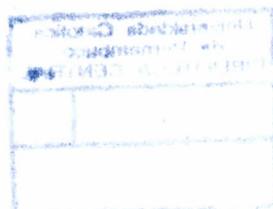


AV/60117



UNIVERSIDADE CATÓLICA DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA ACADÊMICA
COORDENAÇÃO GERAL DE PESQUISA
MESTRADO EM DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS AMBIENTAIS

DANIEL PAULO DE OLIVEIRA



**PRODUÇÃO DE AMILASE POR *Bacillus*
licheniformis UTILIZANDO MEIOS DE BAIXO CUSTO**

Recife

2007

UNICAP - BIBLIOTECA CENTRAL



DANIEL PAULO DE OLIVEIRA

**PRODUÇÃO DE AMILASE POR *Bacillus*
licheniformis UTILIZANDO MEIOS DE BAIXO CUSTO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento em Processos Ambientais Universidade Católica de Pernambuco como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em **Desenvolvimento de Processos Ambientais.**

Área de Concentração: Desenvolvimento em Processos Ambientais

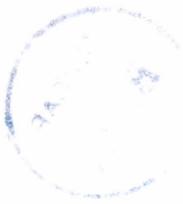
Linha de Pesquisa: Tecnologia e Meio Ambiente

Orientador: Prof. Dr. CARLOS ALBERTO ALVES DA SILVA

Co-orientador: Prof. Dra. KAORU OKADA

Recife

2007



UNIVERSIDADE CATÓLICA DE PERNAMBUCO

O48p

Oliveira, Daniel Paulo de

Produção de amilase por *Bacillus licheniformis* utilizando meios de baixo custo / Daniel Paulo de Oliveira ; orientador Carlos Alberto Alves da Silva ; co-orientador Kaoru Okada, 2007.

53 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Católica de Pernambuco. Pró-reitoria Acadêmica. Curso de Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais, 2007.

1. Diástase. 2. Microbiologia. 3. Biologia. 4. Biotecnologia industrial. I. Título.

CDU 576.8

Oliveira, Daniel Paulo

PRODUÇÃO DE AMILASE POR *Bacillus licheniformis* UTILIZANDO MEIOS DE BAIXO CUSTO

Recife, 2007. 69p.

Dissertação (Mestrado – Universidade Católica de Pernambuco. Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento de Processos Ambientais.

1. Amilase. 2. Amido de batata. 3. Amido de milho. 4. *Bacillus licheniformis*.

I. Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento de Processos Ambientais. Centro de Ciências e Tecnologia. Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento de Processos Ambientais.

PRODUÇÃO DE AMILASE POR *Bacillus licheniformis* UTILIZANDO MEIOS DE
BAIXO CUSTO

Daniel Paulo de Oliveira

Examinadores:

Prof. Dr. Carlos Alberto Alves da Silva
Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP
Orientador

Profa. Dra. Galba Maria de Campos Takaki
Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP

Profa. Dra. Norma Buarque de Gusmão
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Dedico

“Ao único DEUS, Salvador nosso, por Jesus Cristo, nosso Senhor, seja glória e majestade, domínio e poder, antes de todos os séculos, agora, e para sempre. Amém” (Judas 1:25). “Porque Dele, por Ele, e para Ele, são todas as coisas; glória pois a Ele eternamente. Amém.” (Romanos 11:36).

