relacionado ao meio de cultura utilizado para o crescimento do microrganismo. Portanto, sua otimização é de grande importância para a redução dos custos de produção (Joo e Chang, 2005).

Amido e amiláceos têm sido descritos como os substratos mais adequados para a alta produtividade de amilases (Ghosh et al., 1991; Ali e Hossain, 1991; Kilikian, 1996), podendo ser aproveitados resíduos agrícolas ou de processamento de amido, os quais contêm quantidades residuais de amido

suficientes para esse fim (Haq et al., 2003; Konsoula e Liakopoulou-Kyriakides, 2004; Djekrif-Dakhmouche et al., 2006).

Vários resíduos agroindustriais são usados como fontes alternativas de substratos para a produção de enzimas (Bocchini et al., 2005), devido à disponibilidade local e por representar em uma fonte alternativa de baixo valor comercial, principalmente quando se visa à produção destas enzimas em larga escala.

De modo geral, a preocupação em relação à utilização mais eficiente de resíduos agroindustriais vem aumentando a cada ano. Resíduos como o soro de queijo, altamente rico em proteínas, têm sido utilizados por diversos pesquisadores (Bajpai e Bajpai, 1989; Romero et al., 2001; Nascimento e Martins, 2004; Ustáriz et al., 2004; Wu et al., 2006).

Apesar de existir um bom número de trabalhos sobre a produção e as 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 variada frente a uma mesma condição de incubação, podendo produzir enzimas com propriedades diversas.

O objetivo deste trabalho foi aumentar a produção da amilase pelo termofílico, *Bacillus* sp. SMIA-2, por meio da otimização das condições do meio de cultivo, utilizando componentes de baixo custo. Foi avaliada ainda a eficiência da enzima em hidrolisar vários tipos de amido.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Microrganismo e meio de manutenção

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 da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), a partir de

amostras de solo do município de Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil.

O microrganismo foi mantido em tubos de ensaio contendo o 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).

## 2.2. Meio de crescimento

Para a produção da amilase, o seguinte meio de cultura foi utilizado (g/L de água destilada): amido solúvel – 5,0; proteínas do soro de leite – 0,5 e peptona – 2,0. Meio mínimo mineral: MgSO<sub>4</sub> – 0,5; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 0,87; KCl – 0,3g; CaCl<sub>2</sub> – 0,29 e uma solução de traços de metais (ZnO – 2,5x10<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>-4</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>; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> – 3,0x10<sup>-4</sup> e Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> – 1,0x10<sup>-3</sup>). O pH do meio foi ajustado para 7,5 com solução de NaOH, e esse meio foi esterilizado em autoclave a 121 ± 2 °C por 15 minutos.

Os componentes básicos envolvidos na constituição de proteínas do soro de leite eram (g/L): proteínas - 810; umidade - 40; gordura – 50; e sais minerais – 100.

## 2.3. Preparo do inóculo

O inóculo foi preparado ao se germinar o microrganismo em placas de Petri contendo o meio TSY. As placas foram incubadas em estufa QUIMIS (modelo Q 315 D26), a 50 °C. Após 18 horas de incubação, 5 ml do meio de crescimento foram adicionados em cada placa e as células removidas utilizando-se uma pipeta estéril. Estas células foram, então, inoculadas em frascos erlenmeyer de 250 ml contendo o respectivo meio de crescimento, com um volume de meio de 25 ml, e então, incubadas a 50 °C por 16 horas sob agitação de 180 rpm.

## **2.4. Crescimento do microrganismo**

O meio de cultura foi inoculado com 1 ml de uma cultura preparada de véspera (pré-inóculo) e incubado em incubadora horizontal TECNAL TE 420 operando a 180 rpm, à temperatura de 50 °C. A intervalos de tempo determinados, foram retirados frascos contendo amostras para determinação do crescimento, pH e atividade enzimática.

## **2.5. Medida do crescimento**

A concentração celular foi medida por turbidimetria. A turbidez do meio foi medida em espectrofotômetro SHIMADZU UV-mini 1240, utilizando comprimento de onda de 600 nm.

## **2.6. Ensaio enzimático**

As células foram removidas do meio de cultura através de centrifugação (4500 rpm por 15 minutos), a 4 °C, em uma centrífuga modelo Hermle-Z 382K, e o sobrenadante livre de células foi utilizado para a determinação da atividade da enzima.

A atividade enzimática foi determinada em amostras em triplicata, de acordo com o delineamento experimental descrito no item 2.9, pela quantificação de açúcares redutores (glicose), utilizando o método de Miller (1959).

Uma mistura, contendo 0,5 ml da preparação enzimática (sobrenadante livre de células), 0,5 ml de solução de amido 5 g/L em tampão Tris-HCl (0,05 M) pH 8,5 e mais 0,2 ml do mesmo tampão, foi incubada a 90 °C por 10 minutos. Após este período, a reação foi paralisada pela adição de 1,0 ml do reagente de Miller (1959). A mistura foi colocada em água em ebulição por 10 minutos e, em seguida, resfriada em banho de gelo. A coloração desenvolvida foi medida através de espectrofotômetro SHIMADZU UV-mini 1240, utilizando comprimento de onda de 540 nm. O mesmo procedimento foi realizado com o controle, exceto para o reagente de Miller (DNS), que foi adicionado juntamente com o sobrenadante à solução de amido 5 g/L. O teor de açúcares redutores foi determinado por meio de uma curva padrão de glicose.

Uma unidade da atividade da enzima (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1  $\mu\text{mol}$  de açúcar redutor por minuto a partir do amido solúvel, nas condições do ensaio.

## **2.7. Efeito das condições de cultivo sobre o crescimento e a atividade da amilase**

### **2.7.1. Influência da fonte de carbono**

A influência da fonte de carbono sobre o crescimento do microrganismo e a atividade da amilase foi investigada substituindo o amido solúvel do meio de cultura, descrito anteriormente no item 2.2, pelas seguintes fontes de carbono a 5 g/L: D(+) galactose, lactose, sacarose, maltose e D(+) glicose.

Os novos meios de cultivo foram preparados e autoclavados a 121 °C por 15 minutos, inoculados com 1 ml do mesmo pré-inóculo contendo amido solúvel e incubados a 50 °C sob agitação de 180 rpm, por um período de 48 horas. Em intervalos de tempo predeterminados, a densidade ótica da cultura foi registrada e a atividade da amilase dosada nos filtrados da cultura.

### **2.7.2. Efeito das concentrações de amido solúvel**

Após a obtenção dos resultados para a melhor fonte de carbono, foram investigadas diferentes concentrações de amido solúvel na atividade da enzima. Os meios foram preparados, contendo as concentrações em de 2,5; 5,0; 10,0 e 30,0 g/L de amido solúvel e esterilizados em autoclave a 121 °C por 15 minutos. Foram inoculados com 1 ml do pré-inóculo, contendo amido solúvel 5 g/L, e incubados por 72 horas a 50 °C e 180 rpm. Em intervalos de tempo predeterminados, a densidade ótica da cultura foi registrada e a atividade da amilase dosada nos filtrados da cultura.

### **2.7.3. Efeito da suplementação do meio de cultura com proteínas do soro de leite**

Depois de definidas a melhor fonte de carbono e sua respectiva concentração, o meio de crescimento foi suplementado com proteínas do soro de

leite nas diferentes concentrações: 0,25; 0,5; 0,75 e 1,0 g/L. Os meios foram preparados, esterilizados em autoclave a 121 °C por 15 minutos e inoculados com 1 ml do pré-inóculo, que continha a concentração de 0,5 g/L de proteína do soro de leite, exceto nos meios em que não havia a presença do soro de leite. Foram incubados por um período de 48 horas a 50 °C e 180 rpm. Em intervalos de tempo pré-determinados, a densidade ótica da cultura foi registrada e a atividade da amilase dosada nos filtrados da cultura.

#### **2.7.4. Influência da fonte de nitrogênio**

A influência das fontes de nitrogênio sobre o crescimento e a atividade da enzima também foi avaliada. O experimento foi conduzido cultivando-se o microrganismo no melhor meio de cultivo, acrescido individualmente com as seguintes fontes de nitrogênio (g/L):  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (10),  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (10),  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (10),  $\text{KNO}_3$  (10), peptona (1; 2; 3; 4 e 5), extrato de levedura (2), extrato de carne (2), caseína (2) e citrato de amônio (10). Os meios foram esterilizados em autoclave a 121 °C por 15 minutos; então, foram inoculados com 1 ml do pré-inóculo e incubados a 50 °C por um período de 24 horas. Após este tempo, a densidade ótica da cultura foi registrada e a atividade da amilase dosada nos filtrados da cultura.

#### **2.7.5. Influência dos parâmetros pH inicial e temperatura de incubação dos meios de cultivo na atividade amilolítica**

O efeito da temperatura de incubação do meio de cultura foi investigado cultivando-se o microrganismo no melhor meio definido, que continha meio mineral, amido solúvel (2,5 g/L), proteínas do soro de leite (0,25 g/L) e peptona (2 g/L), nas temperaturas de 42 °C, 50 °C e 55 °C. Foram inoculados com 1 ml do pré-inóculo, obtido a 50 °C, por um período de 48 horas. Em intervalos de tempo pré-determinados, a densidade ótica da cultura foi registrada e a atividade da amilase determinada nos filtrados da cultura.

Para avaliar a influência do pH inicial no meio de cultivo, na atividade enzimática, o meio foi preparado, ajustando-se o pH para que, após a esterilização, obtivessem valores de 7,0; 7,5; 8,0 e 8,5. Foram inoculados com 1,0

ml do pré-inóculo e incubados a 50 °C e 180 rpm, por um período de 48 horas. Em intervalos de tempo predeterminados, a densidade ótica da cultura foi registrada e a atividade da enzima determinada nos filtrados da cultura.

## **2.8. Hidrólise de algumas fontes de amido**

A hidrólise das seguintes fontes de amido: batata, milho, mandioca e amido solúvel, foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Mamo e Gessesse (1999), com ligeiras modificações.

A mistura da reação contendo 100 mg dos respectivos amidos, 2,0 ml da preparação enzimática (100 U/ml) e 8,0 ml de tampão Tris-HCl (50 mM) pH 8,5 foi incubada a temperaturas de 60 °C e 70 °C. A quantidade de açúcar redutor liberada foi determinada através do método de Miller (1959). Uma curva padrão de glicose com concentrações conhecidas deste açúcar foi construída medindo-se a absorvância de soluções em espectrofotômetro SHIMADZU UV-mini 1240, utilizando comprimento de onda de 540 nm.

## **2.9. Delineamento experimental**

Os experimentos foram conduzidos inteiramente casualizados com três repetições. Em cada repetição, foram feitas triplicatas de cada frasco cultivado.

Os resultados foram avaliados pela análise de variância (ANOVA) utilizando o programa SAS. O teste de Tukey foi utilizado para a comparação entre as médias do experimento.

# **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

## **3.1. Perfil do crescimento do microrganismo e atividade da amilase**

O efeito da composição do meio de cultura sobre o crescimento do microrganismo e atividade da  $\alpha$ -amilase foi avaliado cultivando-se o mesmo em

um meio mínimo mineral contendo amido solúvel (5 g/L) como única fonte de carbono, suplementado com proteínas do soro de leite (0,5 g/L) e peptona (2 g/L).

De acordo com os resultados encontrados, o *Bacillus* sp. SMIA-2 foi capaz de utilizar o amido como única fonte de carbono e energia e secretar amilase (Figura 1).

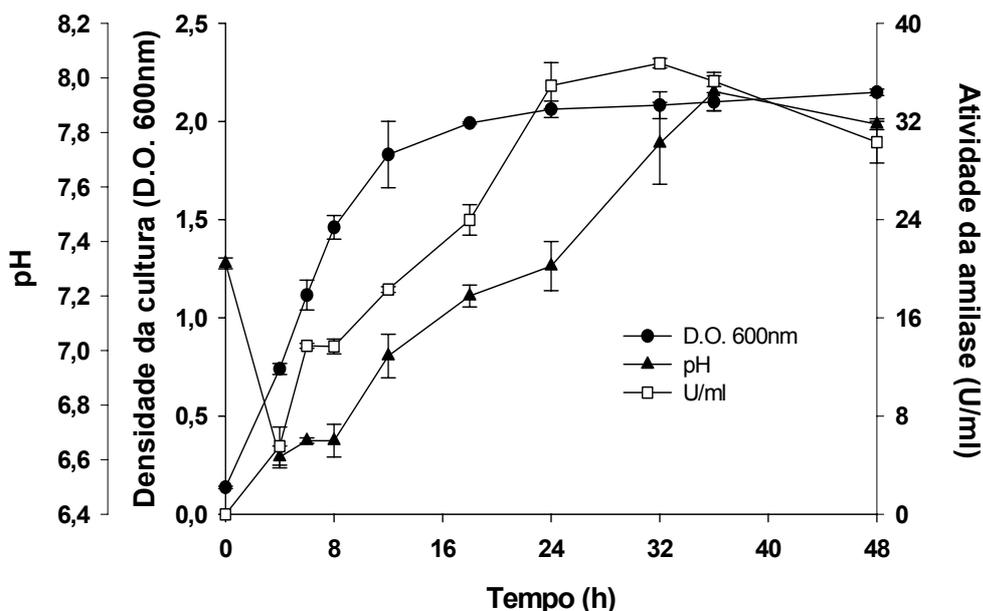


Figura 1 - Crescimento e atividade da  $\alpha$ -amilase secretada por *Bacillus* sp. cepa SMIA-2, cultivado em amido solúvel (5 g/L) e proteínas do soro de leite (0,5 g/L) por 48 horas a 50 °C. As barras representam o desvio padrão. A ausência de barras indica que o erro foi menor do que o do símbolo.

O crescimento do microrganismo foi iniciado logo após a incubação do meio de cultura; por outro lado, a secreção da amilase foi iniciada apenas depois de 4 horas de crescimento. A produção enzimática, depois de um determinado tempo de crescimento, pode estar associada à necessidade de uma massa mínima de células para que o microrganismo consiga sintetizar suas enzimas (Singh et al., 2003).

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 último tempo, a cultura entrou na fase estacionária.

A produção da  $\alpha$ -amilase iniciou-se durante a fase exponencial de crescimento, alcançando o máximo em 32 horas, com níveis de 37 U/ml.

Subseqüentemente, os níveis da enzima permaneceram mais ou menos os mesmos até 36 horas e, então, caíram para aproximadamente 30 U/ml em 48 horas.

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 síntese da enzima acompanha o crescimento microbiano e diminui a velocidade de síntese à medida que a cultura entra na fase estacionária (Bajpai e Bajpai, 1989; Stephenson et al., 1998). Na segunda, a formação da enzima é lenta durante a fase logarítmica de crescimento, seguida de um aumento da velocidade de síntese à medida que a velocidade de crescimento diminui e atinge a fase estacionária (Hamilton et al., 1999; Teodoro e Martins, 2000; Sodhi et al., 2005; Goyal, et al., 2005; Asgher et al., 2007; Konsoula e Liakopoulou-Kyriakides, 2007).

Os resultados encontrados neste trabalho estão de acordo com o segundo caso, em que a síntese da enzima é aumentada quando a velocidade de crescimento diminui e atinge a fase estacionária. A cinética da síntese da enzima mostrou ser mais do tipo associada ao crescimento do que o não-associado.

Priest (1977) atribui à composição do meio de cultura o fato de algumas pesquisas mostrarem que a síntese de  $\alpha$ -amilase por *Bacillus subtilis* é linear durante todo o ciclo de crescimento. Conforme o autor, um meio de cultura de composição pobre pode reduzir o crescimento microbiano e, conseqüentemente, as diferenças de velocidade de síntese da enzima nas diversas fases de crescimento.

Pelos resultados apresentados na Figura 1, verificou-se um pequeno decréscimo do pH no meio de cultivo com o início do crescimento microbiano, mas, um aumento novamente com o início da produção enzimática. O final da produção enzimática foi sinalizado por um ligeiro decréscimo do pH da cultura.

De acordo com Ming Chu et al. (1992), a acidificação ou alcalinização do meio, durante o crescimento de uma cultura, reflete o consumo do 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.

### 3.2. Influência da composição do meio de cultura sobre o crescimento e a atividade da amilase

#### 3.2.1. Influência da fonte de carbono

A influência da fonte de carbono sobre o crescimento do *Bacillus* sp. SMIA-2 e a produção da  $\alpha$ -amilase foi observada em meios de cultura contendo meio mineral, peptona (2 g/L) e proteínas do soro de leite (0,5 g/L) suplementado com diferentes fontes de carbono na concentração de 5 g/L, durante 48 horas de cultivo.

De acordo com os resultados encontrados, o *Bacillus* sp. SMIA-2 foi capaz de crescer satisfatoriamente em todas as fontes de carbono testadas. Por outro lado, a atividade da  $\alpha$ -amilase variou grandemente em resposta à fonte de carbono. A atividade máxima da enzima foi observada em diferentes tempos de incubação para cada fonte de carbono testada, como mostra a Tabela 1.

Tabela 1 – Efeito das fontes de carbono (5 g/L) na produção de  $\alpha$ -amilase pelo *Bacillus* sp. SMIA-2, crescido a 50 °C

Fontes de carbono	Densidade ótica	Atividade máxima da enzima (U/ml)
Glicose (36 h)	1,200 $\pm$ 0,003 <sup>c</sup>	8,299 $\pm$ 0,844 <sup>c</sup>
Galactose (48 h)	2,134 $\pm$ 0,200 <sup>a</sup>	15,265 $\pm$ 3,440 <sup>b</sup>
Maltose (48 h)	1,681 $\pm$ 0,110 <sup>b</sup>	14,909 $\pm$ 8,300 <sup>b</sup>
Lactose (24 h)	0,458 $\pm$ 0,076 <sup>d</sup>	4,589 $\pm$ 0,363 <sup>d</sup>
Sacarose (24 h)	1,543 $\pm$ 0,167 <sup>b</sup>	9,506 $\pm$ 2,975 <sup>c</sup>
Amido (32 h)	2,083 $\pm$ 0,068 <sup>a</sup>	35,283 $\pm$ 0,430 <sup>a</sup>

As médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, em 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

$\pm$  indica o desvio padrão.

Observou-se que a produção da amilase foi significativamente maior durante o crescimento do microrganismo em amido do que em glicose, com atividade de 35,283 U/ml e 8,299 U/ml, respectivamente. Resultados semelhantes foram obtidos quando outros açúcares solúveis, tais como galactose, lactose,

sacarose e maltose, foram utilizados. De acordo com Gancedo (1992), a utilização de glicose e outras fontes de carbono rapidamente metabolizáveis reprimem a expressão de genes que codificam enzimas relacionadas ao metabolismo de outras fontes de carbono.

De fato, há uma tendência de polissacarídeos, como amido solúvel, dextrina e glicogênio, proporcionarem uma maior produção da enzima por microrganismos do gênero *Bacillus* do que mono ou dissacarídeos, como glicose, frutose, lactose, galactose e sacarose. Não se sabe, no entanto, se nesses casos são os polissacarídeos adicionados ao meio de cultura em si ou se são seus produtos de degradação ou metabólitos formados durante a fermentação que estimulam a síntese da enzima (Tsuchiya et al., 1975).

Saxena et al. (2007), estudando o efeito de diferentes fontes de carbono sobre a produção de  $\alpha$ -amilase por *Bacillus* sp PN5, verificaram que o amido induziu fortemente a síntese da enzima, enquanto que a frutose e glicose inibiram sua produção. A secreção de amilases em meios de cultivo contendo amido como fonte de carbono tem sido descrita para várias cepas de *Bacillus* (Santos, 2000; Cordeiro et al., 2002; Cherry et al., 2004; Messaoud et al., 2004; Agrawal et al., 2005; Tanyldizi et al., 2005; Konsoula e Liakopoulou-Kyriakides, 2007).