AGRADECIMENTOS

Ao Deus Todo Poderoso, criador do céu e terra e pai nosso (também revelado nas Sagradas Escrituras pelos nomes de Adhonai, El Shaddai, El Elohim, Elyon, Yaveh, “EU SOU” e dentre outros), pela graça da salvação por meio de Seu Filho Jesus Cristo e especialmente pela conclusão desta obra;

Ao Sr. Francisco Paulo de Oliveira e a Sra. Eunice Maria de Oliveira “meus pais” por me apresentarem o caminho que leva à vida eterna que é o nosso Senhor Jesus Cristo, pelo amor e por tudo que sempre me ofereceram segundo a misericórdia de nosso Senhor Jesus Cristo; bem como a todos os meus familiares e meus irmãos em Cristo Jesus pelo apóio, incentivo e com certeza as vossas orações que me têm sustentado de pé;

A Érica Adriana de Siqueira Barbosa “minha noiva” que tem sido uma companheira de todos os momentos;

Aos companheiros Rafael Neves, Glauber Cavalcante e Marta Cristina, que sempre se dispuseram a colaborar com os meus trabalhos, obrigado amigos;

A prof. Dra. Aline Elesbão, prof. Dra. Galba Takaki e ao prof. Dr. Valdemir Alexandre, os quais sempre colaboraram com dedicação para a realização desta obra;

Aos senhores Humberto e Salatiel, técnicos do laboratório NPCIAMB-UNICAP, pela dedicação e ajuda na realização e concretização deste trabalho;

Aos colegas de turma e de laboratório que de alguma forma contribuíram para a realização desta dissertação;

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Alves da Silva, na orientação desta dissertação e a Profa. Dra. Kaoru Okada, pela co-orientação nesta dissertação.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	iv
SUMÁRIO	v
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	x
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii

CAPÍTULO 1

PRODUÇÃO DE AMILASE POR <i>Bacillus licheniformis</i> UTILIZANDO MEIOS DE BAIXO CUSTO	
1.1 INTRODUÇÃO	1
1.2 OBJETIVOS	3
1.2.1 OBJETIVO GERAL.....	3
1.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	3
1.3 REVISÃO DA LITERATURA	4
1.3.1 AMIDO.....	4
1.3.1.1 Propriedades Químicas do Amido.....	5
1.3.1.1.1 Amilose.....	5
1.3.1.1.2 Amilopectina.....	7
1.3.1.1.3 Outros Componentes.....	8
1.3.1.2 Estrutura e Características dos Grânulos de Amido.....	9
1.3.1.2.1 Tamanho e Organização dos Grânulos de Amido	11
1.3.1.3 Propriedades Funcionais.....	13
1.3.1.3.1 Poder de Inchamento e Solubilidade dos Grânulos.....	13
1.3.2 ENZIMAS.....	14
1.3.2.1 Amilase.....	15
1.3.2.2 Alfa-Amilase.....	17
1.3.3.1 <i>Bacillus licheniformis</i>	21
1.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23

CAPÍTULO 2

PRODUÇÃO DE AMILASE EM CULTURA SUBMERSA POR *Bacillus licheniformis* UTILIZANDO MEIOS ALTERNATIVOS

Abstract.....	39
Introdução.....	39
Material e Métodos.....	39
Resultados e Discussão.....	41
Conclusões.....	42
Resumo.....	42
Referências Bibliográficas.....	43
ANEXOS.....	45

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1 -	Estrutura da amilose.....	6
Figura 2 -	Estrutura da Amilopectina.....	8
Figura 3 -	Representação esquemática do grânulo de amido.....	10
Figura 4 -	Diferentes níveis de organização dos grânulos de amido.....	12
Figura 5 -	Hidrólise enzimática das ligações α -1,4 das cadeias de amido pela amilase (α , β) e amiloglucosidase e ligações α -1,3 ou α -1,6 por enzimas desramificadoras (pululanase).....	16
Figura 6 -	Hidrólise enzimática industrial do amido em glicose e o modelo da ação das enzimas amilolíticas (amilase).....	19
Figura 7 -	A ação da α -amilase no amido.....	20

CAPÍTULO 2

Figura 1 -	Ensaio enzimático para amilase com a linhagem bacteriana de <i>Bacillus licheniformis</i> (UCP 1009), em meio AN acrescido de amido, após a adição da solução iodo-iodeto de potássio (solução lugol).....	46
Figura 2 -	Curva de crescimento do <i>Bacillus licheniformis</i> no meio contendo amido solúvel (A), durante 96hrs. Consumo de glicose pelo método do DNS (B) e produção de α -amilase (C)...	47
Figura 3 -	Diagrama de Pareto dos efeitos das variáveis utilizadas sobre a atividade da amilase produzida em <i>Bacillus licheniformis</i> . (A) Atividade amilásica (U/mL); (B) Atividade específica (U/mg).....	48
Figura 4 -	Curva de crescimento do <i>Bacillus licheniformis</i> (UCP 1009) no meio contendo amido de batata (A), durante 96hrs. Consumo de glicose pelo método do DNS (B) e produção de α -amilase (C).....	49
Figura 5 -	Diagrama de Pareto dos efeitos das variáveis utilizadas sobre a atividade da amilase no amido de batata produzida em <i>Bacillus licheniformis</i>	50

Figura 6 -	Curva de crescimento do <i>Bacillus licheniformis</i> (UCP 1009) no meio contendo amido de milho (A), durante 96hrs. Consumo de glicose pelo método do DNS (B) e produção de α -amilase (C)...	51
Figura 7 -	Diagrama de Pareto dos efeitos das variáveis utilizadas sobre a atividade da amilase no amido de milho produzida em <i>Bacillus licheniformis</i> . (A) Atividade amilásica (U/mL); (B) Atividade específica (U/mg).....	52

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1 -	Teores de Amilose e lipídeos de amido de batata e milho.....	7
Tabela 2 -	Umidade e componentes minoritários em amidos nativos.....	9
Tabela 3 -	Variação da forma e diâmetro (mm) de grânulos de amido.....	11
Tabela 4 -	Características dos grânulos de amido de batata e milho.....	11
Tabela 5 -	Características da amilose e amilopectina de amidos nativos.....	13
Tabela 6 -	Características das pastas de amidos de batata e milho.....	14
Tabela 7 -	Microrganismos produtores de alfa-amilase e características de habitat, temperatura e pH de atividade enzimática e localização da enzima.....	18

CAPÍTULO 2

Tabela 1 -	Planejamento de variáveis com 2^3	41
Tabela 2 -	Seleção de linhagens de <i>Bacillus licheniformis</i> , produtoras de amilase em meio sólido de acordo com Hankin e Anagnostakis...	45
Tabela 3 -	Valores de pH obtidos durante a produção de amilase por <i>Bacillus licheniformis</i> durante o planejamento fatorial.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS

α	Alfa
AN	Ágar Nutritivo
ATP	Adenosina Tri Fosfática
<i>B.</i>	<i>Bacillus</i>
β	Beta
cm	Centímetro
DNS	Ácido 3,5-dinitrosalicílico (C ₇ H ₄ N ₂ O ₇)
dL	Decilitro
DO	Densidade Ótica
g	Gramas
g/L	Gramas por litro
g/mol	Gramas por molécula
°C	Grau Centígrado
GP	Grau de Polimerização
h	Hora
KDa	QuiloDalton (unidade de massa molecular)
MS	Matéria Seca
mg	Miligrama
μ m	Micrômetro
μ L	Microlítro
mL	Mililitro
mm	Milímetros
nm	Nanômetro
N	Normal (normalidade)
%	Porcentagem
pH	Potencial de Hidrogênio Iônico
rpm	Rotação por minuto
sp.	Espécie
T _{gelatinização}	Temperatura de gelatinização
T _g	Tempo de Geração

U/dL	Unidade Internacional de Atividade Enzimática por Decilitro
U	Unidade internacional de atividade enzimática
U/mg	Unidade Internacional de Atividade Enzimática por Miligrama
UCP	Universidade Católica de Pernambuco
μ_{\max}	Velocidade máxima de crescimento