### **3.2.2. Efeito das concentrações de amido solúvel na atividade da enzima**

Um estudo da influência das diversas concentrações de amido no meio mineral, contendo peptona (2 g/L) e proteínas do soro de leite (0,5 g/L), sobre o crescimento e atividade da enzima, durante 72 horas de incubação, mostrou que o microrganismo cresceu satisfatoriamente em todas as concentrações testadas. A atividade máxima da enzima foi encontrada em diferentes tempos de fermentação, como mostra a Tabela 2.

Tabela 2 - Efeito das diferentes concentrações de amido solúvel na produção de  $\alpha$ -amilase pelo *Bacillus sp.* SMIA-2, crescido a 50 °C

Concentração de amido (%)	Densidade ótica	Atividade máxima da enzima (U/ml)
0 (48 h)	1,182 $\pm$ 0,002 <sup>c</sup>	23,443 $\pm$ 4,696 <sup>d</sup>
0,25 (36 h)	2,098 $\pm$ 0,058 <sup>b</sup>	50,349 $\pm$ 0,641 <sup>a</sup>
0,5 (36 h)	2,215 $\pm$ 0,047 <sup>ab</sup>	46,550 $\pm$ 2,960 <sup>b</sup>
1 (72 h)	2,253 $\pm$ 0,046 <sup>a</sup>	30,870 $\pm$ 0,620 <sup>c</sup>
3 (72 h)	1,249 $\pm$ 0,252 <sup>c</sup>	Nd <sup>e</sup>

As médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, em 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

$\pm$  indica o desvio padrão.

Nd: valor não detectado.

Verificou-se que a concentração de 2,5 g/L de amido proporcionou uma maior atividade máxima enzimática durante 36 horas de cultivo, enquanto que, na concentração de 10 g/L, o tempo necessário para atingir sua atividade máxima foi maior, ou seja, de 72 horas de fermentação. Assim, à medida que a concentração de amido solúvel foi aumentada no meio de cultura, maior foi o tempo requerido para a  $\alpha$ -amilase alcançar sua atividade máxima. Resultados similares foram encontrados por Teodoro e Martins (2000) com *B. licheniformis*, Konsula e Liakopoulou-Kyriakides (2004) em estudos com *Bacillus subtilis*.

A secreção da amilase foi favorecida quando baixas concentrações de amido foram utilizadas no meio de cultura. Embora a atividade máxima da amilase nas concentrações de 2,5 g/L e 5 g/L de amido solúvel tenha sido observada durante o mesmo tempo de cultivo e os valores terem sido próximos, foram diferentes significativamente. Assim, a concentração de 2,5 g/L foi utilizada para os experimentos seguintes.

Verificou-se que a biossíntese da  $\alpha$ -amilase pareceu ser independente da disponibilidade de amido, obtendo níveis moderados da atividade da enzima (23 U/ml). Esses resultados são similares aos encontrados por Konsoula e Liakopoulou-Kyriakides (2004) para o *Bacillus subtilis*, em que foi encontrada atividade enzimática num meio de cultivo contendo triptona como fonte simples de carbono.

Os altos rendimentos de  $\alpha$ -amilase produzidos por bactérias são obtidos em meios de crescimento contendo materiais complexos, como amido, e não em meios artificialmente definidos (Burbidge e Collier, 1968; Nyiri, 1971). Não apenas

a falta (deficiência) das fontes de carbono pode exercer uma repressão catabólica, mas também, ao que parece, essas fontes provocam uma indução máxima na produção de  $\alpha$ -amilase. Entretanto, muitos *Bacillus* sintetizam  $\alpha$ -amilase constitutivamente. *Bacillus amyloliquefaciens* (Coleman, 1967), *Bacillus subtilis* 168 (Sekiguchi et al., 1972) e *Bacillus licheniformis* (Meers, 1972) têm sido descritos como sintetizadores da  $\alpha$ -amilase na ausência de oligossacarídeos ou substâncias com ligações  $\alpha$ -1,4.

### **3.2.3. Efeito da suplementação do meio de cultura com proteínas do soro de leite**

Os requerimentos nutricionais de muitos microrganismos termofílicos mostram-se, freqüentemente, complexos. Recentemente, a utilização de resíduos agroindustriais como substrato para a produção de enzimas têm sido utilizados, devido à disponibilidade local e por representarem uma fonte alternativa de nutrientes de baixo valor comercial, principalmente quando se visa à produção de enzimas em larga escala. Dessa forma, a produção da  $\alpha$ -amilase pelo *Bacillus* sp. SMIA-2 foi avaliada por meio da suplementação do meio de cultivo com proteínas do soro de leite.

O meio de cultura contendo 2,5 g/L de amido solúvel como fonte de carbono, 2 g/L de peptona e meio mineral foi suplementado com concentrações variadas de proteínas do soro de leite durante 48 horas de fermentação.

Pela Tabela 3 pode-se verificar que o crescimento do microrganismo não diferiu significativamente na ausência de proteínas do soro de leite em comparação com a baixa concentração da mesma (0,25 g/L). Porém, sua adição ao meio de cultivo foi primordial para a produção da enzima. Foi observado que a suplementação do meio de cultivo com proteínas do soro de leite, em todas as concentrações utilizadas, proporcionou um aumento na produção da  $\alpha$ -amilase.

Tabela 3 – Efeito de diferentes concentrações de proteínas do soro de leite na produção de  $\alpha$ -amilase pelo *Bacillus sp.* SMIA-2, crescido a 50 °C

Concentração de proteínas do soro de leite (g/L)	Densidade ótica (600 nm)	Atividade máxima da enzima (U/ml)
0 (24 h)	1,919 ± 0,093 <sup>a</sup>	35,736 ± 0,717 <sup>d</sup>
0,25 (24 h)	1,923 ± 0,070 <sup>a</sup>	61,203 ± 1,773 <sup>a</sup>
0,5 (24 h)	1,694 ± 0,019 <sup>b</sup>	55,056 ± 0,962 <sup>b</sup>
0,75 (48 h)	1,603 ± 0,061 <sup>b</sup>	48,829 ± 0,879 <sup>c</sup>
1,0 (36 h)	1,597 ± 0,138 <sup>b</sup>	50,803 ± 3,583 <sup>c</sup>

As médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, em 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

± indica o desvio padrão.

A proteína do soro de leite utilizada no meio é um resíduo que forneceu vários micro-nutrientes, além de ser uma excelente fonte de proteínas, cerca de 80%, disponibilizando nitrogênio, e assim beneficiando crescimento microbiano. Observa-se que os tempos registrados para a atividade máxima da enzima foram diferentes em cada concentração de proteína de soro de leite utilizada.

A partir dos resultados apresentados, observou-se que, no experimento em que se utilizou meio mineral suplementado com 5 g/L de amido solúvel, 2 g/L de peptona e 0,5 g/L de proteínas do soro de leite, o tempo requerido para que a enzima atingisse sua atividade máxima foi reduzido de 36 horas para 24 horas de cultivo. Isto pode ser explicado devido à redução nas concentrações de amido solúvel e proteínas do soro de leite. Essa diminuição do tempo de cultivo e redução nas concentrações desses componentes, além de terem proporcionado um aumento na atividade enzimática, representaram uma economia no processo.

Pôde-se observar uma atividade máxima da enzima de 61 U/ml quando uma concentração de 0,25 g/L desse resíduo foi utilizada no meio de cultivo. Muitos autores utilizam o soro de leite como fonte de carbono para produção de várias enzimas. Nascimento (2005) observou um aumento significativo da atividade da protease quando o *Bacillus sp.* SMIA-2 foi cultivado em meio de cultura contendo soro de leite.

Bajpai et al. (1992) utilizaram o soro de queijo e o amido como fontes de carbono para produção de  $\alpha$ -amilases por *Bacillus sp.* O meio e as condições da cultura foram otimizados para a obtenção de uma produtividade máxima da enzima, com 72 horas de cultivo em frascos agitados. Bajpai et al. (1991), em estudos com *Bacillus sp.* TCRDC-M1, verificaram um aumento nos rendimentos

de  $\alpha$ -amilase em um meio com soro de queijo suplementado com farinha de soja desengordurada e amido de milho.

#### 3.2.4. Influência da fonte de nitrogênio

Existe uma grande variedade de compostos nitrogenados que podem ser utilizados pelos microrganismos para o seu crescimento bem como para a produção de enzimas. As fontes de nitrogênio são utilizadas, principalmente, para produzir aminoácidos, ácidos nucléicos, proteínas e componentes de parede. Foi realizado o estudo do efeito das fontes de nitrogênio no crescimento do *Bacillus* sp. SMIA-2 e na atividade da  $\alpha$ -amilase, em um meio mineral contendo amido solúvel (2,5 g/L), proteínas do soro de leite (0,25 g/L) e as fontes de nitrogênio conforme descrito no item 2.7.4., durante 24 horas de fermentação a 50 °C. Os resultados encontram-se na Tabela 4.

De uma forma geral, as fontes orgânicas de nitrogênio estimularam o crescimento do *Bacillus* sp. SMIA-2 e a síntese da amilase, ao contrário das diferentes fontes inorgânicas. Entretanto, a atividade máxima da enzima em meio de cultivo contendo fosfato de amônio ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) não diferiu significativamente das com peptona (1 g/L) e extrato de levedura (2 g/L).

Em concentrações de peptona acima de 2 g/L, houve um estímulo do crescimento do microrganismo, embora o mesmo efeito não tenha sido observado para a atividade da amilase, verificando-se um decréscimo, não chegando a ser detectada na concentração de 5 g/L.

Estudos conduzidos por outros pesquisadores revelaram que as fontes orgânicas de nitrogênio foram também as melhores para o crescimento e a produção de amilases por microrganismos (Pedersen e Nielsen, 2000; Jin et al., 2001; Goyal et al., 2005; Kunamneni et al., 2005; Konsoula e Liakopoulou-Kyriakides, 2007).

Tabela 4 – Efeito das diferentes fontes de nitrogênio na atividade da  $\alpha$ -amilase produzida pelo *Bacillus sp.* SMIA-2, crescido a 50 °C por 24 horas

Fontes de nitrogênio (g/L)	Densidade ótica	Atividade máxima da enzima (U/ml)	pH
Sem nitrogênio	0,955 ± 0,013 <sup>e</sup>	29,932 ± 3,433 <sup>e</sup>	7,055 ± 0,020 <sup>f</sup>
peptona (1)	1,751 ± 0,184 <sup>bcd</sup>	29,825 ± 3,074 <sup>e</sup>	7,952 ± 0,112 <sup>e</sup>
peptona (2)	1,945 ± 0,175 <sup>abc</sup>	63,532 ± 2,820 <sup>a</sup>	8,208 ± 0,217 <sup>cde</sup>
peptona (3)	2,021 ± 0,130 <sup>ab</sup>	48,883 ± 2,859 <sup>b</sup>	8,489 ± 0,166 <sup>bcd</sup>
peptona (4)	2,052 ± 0,155 <sup>ab</sup>	17,309 ± 1,663 <sup>fg</sup>	8,744 ± 0,079 <sup>b</sup>
peptona (5)	2,120 ± 0,207 <sup>ab</sup>	Nd <sup>i</sup>	8,463 ± 0,415 <sup>bcd</sup>
extrato de carne (2)	1,951 ± 0,129 <sup>abc</sup>	40,492 ± 0,958 <sup>c</sup>	8,624 ± 0,035 <sup>bc</sup>
extrato de levedura (2)	1,737 ± 0,204 <sup>bcd</sup>	38,945 ± 4,037 <sup>cd</sup>	8,593 ± 0,086 <sup>bcd</sup>
caseína (2)	1,555 ± 0,169 <sup>cd</sup>	22,829 ± 1,800 <sup>f</sup>	8,608 ± 0,062 <sup>bc</sup>
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (10)	1,345 ± 0,201 <sup>de</sup>	33,229 ± 1,452 <sup>ed</sup>	6,878 ± 0,021 <sup>f</sup>
KNO <sub>3</sub> (10)	1,417 ± 0,173 <sup>d</sup>	19,621 ± 1,974 <sup>fg</sup>	8,174 ± 0,129 <sup>de</sup>
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> (10)	0,354 ± 0,012 <sup>f</sup>	14,145 ± 0,815 <sup>g</sup>	6,322 ± 0,042 <sup>g</sup>
citrato de amônio (10)	2,263 ± 0,047 <sup>a</sup>	7,007 ± 2,213 <sup>h</sup>	9,606 ± 0,022 <sup>a</sup>
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (10)	0,364 ± 0,026 <sup>f</sup>	Nd <sup>i</sup>	6,258 ± 0,049 <sup>g</sup>
NH <sub>4</sub> Cl (10)	0,468 ± 0,008 <sup>f</sup>	Nd <sup>i</sup>	6,270 ± 0,028 <sup>g</sup>

As médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, em 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

± indica o desvio padrão.

Nd: valor não detectado.

Santos (2000) observou um aumento na atividade da amilase secretada pelo *Bacillus sp.* quando a peptona foi utilizada em conjunto com o extrato de levedura, reduzindo ainda o tempo de cultivo.

Em trabalhos, utilizando o *Bacillus licheniformis*, Teodoro e Martins (2000) verificaram que, em meio mineral contendo amido solúvel como fonte de carbono, e cálcio, a adição de peptona (10 g/L) e extrato de levedura (5 g/L) levou a uma diminuição do tempo da fase *lag* e proporcionou um aumento no crescimento do microrganismo e da síntese da  $\alpha$ -amilase.

Os experimentos, concernentes a este trabalho, com o *Bacillus sp.* SMIA-2 foram conduzidos em frascos agitados, não permitindo assim o controle do pH. Observou-se que, em meios contendo sais de amônia, como (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, NH<sub>4</sub>Cl e NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, a atividade enzimática não chegou a ser detectada ou foi encontrada em níveis muito baixos. Além disto, pela Tabela 4, percebe-se um baixo crescimento do microrganismo e uma queda no pH. Carlsen et al. (1996) atribuem esse efeito ao fato de que a amônia é capaz de aceitar um próton, levando à acidificação

substancial do meio de cultivo quando o pH não é controlado. Essa acidificação pode causar uma redução no crescimento do microrganismo ou mesmo cessá-lo, resultando numa inativação da  $\alpha$ -amilase.

O efeito da diminuição no crescimento e queda de pH não foi verificado em meio contendo o citrato de amônio, o que é de se esperar, por ser uma fonte de carbono facilmente metabolizável, participando do metabolismo do microrganismo, como também foi verificado por Nascimento e Martins (2004).

A atividade máxima da enzima foi obtida em meio de cultura contendo 2 g/L de peptona, que exibiu valores de 63,5 U/ml. Estes resultados são satisfatórios para o estudo, pois Nascimento e Martins (2004), investigando o *Bacillus* sp. SMIA-2 em relação à produção de protease, concluíram que a atividade máxima da enzima foi obtida em meio contendo fonte de nitrogênio inorgânica, mais especificamente o nitrato de amônio ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ). Por outro lado, a peptona (2 g/L) não propiciou a atividade da protease. Dessa forma, o meio de cultura utilizado no experimento pôde evitar a produção de proteases.

### **3.2.5. Influência dos parâmetros temperatura de incubação e pH inicial dos meios de cultivo na atividade amilolítica**

De acordo com Nunes (2000), o microrganismo do presente estudo cresceu satisfatoriamente quando cultivado em meio mineral contendo glicose e extrato de levedura a temperaturas de 45 °C, 50 °C, 55 °C e 60 °C. Por outro lado, não houve crescimento neste mesmo meio a 40 °C, e a 65 °C durante 20 horas, o microrganismo cresceu muito pouco.

Um experimento, em que se variaram as temperaturas de incubação e o tempo de cultivo, foi realizado para avaliar a influência da temperatura sobre o crescimento e a atividade da  $\alpha$ -amilase, produzida pelo *Bacillus* sp. SMIA-2, em meio mineral contendo amido solúvel (2,5 g/L) e suplementado com proteínas do soro de leite (0,25 g/L) e peptona (2 g/L), durante 48 horas de cultivo. Os resultados revelaram que o microrganismo foi capaz de crescer e secretar a enzima em todas as temperaturas testadas (42 °C, 50 °C e 55 °C) como mostra a Tabela 5.

Tabela 5 - Efeito das diferentes temperaturas no cultivo do *Bacillus sp.* SMIA-2 para produção de  $\alpha$ -amilase

Temperatura (°C)	Densidade ótica	Atividade máxima da amilase (U/ml)
42 (24 h)	1,941 $\pm$ 0,003 <sup>a</sup>	20,707 $\pm$ 1,175 <sup>b</sup>
50 (24 h)	2,042 $\pm$ 0,013 <sup>a</sup>	53,203 $\pm$ 4,319 <sup>a</sup>
55 (48 h)	1,290 $\pm$ 0,080 <sup>b</sup>	19,069 $\pm$ 1,398 <sup>c</sup>

As médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, em 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

$\pm$  indica o desvio padrão.

Observou-se que o crescimento microbiano não diferiu significativamente nas temperaturas de 42 °C e 50 °C, porém um valor menor foi verificado quando incubado à temperatura de 55 °C.

A atividade máxima da enzima foi encontrada quando o microrganismo foi crescido a 50 °C, encontrando valores de atividade de 53,2 U/ml durante 24 horas de cultivo.

A atividade máxima da amilase nas temperaturas de 42 e 50 °C foi obtida durante o mesmo tempo de cultivo. Entretanto, a 55 °C, este tempo aumentou em 24 horas. Isso pode ser justificado pelo aumento na temperatura, que pode levar a um aumento na fase estacionária, o que é compreensível, visto que este microrganismo, segundo sua taxonomia molecular, pertence ao grupo dos bacilos termofílicos (Nunes, 2000).

Resultados semelhantes foram descritos por Asgher et al. (2007). Estes autores descreveram que a síntese da  $\alpha$ -amilase ocorreu a temperaturas entre 30 e 50 °C. Revelaram que o microrganismo cresceu satisfatoriamente em todas as temperaturas testadas, porém a atividade máxima da  $\alpha$ -amilase foi obtida a 50 °C. Uma redução na atividade da enzima foi observada a temperaturas superiores a 50 °C.

Recentemente, Saxena et al. (2007), estudando a produção de  $\alpha$ -amilase em *Bacillus sp.* PN5, verificaram que este microrganismo sintetizou a enzima numa faixa de temperatura entre 30 e 70 °C, exibindo uma produção máxima enzimática a 60 °C. Entretanto, mais uma vez, um aumento na temperatura acima de 60 °C levou a um decréscimo na produção da enzima. Esses resultados estão de acordo com os de Konsula e Liakopoulou-Kyriakides (2004), em *Bacillus subtilis* a 40 °C, e Lin et al. (1998), em *Bacillus sp.* TS23 a 55 °C.

A influência da temperatura na produção de amilase tem sido relacionada com o crescimento dos organismos. Uma larga faixa de temperatura (35-80 °C) tem sido descrita para o crescimento ótimo de bactérias e produção de  $\alpha$ -amilase (Lin et al., 1998; Burhan et al., 2003).

A temperatura ótima para a produção de  $\alpha$ -amilase e o crescimento de organismos pode ser diferente, isto é, os organismos podem ter uma temperatura ótima de crescimento e outra temperatura ótima de produção de enzima. Esse comportamento foi descrito por Burhan et al. (2003) em *Bacillus* sp ANT-6, Lee e Parulekar, (1993) em estudos com *Bacillus subtilis* TN106 (pAT5) e *Streptomyces* sp. IMD 267 (McMahon et al., 1997). De acordo com estes pesquisadores, uma temperatura apropriada pode estimular a produção da enzima pela célula microbiana.

O efeito do pH sobre o crescimento e a síntese da  $\alpha$ -amilase pelo *Bacillus* sp. SMIA-2 foi verificado ao se crescer o microrganismo a 50 °C por 48 horas no meio de cultivo descrito anteriormente, conforme o item 2.7.5.

A alteração do pH observada durante o crescimento dos organismos também afeta a estabilidade de produtos no meio. Muitas cepas de *Bacillus* usadas comercialmente para a produção de  $\alpha$ -amilases bacterianas por fermentação submersa têm um pH ótimo entre 6,0 e 7,0 para o crescimento e produção da enzima (Gupta et al., 2003).