RESUMO

A indústria biotecnológica enzimática vem aumentando progressivamente nas últimas décadas com a utilização e produção de diversas enzimas microbianas. As amilases são enzimas que hidrolisam moléculas de amido liberando diversos produtos secundários, incluindo as dextrinas e progressivamente por unidades de glicose. Apresentam um amplo campo de aplicações na indústria de alimentos, em cervejarias e bebidas fermentadas, em cereais para alimentação infantil e ração animal, indústrias de papel e celulose, têxtil, de detergentes, química, farmacêutica e produtos de limpeza. Foram realizados ensaios de seleção em meio sólido para produção de amilase por 05 isolados de ambientes contaminados por petróleo em diferentes temperaturas (28 e 37 °C), respectivamente. Os resultados obtidos evidenciaram que o isolado *Bacillus licheniformis* UCP 1009 apresentou a formação de halo característico de 55 mm para amilase, após 72 horas de incubação. Após a seleção do microrganismo, foram realizadas fermentações para produção de amilase, substituindo o amido solúvel, pelo amido de milho e de batata, através de um planejamento fatorial 2^3 com quatro pontos centrais, tendo a variável de resposta a produção de amilase, durante 96 horas. Foram estabelecidos o perfil de crescimento microbiano, o pH, o consumo de glicose pelo método do DNS e a determinação da atividade específica da enzima. Os resultados obtidos evidenciaram que o amido de milho apresentou uma atividade específica de 0,756 U/mg, a um pH de 8,82 e uma atividade enzimática da amilase de 0,99 U/dL, demonstrando um potencial industrial.

Palavras-Chave: Amilase, Amido de batata, Amido de milho, *Bacillus licheniformis*.

ABSTRACT

The enzymatic biotechnology industry is growing up progressively in the last decades with the utilization e production of diverse microbial enzymes. Amylases are enzymes which hydrolyze starch molecules to give diverse products including dextrin's and progressively glucose units. They play a wide field of applications. In food industries, in beer industry and others fermented drinks, in cereal for baby's food and animal feed, in paper and cellulose industry, textile industry, in detergent and cleaning products industry, in chemical and pharmaceutical industry. Screening was carrying out in solid media to amylase production in 5 strains isolated from contaminated ambient by petroleum in different temperatures (28 °C and 37 °C), respectively. The results obtained evidenced that the isolated *Bacillus licheniformis* UCP 1009 showed the halo formation characteristically of the 55 mm to amylase, after 72 hours of incubation. After the selection of the microorganism, fermentations was carrying out to amylase production, replacing the soluble starch, by corn starch and potato starch, trough of factorial planning 2^3 with 4 central's points, having a amylase's production as a answering variable, during 96 hours. The microbial growth profile was established, the pH, the glucose consumption by the DNS and determination of specific enzyme activity. The results obtained evidenced that the corn starch shown an specific activity of 0.756 U/mg, at a pH of 8.82 and a enzymatic activity of amylase 0.99 U/dL, showing a industrial potential.

Keywords: Amylase, Potato starch, Corn starch, *Bacillus licheniformis*.

CAPÍTULO 1

1.1 Introdução

As enzimas são substâncias orgânicas específicas compostas por polímeros de aminoácidos, que atuam como catalisadores no metabolismo dos seres vivos (ROSAS, 2003). São imprescindíveis a qualquer ser vivo, pois aceleram todas as reações químicas que mantêm e regulam os diversos processos vitais. Elas são capazes de atuarem especificamente nas principais macromoléculas biológicas (proteínas, carboidratos, lipídeos e ácidos nucléicos), como também em moléculas que apresentam pesos moleculares menores, como os aminoácidos, os açúcares e as vitaminas (CHIRUMAMILLA et al., 2001; SAID e PIETRO, 2004).

De acordo com Harger (1982), as enzimas são obtidas de três grandes fontes: vegetais superiores (papaína do mamão, bromelina de abacaxi, ficina do figo); animais superiores (enzimas pancreáticas, pepsina, catalase, renina) e por microrganismos de origem fúngica ou bacteriana (amilase, protease, pectinase, invertase, glicose-oxidase, celulase, fitase, glicose-isomerase).