De acordo com a Tabela 6, verifica-se que o microrganismo foi capaz de crescer e sintetizar a enzima em todos os valores de pH testados.

Tabela 6 - Efeito dos diferentes valores de pH, no início do cultivo do *Bacillus* sp. SMIA-2 crescido à temperatura de 50 °C, para produção de  $\alpha$ -amilase

pH inicial	Densidade ótica	Atividade máxima da amilase (U/ml)	pH
7,0 (48 h)	$1,440 \pm 4,000e^{-3}$ <sup>b</sup>	$28,883 \pm 2,150$ <sup>c</sup>	$8,518 \pm 0,128$ <sup>c</sup>
7,5 (36 h)	$1,661 \pm 0,018$ <sup>a</sup>	$34,896 \pm 0,811$ <sup>b</sup>	$8,863 \pm 0,038$ <sup>b</sup>
8,0 (36 h)	$1,702 \pm 0,010$ <sup>a</sup>	$54,776 \pm 1,056$ <sup>a</sup>	$8,960 \pm 0,029$ <sup>b</sup>
8,5 (36 h)	$1,610 \pm 9,000e^{-3}$ <sup>ab</sup>	$57,696 \pm 0,585$ <sup>a</sup>	$9,131 \pm 0,014$ <sup>a</sup>

As médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, em 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

± indica o desvio padrão.

Observa-se que a atividade máxima da amilase cresceu com o aumento dos valores de pH do meio. A atividade enzimática mais alta foi alcançada em

culturas crescendo sob valores de pH de 8,0 e 8,5, não apresentando diferença significativa. Resultados semelhantes foram encontrados por Igarashi et al. (1998) em estudos com *Bacillus* KSM-1378, que produziu  $\alpha$ -amilase com maior atividade observada em pH 8,5.

Os resultados mostraram variações de pH no meio de cultura durante a fermentação, na qual se verificou um aumento durante a produção da enzima ultrapassando os valores de 8,0. Esses resultados estão de acordo com o perfil do crescimento do microrganismo e atividade da amilase mostrado anteriormente na Figura 1, no qual o pH do meio de cultura eleva-se quando a enzima é secretada e quando a máxima atividade é atingida. Este comportamento foi verificado em todos os experimentos conduzidos, inclusive quando se variou a concentração de amido e proteínas do soro de leite (dados não mostrados).

Observou-se, ainda, que o tempo para atingir a atividade máxima da amilase foi maior no meio de cultivo com pH inicial 7,0. Isto pode ser atribuído ao fato de os demais meios de cultivo possuírem, inicialmente, valores de pH superiores a 7,0, que, neste caso, favoreceu a síntese da  $\alpha$ -amilase e, portanto, a diminuição do tempo para sua produção.

### **3.3. Hidrólise de algumas fontes de amido**

Com base em trabalhos publicados e devido à característica termoestável da amilase do presente estudo, a hidrólise de alguns amidos foi realizada a temperaturas de 60 °C e 70 °C.

A produção de açúcares redutores a partir da hidrólise de diferentes fontes de amido, realizada a 60 °C, encontra-se na Figura 2a. Uma maior quantidade de açúcares redutores foi liberada a partir do amido de batata seguido do amido solúvel e amido de mandioca, enquanto o amido de milho foi hidrolisado em uma menor extensão.

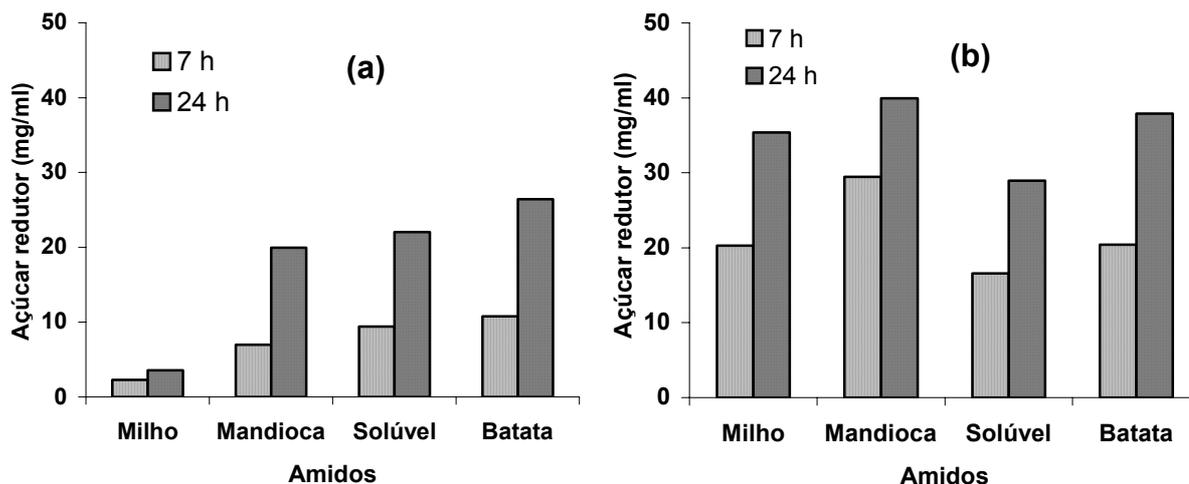


Figura 2 - Produção de açúcares redutores a 60 °C (a) e 70 °C (b) a partir de diferentes fontes de amido.

A utilização do sobrenadante livre de células como fonte da enzima é altamente vantajosa, principalmente porque diminui o custo da hidrólise (Konsula e Liakopoulou-Kyriakides, 2004).

A hidrólise dos vários amidos foi também realizada a 70 °C. Como pode ser vista na Figura 2b, a quantidade de açúcares redutores liberados para todos os amidos testados foi maior com o aumento da temperatura de 60 °C para 70 °C. Entretanto, o efeito da temperatura na extensão da hidrólise foi mais acentuado no caso do amido de milho e de mandioca.

A quantidade de açúcares redutores liberados a partir da hidrólise do amido de milho e de mandioca, realizadas a 70 °C, foi em torno de 10 e 2 vezes maior, respectivamente, que quando realizadas a 60 °C. De acordo com Konsoula e Liakopoulou-Kyriakides, (2004), o aumento da temperatura de hidrólise geralmente provoca uma maior produção de açúcares redutores. Este aumento pode ser devido à maior atividade da enzima a altas temperaturas ou ao intumescimento da região amorfa do grânulo de amido, fenômeno conhecido como gelatinização. A temperatura de gelatinização é variável em relação às fontes de amido. Assim, a temperatura de gelatinização dos amidos de milho e mandioca está numa faixa de 62 °C a 72 °C e 58 °C e 70 °C, respectivamente. Pelos resultados encontrados, verifica-se a concordância entre a temperatura utilizada e a faixa de temperatura de gelatinização das fontes de amido. A gelatinização de um amido é o primeiro passo para o processo de hidrólise, visto que a atuação das enzimas sobre o amido granular é muito lenta.

Goyal et al. (2005) também observaram a hidrólise dos grânulos de amido na faixa de temperaturas de 60 a 90 °C, indicando a natureza termoestável da enzima. A hidrólise máxima do amido de batata (1%) ocorreu a 70 °C com 90 e 89% de conversão da glicose, após 5 e 3 horas respectivamente.

#### 4. CONCLUSÕES

*Bacillus* sp. SMIA-2 foi capaz de secretar a enzima  $\alpha$ -amilase na presença de diferentes fontes de carbono durante vários tempos testados, destacando-se o amido solúvel como a melhor fonte utilizada. A atividade máxima da enzima foi constatada quando o microrganismo foi cultivado em meio contendo baixa concentração de amido solúvel (2,5 g/L), durante 36 horas de cultivo. Este tempo de fermentação reduziu para 24 horas, e um aumento da atividade foi encontrado quando o meio foi suplementado com proteínas do soro de leite (0,25 g/L) e peptona (2 g/L) como fonte de nitrogênio.

A produção da enzima foi máxima à temperatura de incubação de 50 °C. A atividade da  $\alpha$ -amilase variou com o pH inicial do meio de cultura, sendo que os melhores resultados foram verificados quando o *Bacillus* sp. SMIA-2 cresceu em valores de pH de 8,0 e 8,5.

A enzima foi capaz de degradar diferentes fontes de amido, sendo que a hidrólise do amido de batata resultou num alto rendimento de açúcares redutores em comparação às outras fontes de amido. O aumento da temperatura de reação da hidrólise para 70 °C, proporcionou a obtenção de maiores quantidades de açúcares redutores em todas as fontes testadas.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRAWAL, M.; PRADEEP, S.; CHANDRARAJ, K.; GUMMADI, S.N. Hydrolysis of starch by amylase from *Bacillus* sp. KCA102: a statistical approach. **Process Biochemistry**, v. 40(7), p. 2499–2507, 2005.

ALI, S.; HOSSAIN, Z. Characteristics of glucoamylase from *Aspergillus terreus*. **J. Appl. Bacteriol.**, v. 71(3), p. 144-146, 1991.

ASGHER, M.; ASAD, M.J.; RAHMAN, S.U.; LEGGE, R.L. A thermostable  $\alpha$ -amylase from a moderately thermophilic *Bacillus subtilis* strain for starch processing. **Journal of Food Engineering**, v. 79(3), p. 950-955, 2007.

BAJPAI, P.; BAJPAI, P. High-temperature alkaline  $\alpha$ -amylase from *Bacillus licheniformis* TCRDC-B13. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 33(1), p. 72-78, 1989.

BAJPAI, P., VERNA, N., NEER, J., BAJPAI, P.K. Utilization of cheese whey for production of  $\alpha$ -amylase enzyme. **Journal of Biotechnology**, v. 18(3), p. 265-270, 1991.

BAJPAI, P., GERA, R.K., BAJPAI, P.K. Optimization studies for the production of  $\alpha$ -amylase using cheese whey medium. **Enzyme and Microbial Technology**, v.14 (8), p. 679-683, 1992.

BOCCHINI, D.A.; OLIVEIRA, O.M.M.F; GOMES, E.; SILVA, R. Use of sugarcane bagasse and grass hydrolysates as carbon sources for xylanase production by *Bacillus circulans* D1 in submerged fermentation. **Process Biochemistry**, v. 40(12), p. 3653-3659, 2005.

BURBIDGE, E.; COLLIER, B. Production of bacterial amylases. **Process Biochemistry**, v. 3 (1), p. 53-56, 1968.

BURHAN, A.; NISA, U.; GOKHAN, C.; OMER, C.; ASHABIL, A.; OSMAN, G. Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkaliphilic *Bacillus* sp. isolate ANT-6. **Process Biochemistry**, v. 38(10), p. 1397-403, 2003.

CARLSEN, M.; NIELSEN, J.; VILLADSEN, J. Growth and  $\alpha$ -amylase production by *Aspergillus oryzae* during continuous cultivations. **Journal of Biotechnology**, v. 45(1), p. 81-93, 1996.

CHERRY, H.M.; HUSSAIN, T.; ANWAR, M.N. Extracellular glucoamylase from the isolate *Aspergillus fumigatus*. **Pak. J. Biol. Sci.**, v. 7(11), p. 1988-1992, 2004.

COLEMAN, G. Studies in the regulation of extracellular enzyme synthesis by *Bacillus subtilis*. **J. Gen. Microbiol.**, 49(4), p. 421-431, 1967.

CORDEIRO, C. A. M.; MARTINS, M. L. L.; LUCIANO, A. B. Production and properties of  $\alpha$ -amylase from thermophilic *Bacillus* sp. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33(1), p. 57-61, 2002.

DEMIRKAN, E.S.; MIKAMI, B.; ADACHI, M.; HIGASA, T.; UTSUMI, S.  $\alpha$ -Amylase from *B. amyloliquefaciens*: purification, characterization, raw starch degradation and expression in *E. coli*. **Process Biochemistry**, v. 40(8), p. 2629-2636, 2005.

DJEKRIF-DAKHMOCHE, S.; GHERIBI-AOULMI, Z.; MERAIHI, Z.; BENNAMOUN, L. Application of a statistical design to the optimization of culture medium for  $\alpha$ -amylase production by *Aspergillus niger* ATCC 16404 grown on orange waste powder. **Journal of Food Engineering**, v. 73(2), p. 190-197, 2006.

GANCEDO, J. M. Carbon catabolite repression in yeast. **European Journal Biochemical**, v. 206(3), p. 297-313, 1992.

GOSH, A.; CHATTERJEE, B.; DAS, A. Purification and characterization of glucoamylase of *Aspergillus terreus* NA-170 mutant. **J. Appl. Bacteriol.**, v. 71(3), p. 162-169, 1991.

GOYAL, N.; GUPTA, J.K.; SONI, S.K. A novel raw starch digesting thermostable  $\alpha$ -amylase from *Bacillus* sp.I-3 and its use in the direct hydrolysis of raw potato starch. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37(7), p. 723–734, 2005.

GUPTA, R.; GIGRAS, P.; MOHAPATRA, H.; GOSWAMI, V.K.; CHAUHAN, B. Microbial  $\alpha$ -amylases: a biotechnological perspective. **Process Biochemistry**, v. 38(11), p. 1599-1616. 2003.

HAMILTON, L.M.; KELLY, C.T.; FOGARTY, W.M. Production and properties of the raw starch-digesting  $\alpha$ -amylase of *Bacillus* sp. IMD 435. **Process Biochemistry**, v. 35(1-2), p. 27–31, 1999.

HAQ, I.; ASHRAF, H.; QADEER, M.A; IQBAL, J. Production of alpha-amylase by *Bacillus licheniformis* using an economical medium. **Bioresource Technol.**, v. 87(1), p. 57–61, 2003.

IGARASHI, K.; HATADA, Y.; HAGIHARA, H.; SAEKI, K.; TAKAIWA, M. U. T.; ARAI, K.; OZAKI, K., KAWAI, S.; KOBAYASHI, T. ; ITO, S. Enzymatic properties of a novel liquefying  $\alpha$ -amylase from an alkaliphilic *Bacillus* isolated and entire nucleotide and amino acid sequences. **Appl. Environm. Microbiol.**, v. 64(36), p. 3282-3289, 1988.

JIN, F.; LI, Y.; ZHANG, C.; YU, H. Thermostable  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -galactosidase production from the thermophilic and aerobic *Bacillus* sp. JF strain. **Process Biochemistry**, v. 36(6), p. 559–564, 2001.

JOO, H.S.; CHANG, C.S. Production of protease from a new alkalophilic *Bacillus* sp. I-312 grow on soybean meal: optimization and some properties. **Process Biochemistry**, v. 40(3-4), p. 1263-1270, 2005.

KILIKIAN, B.V. Production of glucoamylase by fed-batch culture of *Aspergillus awamori* NRRL 3112. **Rev. Microbial.**, v. 27(3), p. 137-141, 1996.

KONSULA, Z.; LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES, M. Hydrolysis of starches by the action of an  $\alpha$ -amylase from *Bacillus subtilis*. **Process Biochemistry**, v. 39(11), p. 1745–1749, 2004.

KONSULA, Z.; LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES, M. Co-production of  $\alpha$ -amylase and  $\beta$ -galactosidase by *Bacillus subtilis* in complex organic substrates. **Bioresource Technology**, v. 98(1) p.150-157, 2007.

KUMAR, C.G.; TAKAGI, H. Research review paper microbial alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint. **Biotechnology Advances**, v. 17(7), p. 561-594, 1999.

KUNAMNENI, A.; PERMAUL, K.; SINGH, S. Amylase production in solid state fermentation by the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 100(2), p. 168–171, 2005.

LEE, J.; PARULEKAR, S.J. Enhanced production of  $\alpha$ -amylase in fed-batch cultures of *Bacillus subtilis* TN106. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 42(29), p. 1142-1150, 1993.

LIN, L.L.; CHYAU, C.C.; HSU, W.H., Production and properties of a raw starch-degrading amylase from the thermophilic and alkalophilic *Bacillus* sp. TS-23. **Biotechnol. Appl. Biochem.**, v. 28(1), p. 61–68, 1998.

MAMO, G.; GESSESSE, A. Purification and characterization of two raw starch degrading thermostable  $\alpha$ -amylase from a thermophilic *Bacillus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 25(3-5), p. 433-438, 1999.

MC MAHON, H.E.M.; KELLY, C.T.; FOGARTY, W.M. Effect of growth rate on  $\alpha$ -amylase production by *Streptomyces* sp. IMD 2679. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 48(4-5), p. 504-509, 1997.

MEERS, J.L. The regulation of  $\alpha$ -amylase production in *Bacillus licheniformis*. **J. Microbiol. Serol.**, v. 38(6), p. 585-570, 1972.

MESSAOUD, E. BEN; ALI, M. BEN; ELLEUCH, N.; FOURATI MASMOUDI, N.; BEJAR, S. Purification and properties of a maltoheptaose- and maltohexaose-forming amylase produced by *Bacillus subtilis* US116. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 34(7), p. 662–666, 2004.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. **Anal. Chem.**, v. 3(3), p. 426-428, 1959.

MING CHU, I.; LEE, C.; LI, T.S. Production and degradation of alkaline protease in batch cultures of *Bacillus subtilis* ATCC 14416. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 14(9), p. 755-761, 1992.

NASCIMENTO, W.C.A.; MARTINS, M.L.L. Production and properties of an extracellular protease from thermophilic *Bacillus* sp. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35(1-2), p. 91-96, 2004.

NASCIMENTO, W.C.A. **Estudos sobre a secreção de protease por *Bacillus* sp. SMIA-2 e sua compatibilidade com detergentes comerciais.** Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Campos dos Goytacazes, RJ, 79p. 2005.

NGUYEN, Q.D.; REZESSY-SZABÓ, J.M.; CLAEYSSSENS, M.; STALS, I.; HOSCHKE, A. Purification and characterisation of amylolytic enzymes from thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* strain ATCC 34626. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31(3), p. 345–352, 2002.

NIELSEN, J.E.; BORCHERT, T.V. Protein engineering of bacterial  $\alpha$ -amylases. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1543(2), p. 253–74, 2000.

NUNES, A. S. **Influência da temperatura sobre os requerimentos nutricionais de um *Bacillus* sp. termofílico.** Tese (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Campos dos Goytacazes, RJ, 63p. 2000.

NUNES, A.S.; MARTINS, M.L.L. Isolation, properties and kinetics of growth of a thermophilic *Bacillus*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 32(4), p. 271-275, 2001.

NYIRI, L. The preparation of enzymes by fermentation. **Int. Chem. Eng.**, v. 11 (4), p. 447-457, 1971.

PANDEY, A.; WEBB, C.; SOCCOL, C.R.; LARROCHE, C. **Enzyme Technology.** 1ªed. New Delhi: Asiatech Publishers, Inc., p. 760, 2005.

PEDERSEN, H.; NIELSEN, J. The influence of nitrogen sources on the  $\alpha$ -amylase productivity of *Aspergillus oryzae* in continuous cultures. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 53(3), p. 278-281, 2000.

PEIXOTO, S.C.; JORGE, J.A.; TERENCEZI, H.F.; DE LOURDES, M.; POLIZELI, T.M. *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis*: a thermotolerant fungus with potential for production of thermostable amylases. **Int. Microbiol.**, v. 6(4), p. 269–273, 2003.

PRIEST, F. G. Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*. **Bacteriol. Review**, v. 41(7), p. 711-753, 1977.

ROMERO, F.J.; GARCIA, L.A.; SALAS, J.A.; DÍAZ, M.; QUIRÓS, L.M. Production purification and partial characterization of two extracellular proteases from *Serratia marcescens* grow in whey. **Process Biochemistry**, v. 36(6), p. 507-515, 2001.

SAJEDI, R.H.; NADERI-MANESH, H.; KHAJEH, K.; AHMADVAND, R.; RANJBAR, B.; ASODEH, A.; MORADIAN, F. A Ca-independent  $\alpha$ -amylase that is active and stable at low pH from the *Bacillus* sp. KR-8104. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36(5-6), p. 666–671, 2005.