Nos últimos anos, as enzimas têm sido os produtos microbianos mais explorados na indústria biotecnológica, sendo utilizadas amplamente no processamento de alimentos, na produção de detergentes biológicos, nas indústrias têxtil e farmacêutica, nos processos bioquímicos, na biologia molecular (HAKI e RAKSHIT, 2003; KANDRA, 2003; SAID e PIETRO, 2004).

A ampla utilização das enzimas microbianas vem ser reflexo da sua elevada especificidade de sua atuação, como excelentes biocatalizadores. A existência de enzimas com o mesmo perfil de atuação sob um mesmo substrato, gera um bom funcionamento no pH, na temperatura e em diversas concentrações iônicas. Devido a presença dessas variáveis, se faz necessário a utilização de um selecionamento enzimático para adequar as condições em que as mesmas serão utilizadas (LOWE, 1992; NAESSENS e VANDAMME, 2003).

A α -amilase é usada extensivamente em indústrias da liquefação do amido, de papel, de alimentos, farmacêutica e de açúcar (AKHER et al., 1973; NIGAM e SINGH, 1995). A alfa-amilase é essencial nos processos de conversão dos amidos em oligossacarídeos (GHOSH e CHANDRA, 1984; McMAHON et al., 1999; PEDERSON e NIELSEN, 2000). Algumas tentativas têm sido feitas recentemente para a produção da α -amilase sob circunstâncias da fermentação em estado sólido (HAQ et al., 1998).

As amilases estão entre as enzimas industriais mais importantes e são de grande interesse na biotecnologia, pois ocorrem amplamente em animais, plantas e

microrganismos. Devido às inúmeras vantagens que apresentam como o menor tempo de produção, as amilases microbianas têm a preferência do mercado de enzimas. A produção de enzimas amilolíticas por via microbiana vem sendo alvo de intensas pesquisas científicas e tecnológicas, tanto no aspecto da otimização do processo de produção, como no melhoramento genético de microrganismos (PANDEY et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2007).

Trabalhos envolvendo fermentações submersas da α -amilase utilizando meios sintéticos foram relatadas por diversos autores (TIGUE et al., 1995; HAQ et al., 1997; HAMILTON et al., 1999).

Neste trabalho foi estudado a utilização de meios alternativos, substituindo o amido solúvel por amido de batata e de milho para produção da alfa amilase por *Bacillus licheniformis* através de um planejamento fatorial 2^3 com 4 níveis de variância.

1.2 Objetivos

1.2.1 Geral

Estudar o potencial biotecnológico das cinco linhagens (UCP 1014, 1016, 1008, 1009, 1010) de *Bacillus licheniformis* na produção de α -amilase utilizando meios de baixo custo.

1.2.1 Específicos

- ✓ Selecionar isolados de *Bacillus licheniformis* com potencial para produção de amilase, utilizando protocolos convencionais;
- ✓ Acompanhar a temperatura e o pH na produção de amilase pelas linhagens selecionadas;
- ✓ Investigar a obtenção de um meio econômico para produção da enzima amilase através da substituição do substrato amido solúvel por amidos de fontes alternativas de baixo custo.
- ✓ Utilizar um planejamento fatorial para selecionar um número fixo de níveis e para cada uma das variáveis escolhidas, executar experimentos para todas as possíveis combinações dos níveis dos fatores.

1.3 Revisão da Literatura

1.3.1 Amido

O amido é o principal componente de muitos cereais, representando cerca de 45 a 80% da composição, estando presente nas raízes e nos tubérculos. O amido é quimicamente um polissacarídeo heterogêneo, composto de dois polímeros de glicose: a amilose que contém ligações α -1,4 e a amilopectina em que as correntes lineares residual de glicose α -1,4 são interligadas pelas cadeias α -1,6 (FRENCH, 1973; GUILBOT e MERCIER, 1985).