SANTOS, E. O. **Efeito da composição do meio de cultura sobre a síntese de  $\alpha$ -amilase por um *Bacillus* sp.** Tese (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Campos dos Goytacazes, RJ, 79p. 2000.

SARIKAYA, E.; HIGASA, T.; ADACHI, M.; MIKAMI, B. Comparison of degradation abilities of  $\alpha$ - and  $\beta$ -amylase on raw starch granules. **Process Biochemistry**, v. 35(7), p. 711-715, 2000.

SAXENA, R.K.; DUTT, K.; AGARWAL, L.; NAYYAR, P. A highly thermostable and alkaline amylase from a *Bacillus* sp. PN5. **Bioresource Technology**, v. 98(2), p. 260-265, 2007.

SEKIGUCHI, J.; TAKADA, N.; OKADA, H. Genes affecting the productivity of  $\alpha$ -amylase in *Bacillus subtilis*. **J. Bacteriol.**, v. 121(7), p. 688-694, 1975.

SIDHU, G.S.; SHARMA, P.; CHAKRABARTI, T.; GUPTA, J.K. Strain improvement for the production of a thermostable  $\alpha$ -amylase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 21(7), p. 525-530, 1997.

SOCOL, C.R.; ROJAN, P.J.; PATEL, A.K.; WOICIECHOWSKI, A.L.; VANDENBERGHE, L.P.S.; PANDEY, A. Glucoamylase. In: **Enzyme Technology**. New Delhi: Asiatec Publishers Inc., p. 221-230. 2005.

SODHI, H.K.; SHARMA, K.; GUPTA, J.K.; SONI, S.K. Production of a thermostable  $\alpha$ -amylase from *Bacillus* sp. PS-7 by solid state fermentation and its synergistic use in the hydrolysis of malt starch for alcohol production. **Process Biochemistry**, v. 40(2), p. 525–534, 2005.

STEPHENSON, S.; CARTER, N.M.; HARWOOD, C.R.; PETIT-GLATRON, M.F.; CHAMBERT, R. The influence of protein folding of late stages of the secretion of  $\alpha$ -amylase from *Bacillus subtilis*. **FERBS Letters**, v. 403(3), p. 385-389, 1998.

SURMELY, R.; ALVAREZ, H.; CEREDA, M.P.; VILPOUX, O.F. Hidrólise do Amido. In: Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas. v. 3, cap.15. p. 377-395, 2003.

TANYILDIZI, M.S.; ÖZER, D.; ELIBOL, M. Optimization of  $\alpha$ -amylase production by *Bacillus* sp. using response surface methodology. **Process Biochemistry**, v. 40(7), p. 2291–2296, 2005.

TEODORO, C.E.D.; MARTINS, M.L.L. Culture conditions for the production of thermostable amylase by *Bacillus* sp. **Braz. J. Microbiol.**, v. 31(4), p. 298–302, 2000.

TSUCHIYA, K.; SHINJO, A.; SHIMOYA, K.; OKAZAKI, M. AND MIURA, Y. Characteristics of  $\alpha$ -amylase production by *Bacillus subtilis* KYA 741. **J. Ferment. Technol.**, v. 53(2), p. 199-206, 1975.

USTÁRIZ, F.J.; LACA, A.; GARCÍA, L.A.; DÍAZ, M. Fermentation of individual proteins for protease production by *Serratia marcescens*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 19(2), p. 147–153, 2004.

WU, J.R.; SON, J.H.; KIM, K.M.; LEE, J.W.; KIM, S.K. *Beijerinckia indica* L3 fermentation for the effective production of heteropolysaccharide-7 using the dairy by product whey as medium. **Process Biochemistry**, v. 41(2), p. 289–292, 2006.

### **3.2. PROPRIEDADES DE UMA AMILASE PRODUZIDA POR UM *Bacillus* sp. SMIA-2 TERMOFÍLICO E SUA COMPATIBILIDADE COM ALGUNS DETERGENTES COMERCIAIS**

**Raquel Vieira de Carvalho, Thamy Livia Ribeiro Corrêa, Júlia Caroline Matos da Silva, Luciana Ribeiro Coutinho de Oliveira Mansur e Meire Lelis Leal Martins\***

\* Laboratório de Tecnologia de Alimentos, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Av. Alberto Lamego, 2000, CEP: 28015-620, Campos dos Goytacazes – RJ, Brasil.

#### **RESUMO**

A produção de  $\alpha$ -amilase por um termofílico, *Bacillus* sp. SMIA-2, cultivado em um meio líquido contendo amido solúvel (5 g/L) como fonte de carbono, e suplementado com proteínas do soro de leite (0,5 g/L) e peptona (2 g/L), alcançou uma atividade máxima de 37 U/ml em 32 horas. Estudos sobre a caracterização da amilase revelaram que a temperatura ótima desta enzima foi obtida a 90 °C. A enzima foi estável por 1 hora a temperaturas de 40 e 50 °C, enquanto a 90 °C, 66% da atividade máxima foram perdidas. Entretanto, na presença de 5 mM de CaCl<sub>2</sub>, a enzima foi estável a 90 °C por 30 minutos e

manteve, aproximadamente, 58% de atividade residual após 1 hora. O pH ótimo da enzima foi 8,5. Após a incubação da enzima liofilizada por 2 horas em pHs 9,5 e 11,0, foi observado um decréscimo de aproximadamente 6,3% e 16,5% da atividade original. Em pH 6,0, a enzima perdeu cerca de 36% de sua atividade original. A enzima foi fortemente inibida por  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$  e  $\text{Mn}^{2+}$ , porém pouco afetada por  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  e  $\text{K}^+$ . Na presença de 2,0 M de NaCl, 63% da atividade da amilase foram mantidos após 2 horas de incubação à temperatura de 45 °C. A amilase exibiu atividade acima de 70% quando foi incubada por 1 hora, a 50 °C, em presença de dodecil sulfato de sódio (SDS). Entretanto, na presença de hipoclorito de sódio, a enzima mostrou baixa atividade residual e, quando incubada em peróxido de hidrogênio, foi inibida completamente. A compatibilidade da amilase, produzida pelo *Bacillus* sp. SMIA-2, em relação a alguns detergentes comerciais mostrou que a enzima apresentou uma boa atividade, mantendo 86%, 85% e 75% de atividade após 20 minutos de incubação a 50 °C na presença de detergentes das marcas Omo<sup>®</sup>, Campeiro<sup>®</sup> e Tide<sup>®</sup>, respectivamente.

**Palavras-chave:**  $\alpha$ -amilase, bactéria termofílica, *Bacillus* sp.

## **PROPERTIES OF AN AMYLASE FROM THERMOPHILIC *Bacillus* sp. SMIA-2 AND ITS COMPATIBILITY WITH SOME COMERCIAL DETERGENTS**

**Raquel Vieira de Carvalho, Thamy Livia Ribeiro Corrêa, Júlia Caroline Matos  
da Silva, Luciana Ribeiro Coutinho de Oliveira Mansur e Meire Lelis Leal  
Martins\***

\* Laboratório de Tecnologia de Alimentos, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Av. Alberto Lamego, 2000, CEP: 28015-620, Campos dos Goytacazes – RJ, Brasil.

## ABSTRACT

$\alpha$ -Amylase production by thermophilic *Bacillus* sp. strain SMIA-2 cultivated in liquid cultures containing soluble starch as a carbon source (5 g/L) and supplemented with whey protein (0.5 g/L) and peptone (2 g/L) reached a maximum activity at 32 h, with levels of 37 U/ml. Studies on the amylase characterization revealed that the optimum temperature of this enzyme was 90 °C. The enzyme was stable for 1 h at temperatures ranging from 40-50 °C while at 90 °C, 66% of its maximum activity was lost. However, in the presence of 5 mM CaCl<sub>2</sub>, the enzyme was stable at 90 °C for 30 min and retained about 58% residual activity after 1 h. The optimum pH of the enzyme was found to be 8.5. After incubation of enzyme for 2 h at pH 9.5 and 11.0 was observed a decrease of about 6.3% and 16.5% of its original activity. At pH 6.0 the enzyme lost about 36% of its original activity. The enzyme was strongly inhibited by Cu<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Ba<sup>2+</sup> and Mn<sup>2+</sup> but less affected by Mg<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup>, Zn<sup>2+</sup> and K<sup>+</sup>. In the presence of 2.0 M NaCl, 63% of amylase activity was retained after 2 h incubation at 45 °C. The amylase exhibited more than 70% activity when incubated for 1 h at 50 °C with sodium dodecyl sulphate. However, very little residual activity was obtained with sodium hypochlorite and with hydrogen peroxide the enzyme was completely inhibited. The compatibility of *Bacillus* sp. SMIA-2 amylase with certain commercial detergents was shown to be good as the enzyme retained 86%, 85% and 75% of its activity after 20 min incubation at 50 °C in the presence of the detergent brands Omo<sup>®</sup>, Campeiro<sup>®</sup> and Tide<sup>®</sup>, respectively.

**Key-words:**  $\alpha$ -amylase, thermophilic bacterium, *Bacillus* sp.

## 1. INTRODUÇÃO

A maioria das enzimas, atualmente utilizada nas indústrias, pertence ao grupo das hidrolases, que utilizam uma variedade de substratos naturais.

Há muito tempo, os microrganismos têm sido a principal fonte de diversas enzimas que, após extensas pesquisas, foram identificadas e atualmente possuem grandes aplicações industriais (Bon, 1995).

$\alpha$ -Amilases (EC 3.2.1.1) são enzimas de grande interesse industrial responsáveis por cerca de 30% da produção mundial de enzimas (Nguyen et al., 2002).  $\alpha$ -Amilases termoestáveis são amplamente utilizadas no processamento de amido, produção de açúcar, cerveja, em indústrias têxteis e em processos de fabricação de detergentes (Hendriksen et al., 1999; Lévêque et al., 2000).

As amilases podem ser produzidas por diversas fontes microbianas (Van der Maarel et al., 2002; Aquino et al., 2003), porém, são geralmente produzidas por bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus*, como as amilases de *B. amyloliquefaciens*, *B. stearothermophilus*, *B. subtilis* e *Bacillus licheniformis* (Sajedi et al., 2005), que recentemente têm demonstrado uma grande importância industrial (Declerck et al., 2000).

As propriedades de cada  $\alpha$ -amilase, como a estabilidade térmica, perfil do pH, estabilidade ao pH e a independência do íon  $\text{Ca}^{2+}$ , podem ser condizentes à sua aplicação. Por exemplo,  $\alpha$ -amilases utilizadas em indústrias de amido devem ser ativas e estáveis em baixo pH, porém, em indústrias de detergentes, essas enzimas devem ser ativas em valores de pH alto (Nielsen e Borchert, 2000).

No presente trabalho, foram estudadas algumas propriedades da enzima  $\alpha$ -amilase termoestável, produzida por *Bacillus* sp. SMIA-2 termofílico isolado de amostras de solos, coletadas na cidade de Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil. A compatibilidade da enzima produzida foi investigada em relação a algumas marcas de detergentes comerciais.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Microrganismos e condições de cultivo

O organismo usado neste estudo foi uma bactéria termofílica, *Bacillus* sp. cepa SMIA-2, previamente isolada a partir de amostras do solo local, de Campos

dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil (Nunes e Martins, 2001). A produção da enzima  $\alpha$ -amilase foi realizada em um meio contendo (g/L em água destilada): meio mínimo mineral: KCl-0,3; MgSO<sub>4</sub>-0,5; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-0,87; CaCl<sub>2</sub>-2,2x10<sup>-3</sup>; ZnO-2,5x10<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>-4</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>; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>-3,0x10<sup>-4</sup>. Proteína do soro de leite – 0,5; peptona – 2,0 e amido solúvel - 5,0. O pH do meio de cultura foi ajustado para 7,5 com NaOH e esse meio basal foi esterilizado por autoclavagem a 121 °C por 15 minutos.

O *Bacillus* sp. SMIA-2 foi cultivado em 25 ml do meio descrito acima, em frascos erlenmeyer de 250 ml. O meio estéril foi inoculado com 1 ml da cultura preparada de véspera (pré-inóculo) e incubado a 50 °C em “shaker” rotatório (Thermo Foma, Ohio, USA) operando a 180 rpm. Os frascos foram retirados em triplicata, em intervalos de tempos determinados, e analisados em relação ao crescimento (DO 600 nm) e pH, com três repetições, durante 48 horas.

O meio de cultivo foi centrifugado a 4500 rpm por 15 minutos em centrífuga, modelo Hermle-Z 382K, e o sobrenadante livre de células tratado com sulfato de amônio (60% de saturação). Após 18 horas de repouso a 4 °C, o caldo foi novamente centrifugado (9000 rpm durante 30 min) em centrífuga Haniel Science Industrial Mega 21R (Small High Speed Refrigerated Centrifuge). O precipitado obtido foi ressuspenso em tampão fosfato (10 mM) pH 7,0 e dialisado contra o mesmo tampão durante 18 horas a 4 °C. A enzima dialisada foi, então, concentrada por liofilização, em liofilizador modelo LABCONCO Freeze dry system (Freezone 4.5), mantida sob refrigeração e usada em estudos subsequentes.

## 2.2. Determinação da atividade da $\alpha$ -amilase

A atividade da  $\alpha$ -amilase foi determinada pela incubação de 0,5 mg da enzima liofilizada com 0,5 ml da solução de amido solúvel (5 g/L) preparada em tampão Tris-HCl (0,05 M), pH 8,5, e mais 0,2 ml do mesmo tampão, em banho-maria a 90 °C por 10 minutos, exceto quando mencionado. A reação foi paralisada pela adição de 1 ml do reagente ácido 3-5-dinitrossalicílico (1% DNS), sendo, em seguida, fervida por 10 minutos e colocada em um banho de gelo. Após 5 minutos, foram adicionados 4,8 ml de água destilada. Os tubos foram agitados e a

leitura da absorvância realizada em espectrofotômetro, em um comprimento de onda de 540 nm. Paralelamente, foi feito um controle (tubo branco) contendo todos os reagentes do ensaio, sendo o DNS adicionado antes da enzima liofilizada.

Uma unidade da enzima (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1  $\mu\text{mol}$  de glicose, a partir do substrato, em 1 minuto a 90 °C.

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

O efeito do pH na atividade da  $\alpha$ -amilase foi avaliado na faixa de 6,0 a 12,0 com intervalos de 0,5 unidade. As soluções tamponantes utilizadas foram, tampão fosfato (pH 6,0-8,0), tampão Tris-HCl (pH 8,5-9,5) e tampão glicina-NaOH (pH 10,0-12,0).

O pH ótimo foi determinado preparando-se o substrato (amido 5 g/L) nas soluções tampão com diferentes valores de pH e incubando-se o mesmo com 0,5 mg da enzima liofilizada em banho-maria a 90 °C por 10 minutos, conforme descrito acima no item 2.2.

A estabilidade da enzima em diferentes valores de pH foi avaliada incubando-se apenas a enzima liofilizada, nas soluções tampão descritas acima, por 2 horas à temperatura ambiente. Após este tratamento, a atividade residual da amilase foi determinada de acordo com o item 2.2.

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

O efeito da temperatura na atividade da enzima foi determinado incubando-se a mistura de reação em temperaturas que variaram de 40-100 °C, em pH 8,5. Após 10 minutos de incubação em cada temperatura, a atividade enzimática foi determinada nas condições padrão, anteriormente descritas no item 2.2.

A estabilidade térmica foi avaliada pela incubação da preparação da enzima liofilizada em temperaturas que variaram de 40-100 °C, em intervalos de 10 °C, por 1 hora em banho-maria. Após a incubação, a atividade residual foi analisada na temperatura ótima da enzima, determinada anteriormente.

## 2.5. Efeito dos íons metálicos

Para estudar a influência dos íons metálicos na atividade da  $\alpha$ -amilase, a enzima parcialmente purificada foi incubada a 90 °C em banho-maria por 2 minutos, com o íon correspondente na concentração de 5 mM. A atividade enzimática residual (%) foi determinada nas condições padrão anteriormente descritas. A atividade da enzima foi estudada na presença dos cloretos de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  e  $\text{Ba}^{2+}$  e sulfatos de  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$ . A enzima liofilizada foi incubada na ausência de metais (controle), sob as mesmas condições descritas acima, e considerada como 100% de atividade.

## 2.6. Teste de tolerância salina

A enzima liofilizada foi incubada em tampão Tris-HCl, 50 mM, (pH 8,5) contendo concentrações de 0 a 5 M de NaCl, por 120 minutos a 45 °C. Em cada concentração, a atividade da enzima foi determinada conforme mencionada anteriormente, no item 2.2.

## 2.7. Efeito de alguns inibidores e agentes oxidantes na atividade da enzima

Para a determinação do efeito de alguns inibidores e agentes oxidantes na atividade da  $\alpha$ -amilase, a enzima liofilizada foi pré-incubada a 50 °C por 1 hora em presença de dodecil sulfato de sódio (SDS), hipoclorito de sódio (NaClO), peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e EDTA (ácido etileno diamino tetracético) na concentração de 5 mM. Após a incubação, a atividade residual foi determinada de acordo com o item 2.2.

Um controle, considerado 100%, foi feito incubando-se a enzima na ausência destes compostos, nas mesmas condições mencionadas anteriormente.

## 2.8. Avaliação da enzima para uso em formulações de detergentes

Os detergentes utilizados, marcas Ariel<sup>®</sup>, Biz<sup>®</sup>, Cheer<sup>®</sup>, Tide<sup>®</sup>, Campeiro<sup>®</sup> e Omo<sup>®</sup>, foram diluídos em água bi-destilada em uma concentração final de 7 mg.ml<sup>-1</sup> para simular as condições de lavagem. As enzimas presentes nas

formulações dos detergentes foram inativadas por aquecimento a 100 °C por 15 minutos.

Para estudar o efeito dos detergentes na atividade da amilase produzida pelo microrganismo, 7 mg do respectivo detergente foram introduzidos na mistura de reação, procedendo-se à determinação da atividade enzimática sob as condições padrão descritas no item 2.2.

A estabilidade da amilase foi determinada na presença dos diferentes detergentes. A enzima liofilizada, na concentração de 1 mg.ml<sup>-1</sup>, foi adicionada à preparação do detergente e incubada a 50 °C por 60 minutos. Alíquotas (0,5 ml) foram recolhidas em intervalos de tempo determinados, e a atividade residual determinada a 90 °C. Uma amostra controle foi incubada a 50 °C na ausência de detergente e comparada (Phadattare et al., 1993; Banerjee et al., 1999).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Produção da enzima

O crescimento do *Bacillus* sp. SMIA-2 e a atividade da  $\alpha$ -amilase em função do tempo de fermentação foram observados por 48 horas em meio basal contendo 5 g/L de amido solúvel como fonte de carbono, e suplementado com 0,5 g/L de proteínas do soro de leite e 2 g/L de peptona como fonte de nitrogênio (Figura 1). A produção de  $\alpha$ -amilase pelo *Bacillus* sp. cepa SMIA-2 iniciou durante a fase de crescimento exponencial e atingiu o máximo em 32 horas, com níveis de 37 U/ml. Subseqüentemente, os níveis de  $\alpha$ -amilase permaneceram mais ou menos constantes até 36 horas e, então, a atividade decresceu para 30 U/ml com 48 horas.

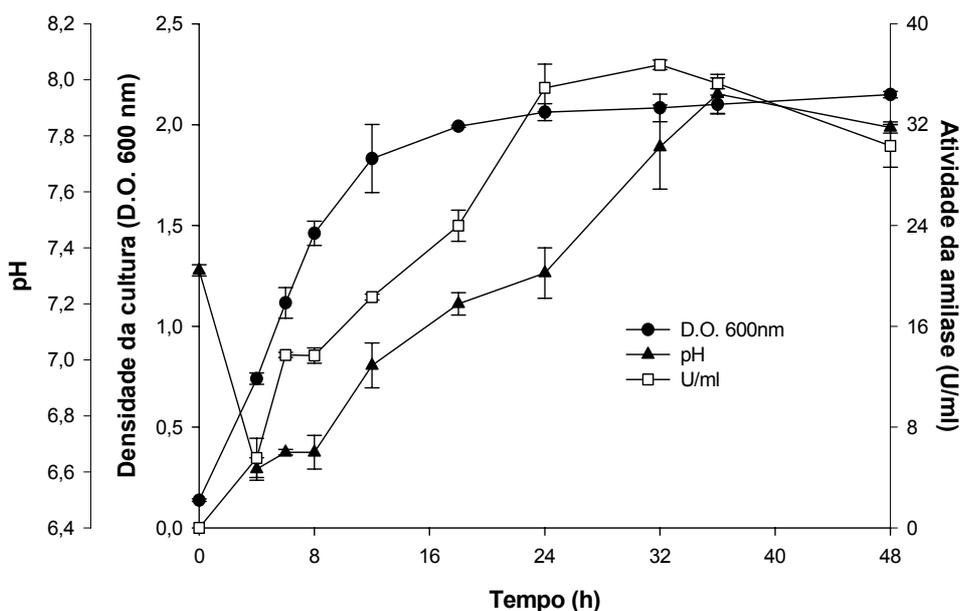


Figura 1 - Crescimento e atividade da  $\alpha$ -amilase produzida pelo *Bacillus* sp. cepa SMIA-2, cultivado em amido solúvel (5 g/L) e proteínas do soro de leite (0,5 g/L) por 48 horas a 50 °C. As barras representam o desvio padrão.

O pH do meio de cultivo inicialmente apresentou uma queda com o início do crescimento celular, como mostra a Figura 1. Porém, assim que a produção da enzima iniciou, o pH do meio começou a subir. Este efeito pode indicar que o nitrogênio orgânico presente no meio de cultivo estava sendo consumido. A produção final da enzima foi sinalizada por um ligeiro decréscimo nos valores de pH. Assim, a avaliação do perfil do pH forneceu informações importantes sobre o processo de produção de  $\alpha$ -amilase.

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

Uma faixa de pH entre 6,0 e 12,0 foi usada para estudar o efeito do pH na atividade da  $\alpha$ -amilase (Figura 2). O pH ótimo encontrado para a enzima foi 8,5. A atividade enzimática em pH 7,0 e em 11,0 foram de 72% e 81,4%, respectivamente, em relação ao pH 8,5.

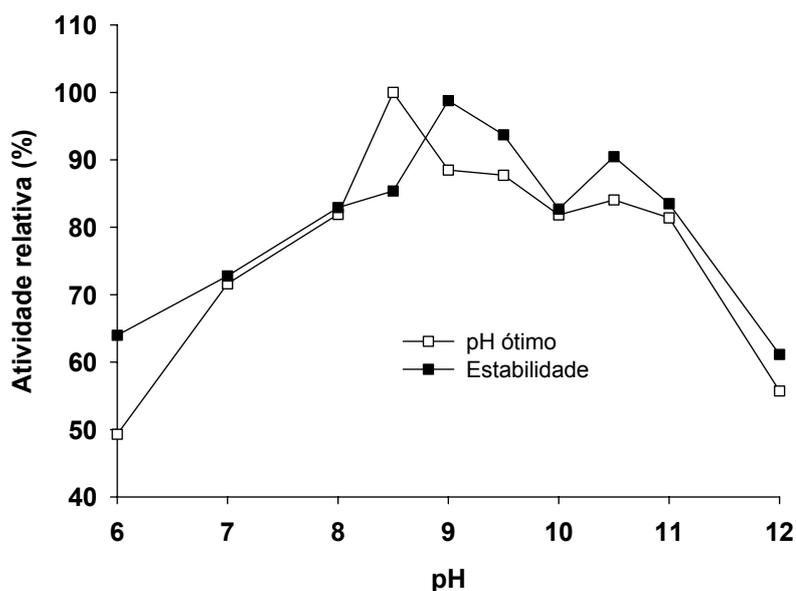


Figura 2 – Efeito do pH na atividade (□) e estabilidade (■) da  $\alpha$ -amilase parcialmente purificada produzida pelo *Bacillus* sp. SMIA-2. O pH ótimo foi determinado medindo-se a atividade enzimática em substrato preparado em diferentes valores de pH. A estabilidade ao pH foi determinada incubando-se a amilase por 2 horas nos diferentes valores de pH. (100% da atividade enzimática = 36,1 U/ml).

Os resultados obtidos por Asgher et al. (2007) mostraram que a  $\alpha$ -amilase produzida pelo *Bacillus subtilis* JS-2004 foi ativa numa vasta faixa de pH, sendo 8,0 o pH ótimo da respectiva enzima. Estudos realizados por Bernhardsdotter et al. (2005) também mostraram que a amilase exibiu uma grande atividade em ampla faixa de pH, que variou de 5,5 a 11,0, apresentando cerca de 80% de atividade em valores de pH 6,1 e 10,9. De acordo com Nakamura et al. (1975), o perfil de atividade enzimática, numa ampla faixa de pH, tem sido verificado em várias enzimas extracelulares alcalinas que degradam carboidratos, podendo refletir no ambiente na qual elas são secretadas.

Por outro lado, Sajedi et al. (2005) concluíram que o pH ótimo da  $\alpha$ -amilase secretada por *Bacillus* sp. KR-8104 estava entre 4,0 e 6,0, com atividade em pH variando de 3,5 a 7,0.

Após a incubação da enzima parcialmente purificada por 2 horas à temperatura ambiente, em pH variando de 6,0 a 12,0 observou-se um decréscimo de aproximadamente 6,3% da atividade original em pH 9,5 e, em pH 11,0, o decréscimo foi de 16,5%. Entretanto, em pH 6,0, o decréscimo observado foi de

36% em relação à atividade original. Esses resultados mostraram que a enzima foi estimulada em meio alcalino e sugerem que a amilase produzida pelo *Bacillus* sp. SMIA-2 é atrativa para a indústria de detergentes.

$\alpha$ -Amilases do gênero *Bacillus* têm sido descritas por vários autores em relação a sua atividade ótima em valores de pH baixo, desde 3,5 até valores mais altos como 12 (Horikosh, 1971; Hayashi et al., 1988; Kim et al., 1995; Konsula e Liakopoulou-Kyriakides, 2004; Bernhardsdotter et al., 2005).

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

A atividade amilolítica da enzima liofilizada foi estudada em diferentes temperaturas abrangendo uma faixa de 40 °C-100 °C com pH constante de 8,5 e uma concentração de substrato de 5 g/l de amido solúvel (Figura 3). A atividade enzimática cresceu com o aumento da temperatura na faixa de 40 °C a 90 °C, porém, uma redução na atividade da enzima foi verificada em temperatura acima de 90 °C.

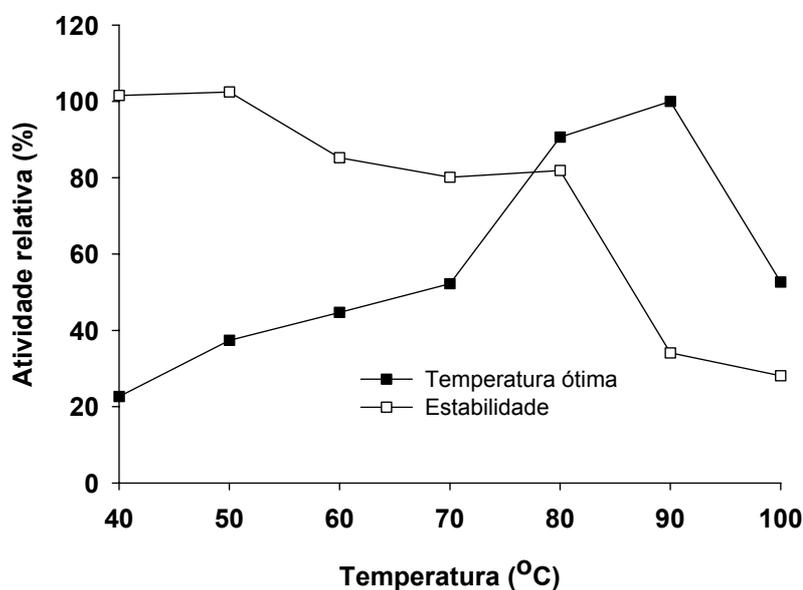


Figura 3 – Efeito da temperatura na atividade (■) e estabilidade (□) da  $\alpha$ -amilase liofilizada, produzida pelo *Bacillus* sp. SMIA-2. A temperatura ótima foi determinada medindo-se a atividade enzimática nas diferentes temperaturas. Estabilidade térmica determinada após incubação da amilase por 1 hora nas diferentes temperaturas (100% de atividade enzimática = 36,4 U/ml).

A temperatura ótima da  $\alpha$ -amilase produzida pelo *Bacillus* sp. SMIA-2 foi 90 °C, sendo esta mais elevada ou semelhante às descritas para  $\alpha$ -amilases de outros *Bacillus* (Sidhu et al., 1997; Ali et al., 1999; Mamo et al., 1999; Mamo e Gessesse, 1999; Jin et al., 2001; Bertoldo e Antranikan, 2002; Burhan et al., 2003; Konsula e Liakopoulou-Kyriakides, 2004).

A enzima foi estável por 1 hora em temperaturas de 40-50 °C, enquanto que na temperatura de 80 °C, 18% da atividade máxima foram perdidas.

A  $\alpha$ -amilase produzida por *Bacillus subtilis* manteve 100% de sua atividade original quando este bacilo foi incubado a 80 °C durante 1 hora. Após incubação por 24 horas em temperaturas de 50 e 60 °C a enzima manteve 72 e 68% da atividade original, respectivamente (Asgher et al., 2007).

Muitos fatores afetam a termoestabilidade das enzimas, entre esses, incluem-se a presença de cálcio, substrato e outros agentes estabilizadores (Gupta et al., 2003). Muitos trabalhos mostraram que os íons cálcio possuem um papel importante na estabilização das enzimas, em temperaturas elevadas. Assim, uma investigação foi conduzida para avaliar o efeito deste íon sobre a estabilidade da  $\alpha$ -amilase parcialmente purificada, produzida pelo *Bacillus* sp. SMIA-2.

Pelos resultados analisados, verificou-se que, quando a enzima foi incubada por 1 hora a 90 °C, cerca de 66% de sua atividade máxima foram perdidas, entretanto, pela Figura 4, observa-se que a adição de  $\text{CaCl}_2$ , na concentração de 5 mM, proporcionou um aumento na estabilidade térmica da  $\alpha$ -amilase.

Declerck et al. (2000), em trabalhos com uma  $\alpha$ -amilase produzida por *Bacillus licheniformis*, concluíram que a presença de dois íons cálcio próximos ao sítio ativo da enzima tiveram grande influência para sua termoestabilidade, uma vez que ordenam a estrutura da enzima por meio de ligações com determinados aminoácidos.

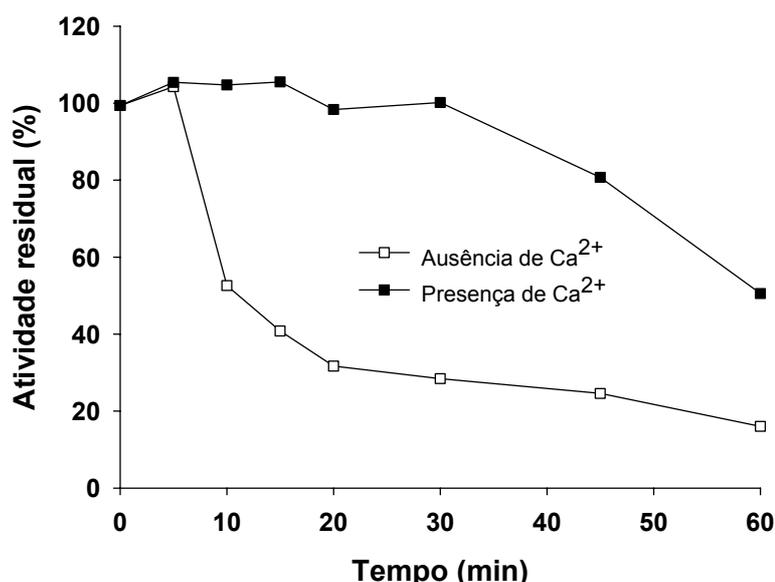


Figura 4 - Estabilidade térmica da  $\alpha$ -amilase em presença (■) ou ausência de íons  $\text{Ca}^{2+}$  (□), incubada à temperatura de 90 °C (100% da atividade enzimática = 50,5 U/ml).

A enzima foi estável a 90 °C por 30 minutos e manteve cerca de 58,4% da atividade residual após 1 hora, na presença de cálcio. O requerimento do íon  $\text{Ca}^{2+}$  por  $\alpha$ -amilases para sua estabilidade em altas temperaturas foi descrito em trabalhos com *Bacillus licheniformis* (Krishnan e Chandra, 1983), *Bacillus clausii* BT-20 (Duedahl-Olesen et al., 2000), *Bacillus subtilis* (Hayashida et al., 1988; Nielsen et al., 2003), *Bacillus* sp. ANT-6 (Burhan et al., 2003) e *Bacillus* sp. I-3 (Goyal et al., 2005).

O efeito estabilizante do  $\text{Ca}^{2+}$  na termoestabilidade da enzima pode ser explicado devido ao *salting out* dos resíduos hidrofóbicos da proteína pelo  $\text{Ca}^{2+}$ , resultando, então, na formação de uma estrutura compacta (Volkin e Klibanov, 1989).

Estudos de cinética da desnaturação térmica de enzimas e de estruturas celulares contendo proteínas, têm mostrado que muitas proteínas de espécies bacterianas termofílicas são consideradas mais estáveis à temperatura do que os homólogos de bactérias mesofílicas. Experimentos demonstram que praticamente todas as proteínas de bactérias termofílicas permanecem no seu estado original após o tratamento térmico, que, por outro lado, desnatura as proteínas de organismos mesofílicos (Stanier et al., 1976). Essa estabilidade térmica das proteínas, típica desses organismos, é considerada como a preservação da

estrutura tridimensional sobre diferentes condições físicas ou químicas. A funcionalidade da proteína é completamente dependente do seu estado nativo, que também pode variar devido à presença de substratos e, ou, cofatores (Scandurra et al., 1998).

Por outro lado, muitos pesquisadores apresentam resultados nos quais a  $\alpha$ -amilase não requer íon cálcio, ou, ainda, que este íon pode provocar um efeito inibitório na atividade da enzima (Aguilar et al., 2000; Hagihara et al., 2001; Yang et al., 2004; Bernhardsdotter et al., 2005). Hashim et al. (2005) mostraram que a alta concentração do íon cálcio inibiu a atividade da enzima.

### 3.4. Efeito dos íons metálicos

A  $\alpha$ -amilase secretada pelo *Bacillus* sp. cepa SMIA-2 não requereu nenhum tipo de íon específico para sua atividade catalítica (Figura 5). O resultado foi semelhante ao encontrado por Cordeiro et al. (2002) ao estudarem a  $\alpha$ -amilase pelo mesmo microrganismo, em diferentes condições. Najafi et al. (2005), em estudos com  $\alpha$ -amilase produzida pelo *B. subtilis* AX-20, revelaram que a atividade enzimática também não foi estimulada na presença de íons metálicos.

Um forte efeito inibitório foi observado na enzima produzida pelo microrganismo em estudo, quando na presença de íons  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$  e  $\text{Mn}^{2+}$ . Resultados semelhantes foram obtidos por Hashim et al. (2005), que observaram uma inibição completa da  $\alpha$ -amilase em presença de  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Mn}^{2+}$  na concentração de 5 mM. Entretanto, uma pequena inibição da  $\alpha$ -amilase produzida pelo *Bacillus* sp. SMIA-2 foi observada na presença de 5 mM de  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  e  $\text{K}^+$ . Sajedi et al. (2005) mostraram que concentrações de 5 mM de íons  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{Na}^+$  também não tiveram efeito na atividade da  $\alpha$ -amilase de *Bacillus* sp. KR-8104.

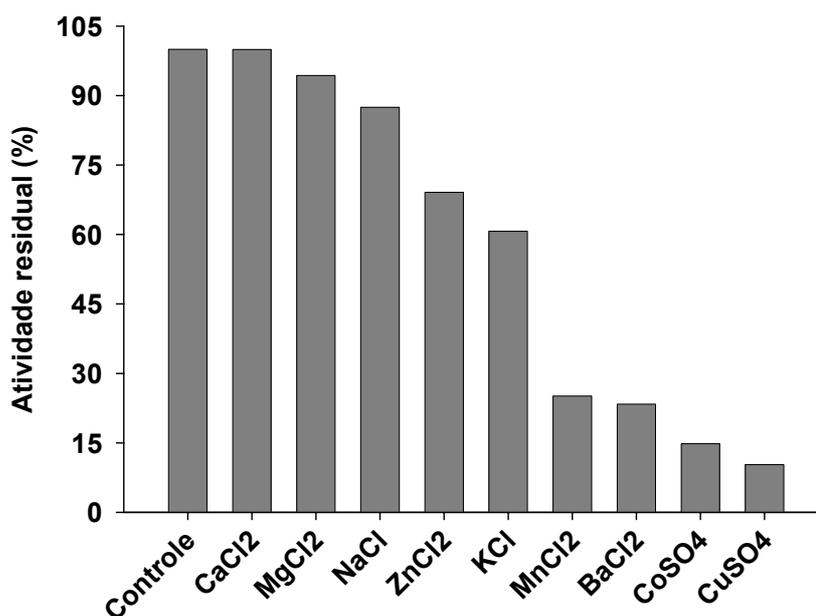


Figura 5 - Efeito de diferentes íons metálicos na atividade da  $\alpha$ -amilase parcialmente purificada produzida pelo *Bacillus* sp. SMIA-2. A atividade é expressa como porcentagem da atividade obtida na ausência de íons metálicos (100% de atividade enzimática = 41 U/ml).

Muitas amilases são metaloenzimas, possuindo um íon metálico com papel importante na atividade catalítica. A inibição da amilase produzida pelo *Bacillus* sp. SMIA-2 pelos íons  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$  e  $\text{Mn}^{2+}$  pode ser devida à competição entre os cátions exógenos e a associação proteína-cátions, resultando num decréscimo da atividade da metaloenzima (Lévêque et al., 2000). Muitos íons metálicos, principalmente os íons de metais pesados, são fortes inibidores de  $\alpha$ -amilase. A estabilização de algumas enzimas pode ser induzida principalmente por íons divalentes como  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ . Esses íons, usados em baixas concentrações, podem estabilizar a estrutura terciária da proteína promovendo a formação de ligações cruzadas, que conferem a ela uma maior estabilidade (Tomazic, 1991).

### 3.5. Teste de tolerância salina

Um estudo sobre o efeito do cloreto de sódio na atividade da  $\alpha$ -amilase produzida pelo *Bacillus* sp. SMIA-2 foi realizado incubando-se a enzima

parcialmente purificada a 45 °C, por 2 horas, em solução de NaCl com concentrações variadas. De acordo com a Figura 6, pode-se verificar que, na concentração de 2,0 M, a enzima manteve 63,4% de atividade. Resultado similar foi descrito por Jana e Pati (1997) em estudos com a  $\alpha$ -amilase produzida pelo *Bacillus* sp. MD 124. A enzima foi estável na solução de NaCl 5,0 M e manteve 75% de sua atividade original, após 24 horas de incubação.

Observou-se também que a enzima manteve cerca de 44% e 41% da atividade original a 45 °C após 2 horas de incubação. Cordeiro et al. (2002) verificaram que a enzima incubada em solução de NaCl, em concentrações de 1,0 M e 5,0 M, conservou 70% e 47% da atividade original, após 24 horas, em temperatura de 25 °C respectivamente, em estudos com  $\alpha$ -amilase secretada pelo *Bacillus* sp. SMIA-2.

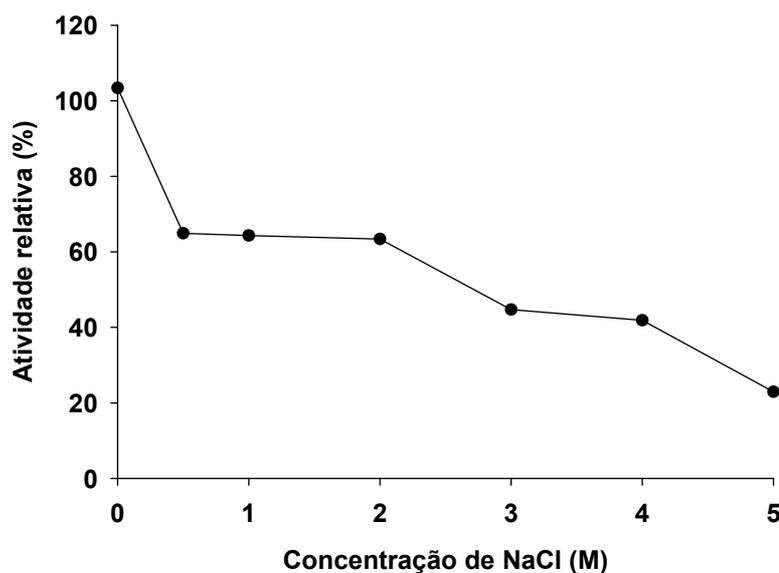


Figura 6 - Efeito da concentração de NaCl na atividade da  $\alpha$ -amilase liofilizada, produzida pelo *Bacillus* sp. espécie SMIA-2, durante 2 horas de incubação a 45 °C. Atividade relativa foi expressa como percentual da atividade máxima (100% da atividade da enzima = 34,8 U/ml).

Segundo alguns autores, o ambiente onde os organismos são isolados pode influenciar as propriedades de suas proteínas. Bernhardsdotter et al. (2005) mostraram que o  $\text{Na}^+$  estimulou a atividade da amilase, principalmente pelo fato de o *Bacillus* sp. L1711 ter sido isolado de amostras de um lago com alta salinidade e abundante teor de soda cáustica.

### 3.6. Efeito dos inibidores e alguns agentes oxidantes na atividade da enzima e compatibilidade com detergentes comerciais

Além da estabilidade em pH e temperatura, uma amilase com características apropriadas para ser utilizada em detergentes deve ser estável também a vários componentes presentes nas formulações de detergentes, como surfactantes, agentes quelantes e oxidantes (Saxena et al., 2007).

A amilase do *Bacillus* sp. SMIA-2 exibiu atividade acima de 70% quando incubada, por 1 hora a 50 °C, na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS), um detergente aniônico. De acordo com Fennema (1996), detergentes como o dodecil sulfato de sódio são potentes agentes desnaturantes de proteínas. Nas concentrações de 3-8 mM, eles são capazes de desnaturar proteínas globulares.

Uma pequena atividade residual foi obtida com o hipoclorito de sódio, e quando incubada na presença de peróxido de hidrogênio, a enzima foi completamente inibida (Figura 7).

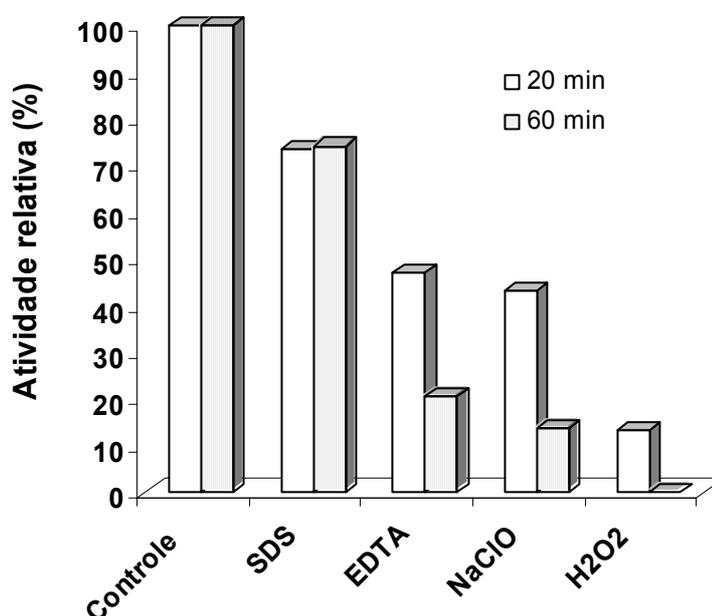


Figura 7 - Efeito de alguns inibidores e agentes oxidantes, em diferentes tempos, na atividade da  $\alpha$ -amilase. A atividade é expressa como porcentagem de atividade na ausência de agentes inibidores e oxidantes (100% da atividade enzimática = 31,9 U/ml).

A amilase produzida por *Bacillus* sp. PN5 exibiu atividade acima de 80% quando foi incubada com perborato de sódio e dodecil sulfato de sódio. Além

disso, atividade enzimática foi acima de 70% quando a enzima foi incubada com o peróxido de hidrogênio, por 1 hora. Porém, uma atividade residual muito pequena foi obtida com o hipoclorito de sódio (Saxena et al., 2007).

Considerando o efeito de EDTA, a enzima do presente estudo manteve aproximadamente 53% da atividade original quando incubada por 1 hora a 50 °C. A  $\alpha$ -amilase de *Bacillus* sp. PS-7 manteve cerca de 100% da atividade quando 1 mM de EDTA foi adicionado à mistura de reação (Sodhi et al., 2005). O efeito do EDTA em amilases produzidas por espécies de *Bacillus* alcalofílicos varia consideravelmente, sendo que algumas não são afetadas na presença de EDTA a concentrações altas de 100 mM (Hagihara et al., 2001), e, por outro lado, outras são completamente inibidas em baixas concentrações de 1 mM (Kim et al., 1995).

Estudos sobre o efeito dos detergentes na atividade da  $\alpha$ -amilase de *Bacillus* sp. SMIA-2 mostraram que a atividade da enzima aumentou quando foi incubada na presença do detergente marca Omo<sup>®</sup> e foi semelhante ao controle quando a marca Campeiro<sup>®</sup> foi utilizada. Entretanto, a enzima foi severamente inibida pelos detergentes Ultra-Biz<sup>®</sup> e Cheer<sup>®</sup> (Figura 8).

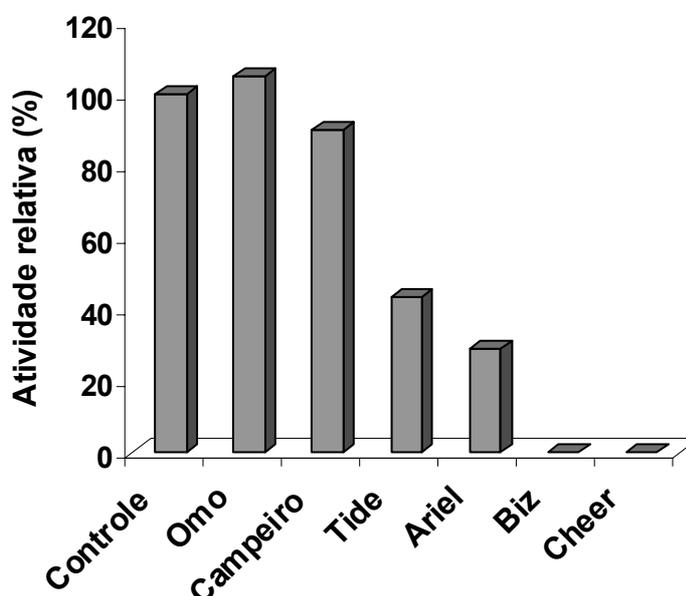


Figura 8 - Compatibilidade da  $\alpha$ -amilase de *Bacillus* sp. espécie SMIA-2 com detergentes comerciais. A atividade é expressa como percentual da atividade enzimática encontrada na ausência de detergentes (100% da atividade enzimática = 34,93 U/ml).

A compatibilidade da  $\alpha$ -amilase produzida pelo *Bacillus* sp. SMIA-2 com certos detergentes comerciais foi determinada durante 60 minutos a 50 °C. A enzima manteve cerca de 86%, 85% e 75% da atividade, após 20 minutos de incubação a 50 °C, na presença de detergentes em pó das marcas: Omo<sup>®</sup>, Campeiro<sup>®</sup> e Tide<sup>®</sup>, respectivamente (Figura 9). Após 40 minutos, estas marcas Tide<sup>®</sup>, Omo<sup>®</sup> e Campeiro<sup>®</sup> mantiveram 49%, 47% e 40% da atividade a 50 °C, respectivamente.

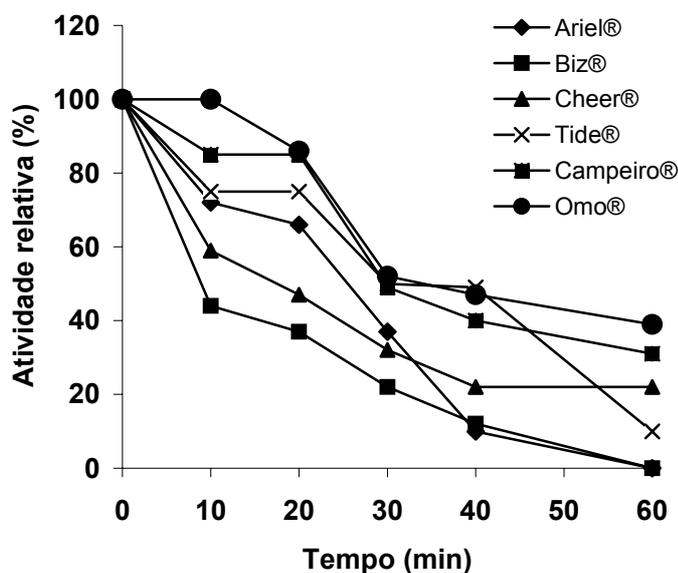


Figura 9 – Estabilidade da  $\alpha$ -amilase, produzida por *Bacillus* sp. espécie SMIA-2, em detergentes comerciais. A atividade é expressa como percentual da atividade enzimática encontrada na ausência de detergentes. Os detergentes estudados foram  $\blacklozenge$  Ariel<sup>®</sup>,  $\blacksquare$  Ultra Biz<sup>®</sup>,  $\blacktriangle$  Cheer<sup>®</sup>,  $\times$  Tide<sup>®</sup>,  $\blacksquare$  Campeiro<sup>®</sup>,  $\bullet$  Omo<sup>®</sup> (100% da atividade enzimática = 47 U/ml).

#### 4. CONCLUSÕES

O *Bacillus* sp. SMIA-2 cresceu e secretou  $\alpha$ -amilase quando cultivado em meio contendo amido solúvel como fonte de carbono e suplementado com proteínas do soro de leite e peptona. A atividade da  $\alpha$ -amilase aumentou com o tempo de cultivo alcançando seu valor máximo após a população celular atingir o seu pico, já na fase estacionária.

O pH ótimo da  $\alpha$ -amilase foi de 8,5. Após a incubação da solução da enzima por 2 horas, em temperatura ambiente, em pH 9,5 e 11,0, foi observado um decréscimo de aproximadamente 6,3% e 16,5% da atividade original. Em pH 6,0, a enzima perdeu aproximadamente 36% de sua atividade original, mostrando, assim, que a enzima foi ativa numa ampla faixa de pH.

A temperatura ótima encontrada para a  $\alpha$ -amilase foi de 90 °C, sendo que esta mesma enzima apresentou uma maior estabilidade térmica entre 40 e 50 °C por 1 hora.

A  $\alpha$ -amilase de *Bacillus* sp. SMIA-2 foi pouco afetada pela presença de íons metálicos, com exceção de  $\text{CaCl}_2$  5 mM, em que a enzima se manteve estável a 90 °C durante 30 minutos.

A enzima manteve 63% da atividade em solução com 2,0 M de NaCl, após 2 horas de incubação à temperatura de 45 °C.

A atividade da  $\alpha$ -amilase em presença de inibidores e agentes oxidantes exibiu uma baixa atividade residual na presença de hipoclorito de sódio e foi completamente inibida em peróxido de hidrogênio. Entretanto, a enzima mostrou uma atividade de 74%, por 1 hora a 50 °C, em dodecil sulfato de sódio (SDS).

Além disso, a amilase exibiu uma compatibilidade frente a alguns detergentes comerciais, mantendo 86%, 85% e 75% de atividade após 20 minutos de incubação a 50 °C na presença dos detergentes: Omo<sup>®</sup>, Campeiro<sup>®</sup> e Tide<sup>®</sup> respectivamente.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguilar, G.; Morlon-Guyot, J.; Trejo-Aguilar, B.; Guyot, J.P. (2000). Purification and characterization of an extracellular  $\alpha$ -amylase produced by *Lactobacillus manihotivorans* LMG 18010, an amylolytic lactic acid bacterium. *Enzyme and Microbial Technology*, 27:406–13.

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 and Microbial Technology*. 24, 584-589.

Aquino, A.C.M.M.; Jorge, J.A.; Terenzi, H.F.; Polizeli, M.L.T.M. (2003). Studies on a thermostable  $\alpha$ -amylase from the thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61, 323–328.

Asgher, M.; Asad, M.J.; Rahman, S.U.; Legge, R.L. (2007). A thermostable  $\alpha$ -amylase from a moderately thermophilic *Bacillus subtilis* strain for starch processing. *Journal of Food Engineering* 79, 950-955.

Banerjee, U.C.; Sani, R.K.; Azmi, W.; Soni, R. (1999). Thermoestable alkaline protease from *Bacillus brevis* and its characterization as a laundry detergent additive. *Process Biochem.* 35, 213-219.

Bernhardsdotter, E.C.M.J.; Ng, J.D.; Garriott, O.K.; Pusey, M.L. (2005). Enzymic properties of an alkaline chelator-resistant  $\alpha$ -amylase from an alkaliphilic *Bacillus* sp. isolate L1711. *Process Biochem.* 40, 2401–2408.

Bertoldo, C.; Antranikian, G. (2002). Starch hydrolyzing enzymes from thermophilic archae and bacteria. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 6, 151–160.

Bon, E.P.S. (1995). A tecnologia enzimática no Brasil, *ENZITEC*, 95, 9–14.

Burhan, A.; Nisa, U.; Gokhan, C.; Omer, C.; Ashabil, A.; Osman, G. (2003). Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkaliphilic *Bacillus* sp. isolate ANT-6. *Process Biochem.* 38, 1397–403.

Cordeiro, C.A.M.; Martins, M.L.L.; Luciano, A.B. (2002). Production and properties of  $\alpha$ -amylase from thermophilic *Bacillus* sp. *Brazilian Journal of Microbiology* 33, 57-61.

Declerck, N.; Machius, M.; Wiegand, G.; Huber, R.; Gaillardin, C. (2000). Probing structural determinants specifying high thermostability in *Bacillus licheniformis*  $\alpha$ -amylase. *J. Mol. Biol.* 31, 1041-1057.

Duedahl-Olesen, L.; Kragh, K.M.; Zimmermann, W. (2000). Purification and characterisation of a malto-oligosaccharide-forming amylase active at high pH from *Bacillus clausii* BT-21. *Carbohydr. Res.* 329, 97–107.

Fennema, O.R. (1996). *Food Chemistry*. 3 ed. v. 76. New York.

Goyal, N.; Gupta, J.K.; Soni, S.K. (2005). A novel raw starch digesting thermostable  $\alpha$ -amylase from *Bacillus* sp. I-3 and its use in the direct hydrolysis of raw potato starch. *Enzyme and Microb. Technol.* 37, 723–734.

Gupta, R.; Gigras, P.; Mohapatra, H.; Goswami, V.K.; Chauhan, B. (2003). Microbial  $\alpha$ -amylases: a biotechnological perspective. *Process Biochemistry* 38, 1599-1616.

- Hagihara, H.; Igarashi, K.; Hayashi, Y.; Endo, K.; Ikawa-Kitayama, K.; Ozaki, K. (2001). Novel  $\alpha$ -amylase that is highly resistant to chelating reagents and chemical oxidants from the alkaliphilic *Bacillus* isolate KSM-K38. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 1744–50.
- Hashim, S.O.; Delgado, O.D.; Martínez, M.A.; Kaul, R.H.; Francis J.M.; Mattiasson, B. (2005). Alkaline active maltohexaose-forming  $\alpha$ -amylase from *Bacillus halodurans* LBK 34. *Enzyme and Microbial Technology* 36, 139–146.
- Hayashida, S.; Teramoto, Y.; Inoue, T. (1988). Production and characterization of raw starch degrading  $\alpha$ -amylase from *B. subtilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 1516–1522.
- Hayashi, T.; Akiba, T.; Horikoshi, K. (1988). Properties of new alkaline maltohexaose forming amylase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 28, 281–285.
- Hendriksen, H.V.; Pedersen, S.; Bisgard-Frantzen, H. (1999). A process for textile warp sizing using enzymatically modified starches. *Patent Application* WO 99/35325.
- Horikoshi K. (1971). Production of alkaline enzymes by alkalophilic microorganisms. *Agric. Biol. Chem.* 234, 556-561.
- Jana, M.; Pati, B. (1997). Thermostable, salt-tolerant  $\alpha$ -amylase from *Bacillus* sp. MD-124. *J. Bras. Microbiol.* 37, 323-326.
- Kim, T.U.; Gu, B.G.; Jeong, J.Y.; Byun, S.M.; Shin, Y.C. (1995). Purification and characterization of a maltotetraose-forming alkaline  $\alpha$ -amylase from an alkalophilic *Bacillus* strain, GM8901. *Appl. Environ. Microbiol.* 3105–3112.
- Konsula, Z.; Liakopoulou-Kyriakides, M. (2004). Hydrolysis of starches by the action of an  $\alpha$ -amylase from *Bacillus subtilis*. *Process Biochem.* 39, 1745–1749.
- Krishnan, T.; Chandra, A.K. (1983). Purification and characterization of  $\alpha$ -amylase from *B. licheniformis* CUMC 305. *Appl. Environ. Microbiol.* 46, 430–437.
- Lévêque, E.; Janecek, S.; Haye, B.; Belarbi, A. (2000). Thermophilic archaeal amylolytic enzymes. *Enzyme Microb. Technol.* 26, 3-14.
- Mamo, G.; Gashe, B.A.; Gessesse, A. (1999). A highly thermostable amylase from a newly isolated thermophilic *Bacillus* sp. WN11. *J. Appl. Microbiol.* 86, 557-560.
- Mamo, G.; Gessesse, A. (1999). Purification and characterization of two raw starch degrading thermostable  $\alpha$ -amylase from a thermophilic *Bacillus*. *Enzyme Microb. Technol.* 25, 433-438.
- Najafi, M.F.; Deobagkar, D.; Deobagkar, D. (2005). Purification and characterization of an extracellular  $\alpha$ -amylase from *Bacillus subtilis* AX20. *Protein Expr. and Purif.* 41, 349-354.

- Nakamura, N.; Watanabe, K.; Horikoshi, K. (1975). Purification and some properties of alkaline pullulanase from a strain of *Bacillus* 202-1, an alkalophilic microorganism. *Biochim. Biophys. Acta* 397, 188-193.
- Nguyen, Q.D.; Rezessy-Szabó, J.M.; Claeysens, M.; Stals, I.; Hoschke, A. (2002). Purification and characterisation of amylolytic enzymes from thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* strain ATCC 34626. *Enzyme and Microbial Technology* 31, 345–352.
- Nielsen, J.E.; Borchert, T.V. (2000). Protein engineering of bacterial  $\alpha$ -amylases. *Biochim Biophys. Acta.* 1543, 253–274.
- Nunes, A.S.; Martins, M.L.L. (2001). Isolation, properties and kinetics of growth of a thermophilic *Bacillus*. *Braz. J. Microbiol.* 32, 271-275.
- Phadatare, S.U.; Deshpande, V.V.; Srinivasan, M.C. (1993). High activity alkaline protease from *Conidiobolus coronatus* (NCL 86.8.20): Enzyme production and compatibility with commercial detergents. *Enzyme Microb. Technol.* 15, 72-76.
- Sajedi, R.H.; Naderi-Manesh, H.; Khajeh, K.; Ahmadvand, R.; Ranjbar, B.; Asoodeh, A.; Moradian, F. (2005). A Ca-independent  $\alpha$ -amylase that is active and stable at low pH from the *Bacillus* sp. KR-8104. *Enzyme Microb. Technol.* 36, 666–671.
- Saxena, R.K.; Dutt, K.; Agarwal, L.; Nayyar, P. (2007). A highly thermostable and alkaline amylase from a *Bacillus* sp. PN5. *Bioresour. Technol.* 98, 260-265.
- Scandurra, R.; Consalvi, V.; Chiaraluce, R.; Politi, L.; Engel, P.C. (1998). Protein thermostability in extremophiles. *Biochimie* 80, 933-941.
- Sidhu G.S.; Sharma, P.; Chakrabarti, T.; Gupta, J.K. (1997). Strain improvement for the production of a thermostable  $\alpha$ -amylase. *Enzyme Microb. Technol.* 21, 525-530.
- Sodhi, H.K.; Sharma, K.; Gupta, J.K.; Soni, S.K. (2005). Production of a thermostable  $\alpha$ -amylase from *Bacillus* sp. PS-7 by solid state fermentation and its synergistic use in the hydrolysis of malt starch for alcohol production. *Process Biochem.* 40, 525–534.
- Stanier, Y.R.; Adelberg, E.A.; Ingraham, J.L. (1976). *The Microbial World*. Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, New Jersey, 871p.
- Tomazic, S. J. (1991). Protein stabilization. In: Biocatalysts for industry. Topic in Applied chemistry. Ed. Plenum Press, New York and London. 330p.
- Van der Maarel, M.J.; Van der Veen, B.; Uitdehaag, J.C.; Leemhuis, H.; Dijkhuizen, L. (2002). Properties and applications of starch-converting enzymes of the  $\alpha$ -amylase family. *J. Biotechnol.* 94, 137–155.
- Volkin, D.B.; Klibanov, A.M. (1989). Thermal destruction processes in proteins involving cysteine. *J. Biol. Chem.* 262, 2945–2950.

Yang, C.H.; Liu, W.H. (2004). Purification and properties of a maltotriose-producing  $\alpha$ -amylase from *Thermobifida fusca*. *Enzyme and Microbial Technology* 35, 254–260.

#### 4. RESUMO E CONCLUSÕES

A influência das condições de cultivo sobre produção de  $\alpha$ -amilase pelo termofílico *Bacillus* sp. SMIA-2, algumas propriedades bioquímicas da enzima e sua compatibilidade com alguns detergentes comerciais foram estudadas.

O microrganismo foi capaz de crescer satisfatoriamente em todas as fontes de carbono testadas. Entretanto, a atividade da  $\alpha$ -amilase variou grandemente em resposta à fonte de carbono, sendo o amido solúvel, em baixa concentração (2,5 g/L), o composto que possibilitou a maior atividade enzimática.

A suplementação do meio de cultura com proteínas do soro de leite (0,25 g/L) e peptona (2 g/L) proporcionou um aumento na atividade enzimática com níveis de atividade de 63,5 U/ml, reduzindo ainda o tempo de cultivo.

A produção máxima da enzima foi observada quando o microrganismo foi crescido em meio de cultivo a 50 °C e pH inicial de 8,5.

A  $\alpha$ -amilase secretada pelo microrganismo em estudo apresentou atividade máxima em pH 8,5. Em relação à estabilidade ao pH, a  $\alpha$ -amilase manteve 93,7% e 83,5% de atividade em pH 9,5 e 11,0 respectivamente, por 2 horas de incubação à temperatura ambiente.

A temperatura ótima encontrada para atividade da  $\alpha$ -amilase foi de 90 °C, sendo que a mesma foi estável a temperaturas de 40 e 50 °C por 1 hora.

A  $\alpha$ -amilase de *Bacillus* sp SMIA-2 não requereu íons metálicos para sua atividade catalítica, com a exceção do  $\text{CaCl}_2$ , 5 mM, que aumentou a estabilidade térmica da enzima.

A atividade original da enzima foi de 63% após 2 horas de incubação em solução de 2,0 M de NaCl, a temperatura de 45 °C.

A  $\alpha$ -amilase exibiu uma baixa atividade residual na presença de hipoclorito de sódio e completa inibição em peróxido de hidrogênio. Entretanto, a enzima manteve 74% de atividade em SDS por 1 hora a 50 °C.

A amilase apresentou uma boa estabilidade nas soluções de alguns detergentes estudados, mantendo 86%, 85% e 75% de atividade após 20 minutos de incubação a 50 °C na presença dos detergentes Omo<sup>®</sup>, Campeiro<sup>®</sup> e Tide<sup>®</sup> respectivamente.

A hidrólise de diferentes amidos mostrou que, em altas temperaturas, a liberação de açúcares redutores foi favorecida, sendo que no amido de batata ocorreu em maior extensão. O efeito da temperatura na hidrólise dos amidos de milho e mandioca a 70 °C foi maior do que a 60 °C.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguilar, G., Morlon-Guyot, J., Trejo-Aguilar, B., Guyot, J.P. (2000) Purification and characterization of an extracellular  $\alpha$ -amylase produced by *Lactobacillus manihotivorans* LMG 18010, an amylolytic lactic acid bacterium. *Enzyme and Microbial Technology*, 27:406–13.
- Agrawal, M., Pradeep, S., Chandraraj, K., Gummadi, S.N. (2005) Hydrolysis of starch by amylase from *Bacillus* sp. KCA102: a statistical approach. *Process Biochemistry*, 40:2499–2507.
- 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.
- Ali, S., Hossain, Z. (1991) Characteristics of glucoamylase from *Aspergillus terreus*. *J. Appl. Bacteriol.* 71:144-146.
- Amend, J.P., Plyasunov, V. (2001) Carbohydrates in thermophilic metabolism: calculation of the standard thermodynamic properties of aqueous pentoses and hexoses at elevated temperatures and pressures. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 21:3901-3917.
- 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.

- Aquino, A.C.M.M., Jorge, J.A., Terenzi, H.F., Polizeli, M.L.T.M. (2003) Studies on a thermostable  $\alpha$ -amylase from the thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61:323–328.
- Arbige, M.V., Pitcher, W.H. (1989) Industrial enzymology: a look towards the future. *Trends in Biotechnology*, 7:330-335.
- Asgher, M., Asad, M.J., Rahman, S.U., Legge, R.L. (2007) A thermostable  $\alpha$ -amylase from a moderately thermophilic *Bacillus subtilis* strain for starch processing. *Journal of Food Engineering*, 79:950-955.
- Bajpai, P., Bajpai, P. (1989) High-temperature alkaline  $\alpha$ -amylase from *Bacillus licheniformis* TCRDC-B13. *Biotechnology and Bioengineering*, 33:72-78.
- Bajpai, P., Verna, N., Neer, J., Bajpai, P.K. (1991) Utilization of cheese whey for production of  $\alpha$ -amylase enzyme. *Journal of Biotechnology*, 18:265-270.
- Bajpai, P., Gera, R.K., Bajpai, P.K. (1992) Optimization studies for the production of  $\alpha$ -amylase using cheese whey medium. *Enzyme and Microbial Technology*, 14:679-683.
- Banerjee, U.C., Sani, R.K., Azmi, W., Soni, R. (1999) Thermoestable alkaline protease from *Bacillus brevis* and its characterization as a laundry detergent additive. *Process Biochemistry*, 35:213-219.
- Bernhardsdotter, E.C.M.J., Ng, J.D., Garriott, O.K., Pusey, M.L. (2005) Enzymic properties of an alkaline chelator-resistant  $\alpha$ -amylase from an alkaliphilic *Bacillus* sp. isolate L1711. *Process Biochemistry*, 40:2401–2408.
- Bertoldo, C., Antranikian, G. (2002) Starch hydrolyzing enzymes from thermophilic archae and bacteria. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 6:151–160.
- Bigelis, R. (1993) Carbohydrates. In: Nagodawithana, T., Reed, G. (eds.) *Enzymes in food processing*. 3 ed. New York: Academic Press, p. 121-158.
- Bocchini, D.A., Oliveira, O.M.M.F., Gomes, E., Silva, R. (2005) Use of sugarcane bagasse and grass hydrolysates as carbon sources for xylanase production by *Bacillus circulans* D1 in submerged fermentation. *Process Biochemistry*, 40:3653-3659.
- Bon, E.P.S. (1995) A tecnologia enzimática no Brasil. *ENZITEC 95*, 9–14.
- Bon, E.P.S. (2006) Mercado brasileiro interno e externo de enzimas industriais e especiais. *VII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática, ENZITEC 2006*, p. 1.
- Bravo, C.E.C., Carvalho, E.P., Schwan, R.F., Gómez, R.J.H.C., Pilon, L. (2000) Determinação de condições ideais para a produção de poligalacturonase por *Kluyveromyces marxianus*. *Ciência e Agrotecnologia*, 24:137-152.
- Bruchmann, E. (1980) *Bioquímica técnica*. Zaragoza: Editorial Acribia, 233p.

- Burbidge, E., Collier, B. (1968) Production of bacterial amylases. *Process Biochem.*, 3:53-56.
- Burhan, A., Nisa, U., Gokhan, C., Omer, C., Ashabil, A., Osman, G. (2003) Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkaliphilic *Bacillus* sp. isolate ANT-6. *Process Biochem.* 38:1397–1403.
- Carlsen, M., Nielsen, J., Villadsen, J. (1996) Growth and  $\alpha$ -amylase production by *Aspergillus oryzae* during continuous cultivations. *Journal of Biotechnology*, 45:81-93.
- Cherry, H.M., Hussain, T., Anwar, M.N. (2004) Extracellular glucoamylase from the isolate *Aspergillus fumigatus*. *Pak. J. Biol. Sci.* 7 (11):1988–1992.
- Coleman, G. (1967) Studies in the regulation of extracellular enzyme synthesis by *Bacillus subtilis*. *J. Gen. Microbiol.*, 49:421-431.
- Cordeiro, C.A.M., Martins, M.L.L., Luciano, A.B. (2002) Production and properties of  $\alpha$ -amylase from thermophilic *Bacillus* sp. *Brazilian Journal of Microbiology*, 33:57-61.
- Coronado, M.J., Vargas, C., Hofemeister, J., Ventosa, A., Nieto, J.J. (2000) Production and biochemical characterization of an  $\alpha$ -amylase from the moderate halophile *Halomonas meridiana*. *FEMS Microbiology Letters*, 183:67-71.
- Crabb, W.D., Mitchinson, C. (1997) Enzymes involved in the processing of starch to sugars. *Tibtech*, 15:349-352.
- Cruz, R., Ciacco, C.F. (1980) *Fabricação de amido e sua utilização*. Série: Tecnologia Agroindustrial – Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia – FTPT, 152p.
- Declerck, N., Machius, M., Wiegand, G., Huber, R., Gaillardin, C. (2000) Probing structural determinants specifying high thermostability in *Bacillus licheniformis*  $\alpha$ -amylase. *J. Mol. Biol.* 31:1041-1057.
- Demirkan, E.S., Mikami, B., Adachi, M., Higasa, T., Utsumi, S. (2005)  $\alpha$ -Amylase from *B. amyloliquefaciens*: purification, characterization, raw starch degradation and expression in *E. coli*. *Process Biochemistry*, 40 (8):2629-2636.
- Dercova, K., Augustin, J., Krajcova, D. (1992) Cell growth and  $\alpha$ -amylase production characteristics of *Bacillus subtilis*. *Folia Microbiol.* 37:17-23.
- Dey, G., Mitra, A., Banerjee, R., Maiti, B.R. (2001) Enhanced production of amylase by optimization of nutritional constituents using response surface methodology. *Biochemical Engineering Journal*, 7:227–231.

- Djekrif-Dakhmouche, S., Gheribi-Aoulmi, Z., Meraihi, Z., Bennamoun, L. (2006) Application of a statistical design to the optimization of culture medium for  $\alpha$ -amylase production by *Aspergillus niger* ATCC 16404 grown on orange waste powder. *Journal of Food Engineering*, 73 (2):190-197.
- Duedahl-Olesen, L., Kragh, K.M., Zimmermann, W. (2000) Purification and characterisation of a malto-oligosaccharide-forming amylase active at high pH from *Bacillus clausii* BT-21. *Carbohydrate Research*, 329:97–107.
- Eissa, A.S., Khan, S.A. (2006) Modulation of hydrophobic interactions in denatured whey proteins by transglutaminase enzyme. *Food Hydrocolloids*, 20:543–547.
- 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.
- Fennema, O.R. (1996) *Food Chemistry*. 3 ed. v. 76. New York.
- Gosh, A., Chatterjee, B., Das, A. (1991) Purification and characterization of glucoamylase of *Aspergillus terreus* NA-170 mutant. *J. Appl. Bacteriol.* 71:162-169.
- Goyal, N., Gupta, J.K., Soni, S.K. (2005) A novel raw starch digesting thermostable  $\alpha$ -amylase from *Bacillus* sp. I-3 and its use in the direct hydrolysis of raw potato starch. *Enzyme and Microbial Technology*, 37:723–734.
- Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V.K., Chauhan, B. (2003) Microbial  $\alpha$ -amylases: a biotechnological perspective. *Process Biochemistry*, 38:1599-1616.
- Guzmán-Maldonado, H., Paredes-López, O. (1995) Amylolytic enzymes and products derived from starch: A review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 35:373-403.
- Hagihara, H., Igarashi, K., Hayashi, Y., Endo, K., Ikawa-Kitayama, K., Ozaki, K. (2001) Novel  $\alpha$ -amylase that is highly resistant to chelating reagents and chemical oxidants from the alkaliphilic *Bacillus* isolate KSM-K38. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:1744–50.
- Haki, G.D., Rakshit, S.K. (2003) Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Bioresource Technology*, 89:17-34.
- Hamilton, L.M., Kelly, C.T., Fogarty, W.M. (1999) Production and properties of the raw starch-digesting  $\alpha$ -amylase of *Bacillus* sp. IMD 435. *Process Biochemistry*, 35:27–31.
- Haq, I., Ashraf, H., Qadeer, M.A., Iqbal, J. (2003) Production of alpha-amylase by *Bacillus licheniformis* using an economical medium. *Bioresour. Technol.* 87:57–61.

- Haq, I., Ashraf, H., Qadeer, M.A., Iqbal, J. (2005) Pearl millet, a source of alpha-amylase production by *Bacillus licheniformis*. *Bioresource Technology*, 96:1201–1204.
- Harger, C., Sprada, D., Hiratsuka, E. (1982) *Amilase Fúngica*. In: Bioquímica das Fermentações. 56p.
- Hashim, S.O., Delgado, O.D., Martínez, M.A., Kaul, R.H., Francis J.M., Mattiasson, B. (2005) Alkaline active maltohexaose-forming  $\alpha$ -amylase from *Bacillus halodurans* LBK 34. *Enzyme and Microbial Technology*, 36:139–146.
- Hayashi, T., Akiba, T., Horikoshi, K. (1988) Properties of new alkaline maltohexaose forming amylase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 28:281–285.
- Hayashida, S., Teramoto, Y., Inoue, T. (1988) Production and characterization of raw starch degrading  $\alpha$ -amylase from *B. subtilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:1516–1522.
- Hendriksen, H.V., Pedersen, S., Bisgard-Frantzen, H. (1999) A process for textile warp sizing using enzymatically modified starches. *Patent Application* WO 99/35325.
- Hernández, M.S., Rodríguez, M.R., Guerra, N.P., Rosés, R.P. (2005) Amylase production by *Aspergillus niger* in submerged cultivation on two wastes from food industries. *Journal of Food Engineering*, 33:275-280.
- Holst, O., Manelius, A., Krahe, M., Marki, H., Raven, N., Sharp, R. (1997) *Comp. Biochem. Physiol.* 118A (3):415-422.
- Horikoshi K. (1971). Production of alkaline enzymes by alkalophilic microorganisms. *Agric. Biol. Chem.* 234, 556-561.
- Hough, D.W., Danson, M.J. (1999) Extremozymes. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 3 (1):39-46.
- Igarashi, K., Hatada, Y., Hagihara, H., Saeki, K., Takaiwa, M.U.T., Arai, K., Ozaki, K., Kawai, S., Kobayashi, T., Ito, S. (1988) Enzymatic properties of a novel liquefying  $\alpha$ -amylase from an alkaliphilic *Bacillus* isolated and entire nucleotide and amino acid sequences. *Appl. Environm. Microbiol.*, 64:3282-3289.
- Jaeger, K.E., Eggert, T. (2002) Lipases for biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, 13:390-397.
- Jaeger, K.E., Reetz, T.M. (1998) Microbial lipases from versatile tools for biotechnology. *Trends Biotechnol.* 16:396-403.
- Jaenicke, R., Böhm, G. (1998) The stability of proteins in extreme environments. *Currents Opinion in Structural Biology*, 8:738-748.
- Jana, M., Pati, B. (1997) Thermostable, salt-tolerant  $\alpha$ -amylase from *Bacillus* sp. MD 124. *J. Bas. Microbiol.* 37: 323-326.

- Janssen, P.H., Monk, C.R., Morgan, H.W. (1994) A thermophilic, lipolytic *Bacillus* sp., and continuous assay of its p-nitrophenyl-palmitate esterase activity. *FEMS Microbiology Letters*, 120:195-200.
- Jin, F., Li, Y., Zhang, C., Yu, H. (2001) Thermostable  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -galactosidase production from the thermophilic and aerobic *Bacillus* sp. JF strain. *Process Biochemistry*, 36:559–564.
- Joo, H.S., Chang, C.S. (2005) Production of protease from a new alkalophilic *Bacillus* sp. I-312 grow on soybean meal: optimization and some properties. *Process Biochemistry*, 40:1263-1270.
- Kambourova, M., Kirilova, N., Mandeva, R., Derekova, A. (2003) Purification and properties of thermostable lipase from a thermophilic *Bacillus stearothermophilus* MC7. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 22:307-313.
- Kelly, R.M., Peeples, T.L., Halio, S.B., Rinker, K.D., Duffaud, G.D. (1994) Extremely thermophilic microorganisms. Metabolic strategies, genetic characteristics and biotechnological potencial. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 745:409-425.
- Kilikian, B.V. (1996) Production of glucoamylase by fed-batch culture of *Aspergillus awamori* NRRL 3112. *Rev. Microbiol.* 27:137-141.
- Kim, T.U., Gu, B.G., Jeong, J.Y., Byun, S.M., Shin, Y.C. (1995) Purification and characterization of a maltotetraose-forming alkaline  $\alpha$ -amylase from an alkalophilic *Bacillus* strain, GM8901. *Appl. Environ. Microbiol.* 3105–3112.
- Kirk, O., Borchert, T.V., Fuglsang, C.C. (2002) Industrial enzyme applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 13:34351.
- Konsula, Z., Liakopoulou-Kyriakides, M. (2004) Hydrolysis of starches by the action of an  $\alpha$ -amylase from *Bacillus subtilis*. *Process Biochemistry*, 39:1745–1749.
- Konsoula, Z., Liakopoulou-Kyriakides, M. (2007) Co-production of  $\alpha$ -amylase and  $\beta$ -galactosidase by *Bacillus subtilis* in complex organic substrates. *Bioresource Technology*, 98:150-157.
- Kottwitz, B., Upadek, H., Carrer, G. (1994) Applications and Benefits of Enzymes in Detergent. *Chem. Oggi.*12:21-24.
- Krishnan T., Chandra A.K. (1983) Purification and characterization of  $\alpha$ -amylase from *B. licheniformis* CUMC 305. *Appl. Environ. Microbiol.* 46:430–437.
- Kumar, C.G., Takagi, H. (1999) Research review paper microbial Alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint. *Biotechnology Advances*, 17:561-594.

- Kumar, S., Nussinov, R. (2001) How do Thermophilic deal with heat. *CMLS Celular and molecular life Science*. 58:1216-1233.
- Kunamneni, A., Permaul, K., Singh, S. (2005) Amylase production in solid state fermentation by the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. *Journal of bioscience and bioengineering*, 100 (2):168–171.
- 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.
- Lee, J., Parulekar, S.J. (1993) Enhanced production of  $\alpha$ -amylase in fed-batch cultures of *Bacillus subtilis* TN106. *Biotechnol. Bioeng.*, 42:1142-1150.
- Lévêque, E., Janecek, S., Haye, B., Belarbi, A. (2000) Thermophilic archaeal amylolytic enzymes. *Enzyme Microb. Technol.* 26:3-14.
- Liao, H., Mc Kenzie, T., Hageman, E. (1986) Isolation of thermostable enzyme variant by cloning and selection in a thermophile. *Proceedings of the national Academy of Sciences of the United States of America*. 83:576-580.
- Lima, U.A., Aquarone, E., Borzani, W., Schimidell, W. (2001) *Coleção Biotecnologia Industrial. Processos Fermentativos e Enzimáticos*. v. 3, São Paulo: Edgard Blücher, 593p.
- Lin, L.L., Chyau, C.C., Hsu, W.H. (1998) Production and properties of a raw starch-degrading amylase from the thermophilic and alkalophilic *Bacillus* sp. TS-23. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 28:61–68.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J. (1997) *Brock-Biology of microorganisms*. 8. ed. New Jersey: Prentice hall, 986p.
- Mamo, G., Gashe, B.A., Gessesse, A. (1999) A highly thermostable amylase from a newly isolated thermophilic *Bacillus* sp. WN11. *J. Appl. Microbiol.* 86:557-560.
- Mamo, G., Gessesse, A. (1999) Purification and characterization of two raw starch degrading thermostable  $\alpha$ -amylase from a thermophilic *Bacillus*. *Enzyme and Microbial Technology*, 25:433-438.
- Mc Mahon, H.E.M., Kelly, C.T., Fogarty, W.M. (1997) Effect of growth rate on  $\alpha$ -amylase production by *Streptomyces* sp. IMD 2679. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 48:504-509.
- Meers, J.L. (1972) The regulation of  $\alpha$ -amylase production in *Bacillus licheniformis*. *J. Microbiol. Serol.*, 38:585-570.

- Messaoud, E.B., Ali, M.B., Elleuch, N., Fourati Masmoudi, N., Bejar, S. (2004) Purification and properties of a maltoheptaose - and maltohexaose-forming amylase produced by *Bacillus subtilis* US116. *Enzyme Microb. Technology*, 34:662–666.
- Miller, G.L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Anal. Chem.* 3:426-428.
- 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.
- Mitidieri, S., Martinelli, A.H.S., Camassola, S., Menguer, P.K., Scharank, A., Vainstein, M H. (2002) Detergentes biológicos biodegradáveis – avaliação das formulações do mercado. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, 26:56-60.
- Moo-Young, M., Moreira, A.R., Tengerdy, R.P. (1983) Principles of Solid-Substrate Fermentation. In: *The Filamentous Fungi, Fungal Biotechnology*. London: Smith Berry & Kristiansen Ed. p. 117-144.
- Mota, M.V.T., Ferreira, I.M.P.L.V.O., Oliveira, M.B.P., Rocha, C., Teixeira, J.A., Torres, D., Gonçalves, M.P. (2006) Trypsin hydrolysis of whey protein concentrates: Characterization using multivariate data analysis *Analytical. Food Chemistry*, 94:278–286.
- Najafi, M.F., Deobagkar, D., Deobagkar, D. (2005) Purification and characterization of an extracellular  $\alpha$ -amylase from *Bacillus subtilis* AX20. *Protein Expression and Purification*, 41 (2):349-354.
- Nascimento, W.C.A., Martins, M. L. L. (2004). Production and properties of an extracellular protease from thermophilic *Bacillus* sp. *Braz. J. Microbial.*, v. 35(1-2), p. 91-96.
- Nascimento, W.C.A. (2005) *Estudos sobre a secreção de protease por Bacillus sp. SMIA-2 e sua compatibilidade com detergentes comerciais*. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Campos dos Goytacazes, RJ, 79p.
- Nazmi, A.R., Reinisch, T., Hinz, H.J. (2006) Ca-binding to *Bacillus licheniformis*  $\alpha$ -amylase (BLA). *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 453:16-23.
- Nguyen, Q.D., Rezessy-Szabó, J.M., Claeysens, M., Stals, I., Hoschke, A. (2002) Purification and characterization of amylolytic enzymes from thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* strain ATCC 34626. *Enzyme and Microbial Technology*, 31:345-352.
- Nielsen, J.E., Borchert, T.V. (2001) Protein engineering of bacterial  $\alpha$ -amylases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1543:253-74.

- Nielsen, A.D., Pusey, M.L., Fuglsang, C.C., Westh, P. (2003) A proposed mechanism for the thermal denaturation of a recombinant *Bacillus halmapalus*  $\alpha$ -amylase the effect of calcium ions. *Biochimica et Biophysica. Acta*, 1652:52-63.
- Nigam, P., Singh, D. (1995) Enzyme and microbial systems involved in starch processing. *Enzyme and Microbial Technology*, 17:770-778.
- Novozymes (2005). Disponível em: <http://www.novozymes.com>. Acessado em julho de 2005.
- Nthangeni, M.B., Patternton, H.G., Van Tonder, A.; Vergeer, W.P., Litthauer, D. (2001) Over-expression and properties of a purified recombinant *Bacillus licheniformis* lipase; a comparative report on *Bacillus* lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, 28:705-712.
- Nunes, A.S., Martins, M.L.L. (2001) Isolation, properties and kinetics of growth of a thermophilic *Bacillus*. *Braz. J. Microbiol.* 32:271-275.
- Nyiri, L. (1971) The preparation of enzymes by fermentation. *Int. Chem. Eng.*, 11:447-457.
- Oliveira, P.C., Alves, G.M., Castro, H.F., Mei, L.H.I. (2000) Síntese do butirato de n-butila empregando lipase microbiana imobilizada em copolímero de estireno e divinilbenzeno. *Química Nova*, 23 (5):632-636.
- Pandey, A., Webb, C., Soccol, C.R., Larroche, C. (2005) *Enzyme Technology*. New Delhi: Asiatech Publishers, Inc., 760p.
- Pedersen, H., Nielsen, J. (2000) The influence of nitrogen sources on the  $\alpha$ -amylase productivity of *Aspergillus oryzae* in continuous cultures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 53:278-281.
- Peixoto, S.C., Jorge, J.A., Terenzi, H.F., De Lourdes, M., Polizeli, T.M. (2003) *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis*: a thermotolerant fungus with potential for production of thermostable amylases. *Int. Microbiol.* 6:269-273.
- Pelczar, JR. M.J., Chan, E.C.S., Krieg, N.R. (1998) *Microbiologia: Conceitos e Aplicações*, cap. 10, 4. ed, São Paulo: Makron Books, p. 258-271.
- Phadatare, S.U., Deshpande, V.V., Srinivasan, M.C. (1993) High activity alkaline protease from *Conidiobolus coronatus* (NCL 86.8.20): Enzyme production and compatibility with commercial detergents. *Enzyme and Microbial Technology* 15:72-76.
- Priest, F.G. (1977) Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*. *Bacteriol. Review*, 41:711-753.
- Quaglia, G. (1991) *Ciencia y Tecnología de la Panificación*. Zaragoza: Editorial Acribia, 485p.

- Ray, R.R., Nanda, G. (1996) Microbial  $\beta$ -amylases: Biosynthesis, characteristics, and industrial applications. *Critical Reviews in Microbiology*, 22:181-199.
- Reed, G. (1975) *Enzymes in Food Processing*. 2. ed. New York: Academic Press Inc., p. 62-87.
- 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* grow in whey. *Process Biochemistry*, 36:507-515.
- Saboury, A.A., Karbassi, F. (2000) Thermodynamic studies on the interaction of calcium with alpha-amylase. *Thermochimica acta*, 362:121-129.
- Sajedi, R.H., Naderi-Manesh, H., Khajeh, K., Ahmadvand, R., Ranjbar, B., Asoodeh, A., Moradian, F. (2005) A Ca-independent  $\alpha$ -amylase that is active and stable at low pH from the *Bacillus* sp. KR-8104. *Enzyme and Microbial Technology*, 36:666-671.
- Santos, E. O. (2000) *Efeito da composição do meio de cultura sobre a síntese de  $\alpha$ -amilase por um Bacillus sp.* Tese (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Campos dos Goytacazes, RJ, 79p.
- Santos, J.P.V., Ferreira, C.L.L.F. (2001) Alternativas para o aproveitamento do soro de queijo nos pequenos e médios laticínios. *Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, 56 (321):44-50.
- Sarikaya, E., Higasa, T., Adachi, M., Mikami, B. (2000) Comparison of degradation abilities of  $\alpha$ - and  $\beta$ -amylase on raw starch granules. *Process Biochemistry*, 35:711-715.
- Saxena, R.K., Dutt, K., Agarwal, L., Nayyar, P. (2007) A highly thermostable and alkaline amylase from a *Bacillus* sp. PN5. *Bioresource Technology*, 98 (2):260-265.
- Scandurra, R., Consalvi, V., Chiaraluce, R., Politi, L., Engel, P.C. (1998) Protein thermostability in extremophiles. *Biochimie*, 80:933-941.
- Scott, K.J. (1989) Micronutrients in milk products. *Elsevier Science Publishers*, 71-124.
- Sekiguchi, J.; Takada, N.; Okada, H. (1975) Genes affecting the productivity of  $\alpha$ -amylase in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, 121:688-694.
- Sidhu, G.S., Sharma, P., Chakrabarti, T., Gupta, J.K. (1997) Strain improvement for the production of a thermostable  $\alpha$ -amylase. *Enzyme and Microbial Technology*, 21:525-530.
- Siso, M.I.G. (1996) The biotechnological utilization of cheese whey: a review. *Bioresource Technology*, 57:1-11.

- Soccol, C.R., Rojan, P.J., Patel, A.K., Woiciechowski, A.L., Vandenberghe, L.P.S., Pandey, A. (2005) Glucoamylase. *In: Enzyme Technology*. New Delhi: Asiatec Publishers Inc. p. 221-230.
- Sodhi, H.K., Sharma, K., Gupta, J.K., Soni, S.K. (2005) Production of a thermostable  $\alpha$ -amylase from *Bacillus* sp. PS-7 by solid state fermentation and its synergistic use in the hydrolysis of malt starch for alcohol production. *Process Biochemistry*, 40:525–534.
- Stanier, Y.R.; Adelberg, E.A.; Ingraham, J.L. (1976) *The Microbial Word*. Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, New Jersey, 871p.
- Stephenson, S., Carter, N.M., Harwood, C.R., Petit-Glatron, M.F., Chambert, R. (1998) The influence of protein folding of late stages of the secretion of  $\alpha$ -amylase from *Bacillus subtilis*. *FERBS Letters*, 403:385-389.
- Stoner, M.R., Dale, D.A., Gualfetti, P.J., Becker, T., Manning, M.C., Carpenter, J.F., Randolph, T.W. (2004) Protease Autolysis in heavy-duty liquid detergent formulations: effects of thermodynamic stabilizer and protease inhibitors. *Enzyme and Microbial Technology*, 34:114-125.
- Surmely, R., Alvarez, H., Cereda, M.P., Vilpoux, O.F. (2003) Hidrólise do Amido. *In: Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas*. p. 377-395.
- Szakacs, G. (2004) Production of Industrial Enzymes in Solid-State Fermentation. *Anais of the International Congress on Bioprocess in Food Industries*. Clermont-Ferrand, France, p. 20.
- Szilágyi, A., Závodszy, P. (2000) Structural differences between mesophilic, moderately thermophilic and extremely thermophilic protein subunits: results of comprehensive survey. *Structure*, 8:493-504.
- Tanaka, A., Hoshino, E. (2002) Thermodynamic and activation parameters for the hydrolysis of amylose with *Bacillus*  $\alpha$ -amylases in a diluted anionic surfactant solution. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 93:485-490.
- Tanyildizi, M.S., Özer, D., Elibol, M. (2005) Optimization of  $\alpha$ -amylase production by *Bacillus* sp. using response surface methodology. *Process Biochemistry*, 40:2291–2296.
- Teodoro, C.E.D., Martins, M.L.L. (2000) Culture conditions for the production of thermostable amylase by *Bacillus* sp. *Braz. J. Microbiol.* 31:298-302.
- Tolan, J.S. (1996) Pulp and Paper. *In: Godfrey, T., West, S. (eds.) Industrial Enzymology*. 2. ed. New York: Stockton Press, p. 327-338.
- Tomazic, S.J. (1991) *Protein stabilization*. *In: Biocatalysts for industry. Topic in Applied chemistry*. New York and London: Plenum Press, 330p.

- Tsuchiya, K., Shinjo, A., Shimoya, K., Okazaki, M., Miura, Y. (1975) Characteristics of  $\alpha$ -amylase production by *Bacillus subtilis* KYA 741. *J. Ferment. Technol.* 53:199-206.
- Tunga, R., Tunga, B.S. (2003) *Extra-cellular Amylase Production by Aspergillus oryzae Under Solid State Fermentation*. International Center for Biotechnology. Japan: Osaka University, 12p.
- Ustáriz, F.J., Laca, A., García, L.A., Díaz, M. (2004) Fermentation of individual proteins for protease production by *Serratia marcescens*. *Biochemical Engineering Journal*, 19:147–153.
- Vallee, B.L., Stein, E.A., Summerwell, W.M., Fischer, E.M. (1959) Metal content of  $\alpha$ -amylases of various origins. *J. Biol. Chem.* 231:2901-2905.
- Van der Maarel, M.J., Van der Veen, B., Uitdehaag, J.C., Leemhuis, H., Dijkhuizen, L. (2002) Properties and applications of starch-converting enzymes of the  $\alpha$ -amylase family. *J. Biotechnol.* 94:137-155.
- Violet, M., Meunier, J.C. (1989) Kinet study of irreversible thermal denaturation of *Bacillus licheniformis*  $\alpha$ -amylase. *Biochemical Journal*, 263:665-670.
- Volkin, D.B., Klibanov, A.M. (1989) Thermal destruction processes in proteins involving cysteine. *J. Biol. Chem.* 262:2945-2950.
- Wainwright, M. (1995) *Introducción a la Biotecnología de los Hongos*. Zaragoza: Acribia, 228p.
- Ward, O. (1989) *Biotecnología de la Fermentación: Principios, Procesos y Productos*. Zaragoza: Editorial Acribia S.A. p. 64-67 e 233-247.
- Wiseman, A. (1985) *Manual de Biotecnología de las enzimas*. Ed. Acribia, Zaragoza, Espanha, 320p.
- Woose, C.R., Kandler, O., Wheelis, M.L. (1990) Towards a natural system of organisms: proposals for the domains Archaea, Bacteria and Eucarya. *Proc. Nati. Acad. Sci.* 87:4576-4579.
- Wu, J.R., Son, J.H., Kim, K.M., Lee, J.W., Kim, S.K. (2006) *Beijerinckia indica* L3 fermentation for the effective production of heteropolysaccharide-7 using the dairy by product whey as medium. *Process Biochemistry*, 41:289-292.
- Yang, C.H., Liu, W.H. (2004) Purification and properties of a maltotriose-producing  $\alpha$ -amylase from *Thermobifida fusca*. *Enzyme and Microbial Technology*, 35:254-260.
- Zamost, B.L., Nielsen, H.K., Starnes, R.L. (1991) Thermostable enzymes for industrial applications. *Journal of Industrial Microbiology*, 8:71-82.
- Zeikus, J.G. (1979) Thermophilic bacteria: ecology, physiology and technology. *Enzyme and Microbial Technology* 1:243-252.

## APÊNDICE

Quadro 1A - Resumo da análise de variância para avaliação das características densidade ótica (D.O.), pH e atividade da  $\alpha$ -amilase em função do tempo de cultivo

Fonte de variação	GL	Quadrado Médio		
		D.O.	pH	Atividade da $\alpha$ -amilase
Fonte de carbono	5	4,960*	10,612*	1256,536*
Tempo	9	3,375*	1,439*	265,320*
Fonte de carbono *tempo	45	0,389*	1,334*	71,308*
Resíduo (Erro)	120	0,008	0,099	1,508
Média		1,205	6,971	8,011
CV (%)		7,640	4,525	15,332

\* Significativo a 1% de probabilidade pelo teste F.

<sup>ns</sup> Não significativo a 1% de probabilidade pelo teste F.

Quadro 2A - Resumo da análise de variância para avaliação das características densidade ótica (D.O.), pH e atividade da  $\alpha$ -amilase em função do tempo de cultivo

Fonte de variação	GL	Quadrado Médio		
		D.O.	pH	Atividade da $\alpha$ -amilase
Concentração de amido	3	0,220*	3,919*	2068,602*
Tempo	6	7,166*	0,235*	1419,679*
Concentração de amido *tempo	18	0,034*	0,236*	260,475*
Resíduo (Erro)	56	0,003	0,018	2,493
Média		1,656	7,418	17,323
CV (%)		3,378	1,799	9,114

\* Significativo a 1% de probabilidade pelo teste F.

<sup>ns</sup> Não significativo a 1% de probabilidade pelo teste F.

Quadro 3A - Resumo da análise de variância para avaliação das características densidade ótica (D.O.), pH e atividade da  $\alpha$ -amilase em função do tempo de cultivo

Fonte de variação	GL	Quadrado Médio		
		D.O.	pH	Atividade da $\alpha$ -amilase
Concentração da proteína do soro de leite	4	0,121*	0,087*	511,661*
Tempo	4	7,390*	5,640*	5706,811*
Concentração da proteína do soro de leite * tempo	16	0,019 <sup>ns</sup>	0,029 <sup>ns</sup>	278,824*
Resíduo (Erro)	50	0,006	0,008	2,299
Média		1,411	8,001	31,931
CV (%)		5,643	1,117	4,749

\* Significativo a 1% de probabilidade pelo teste F.

<sup>ns</sup> Não significativo a 1% de probabilidade pelo teste F.

Quadro 4A - Resumo da análise de variância para avaliação das características densidade ótica (D.O.), pH e atividade da  $\alpha$ -amilase em função do cultivo de 24 horas

Fonte de variação	GL	Quadrado Médio		
		D.O.	pH	Atividade da $\alpha$ -amilase
Fonte de nitrogênio	14	1,2995*	3,335*	1073,251*
Resíduo (Erro)	30	0,022	0,020	4,506
Média		1,486	7,883	24,383
CV (%)		9,986	1,791	8,706

\* Significativo a 1% de probabilidade pelo teste F.

<sup>ns</sup> Não significativo a 1% de probabilidade pelo teste F.

Quadro 5A - Resumo da análise de variância para avaliação das características densidade ótica (D.O.), pH e atividade da  $\alpha$ -amilase em função do tempo de cultivo

Fonte de variação	GL	Quadrado Médio		
		D.O.	pH	Atividade da $\alpha$ -amilase
pH inicial	3	5,309*	3,472*	3907,370*
Tempo	4	0,013 <sup>ns</sup>	1,363*	1269,882*
pH inicial * tempo	12	0,011 <sup>ns</sup>	0,051*	107,257*
Resíduo (Erro)	40	0,007	0,003	4,442
Média		1,355	8,448	31,867
CV (%)		6,176	0,626	6,614

\* Significativo a 1% de probabilidade pelo teste F.

<sup>ns</sup> Não significativo a 1% de probabilidade pelo teste F.

Quadro 6A - Resumo da análise de variância para avaliação das características densidade ótica (D.O.), pH e atividade da  $\alpha$ -amilase em função do tempo de cultivo

Fonte de variação	GL	Quadrado Médio		
		D.O.	pH	Atividade da $\alpha$ -amilase
Temperatura	5	3,300*	1,480*	1310,877*
Tempo	2	2,047*	0,179*	1873,204*
Temperatura * tempo	10	0,275*	0,036*	248,948*
Resíduo (Erro)	36	0,005	0,006	1,669
Média		1,279	7,828	19,023
CV (%)		5,337	0,981	6,791

\* Significativo a 1% de probabilidade pelo teste F.

<sup>ns</sup> Não significativo a 1% de probabilidade pelo teste F.