A despolimerização do amido pelas amilases é a base para diversos processos industriais, tais como a preparação de soros de glicose, pão na indústria de panificação. A partir do século XX, a indústria tem se empenhado em processar amidos em larga escala. A descoberta de preparações enzimáticas capazes de decompor o amido em glicose, incentivou a substituição das reações de hidrólise ácida pelas reações de hidrólise enzimáticas (VAN DER MAAREL et al., 2002). A hidrólise enzimática, de amidos, tem substituído a hidrólise ácida em mais de 75% dos processos devido a várias vantagens incluindo seu alto rendimento (KANDRA, 2003).

No processo completo da hidrólise, o amido é convertido em uma mistura de vários oligossacarídeos e dextrinas diferentes pelo uso da enzima α -amilase. Essas maltodextrinas são ligeiramente doces, e são submetidas a mais uma conversão pela adição de outras enzimas promotoras do desdobramento total das moléculas de amilose ou amilopectina, que ao se romperem transformam-se em dextrinas cada vez mais simples e após algumas reações químicas, finalmente em glicose (JACQUES et al., 1999).

O mercado mais expressivo para a α -amilase converge para produção de amidos hidrolisados como a glicose e frutose. O amido é convertido em xarope de glicose e frutose que, devido a sua propriedade adoçante, é utilizado em grande quantidade em indústrias de bebidas na produção de refrigerantes (GUPTA et al., 2003).

A indústria de panificação é uma grande consumidora tanto de amidos quanto de enzimas transformadoras de amidos. A enzima α -amilase gera compostos fermentáveis, elevando assim o poder fermentativo, melhorando a cor e também um efeito de preservação, aumentando a vida útil nas prateleiras, além de incrementar a maciez de produtos panificados (VAN DER MAAREL et al., 2002; GUPTA et al., 2003).

1.3.1.1 Propriedades Químicas do Amido

O amido, pode ser considerado um carboidrato de estrutura complexa, formado de monossacarídeos (glicose) ligados entre si e representado pela fórmula geral $(C_6H_{10}O_5)_n + xH_2O$. O amido é acumulado nas plantas às custas de resíduos de glicose formados durante o processo de fotossíntese. Essas glicoses unidas pela ação de enzimas, na presença de ATP, formam cadeias longas do amido. A união entre duas ou mais moléculas de glicose é feita por ligação glicosídica, do tipo alfa. O reconhecimento do tipo de ligação é muito importante na definição das propriedades dos polissacarídeos. As ligações glicosídicas do tipo alfa, em conjunto, formam uma hélice oca. Quando uma solução contendo iodo é colocada em contato com o amido, as moléculas alojam-se no interior dessa hélice, formando um complexo amido-iodo de cor azul intensa. Essa reação é uma das ferramentas mais importantes para se acompanhar e compreender as propriedades do amido e a ação de agentes físicos e químicos sobre ele. A estrutura helicoidal do amido é formada por deposição radial de dois componentes: amilose e amilopectina, polímeros esses que influem sobre as propriedades do amido (FRANCO et al., 2001).

1.3.1.1.1 Amilose

A amilose é um polissacarídeo composto de unidades de $\alpha(1\rightarrow4)$ D-glicose unidas em longa cadeia predominantemente lineares. A amilose durante a distensão de sua estrutura helicoidal não ramificada apresenta a propriedade de absorver até 25 vezes seu peso em água. Em presença de iodo colore-se de azul intenso. Apenas uma das extremidades é redutora, a que corresponde ao carbono 1 (FRANCO et al., 2001).

A amilose é um polímero essencialmente linear, mas recentemente evidências sugerem a presença de algumas ramificações (9-20 ramificações) em $\alpha(1\rightarrow6)$ nesse polímero (FRENCH, 1973; HIZUKURI et al., 1981; BULÉON et al., 1998; HOOVER, 2001). Essas ramificações são favorecidas com o aumento do peso molecular da amilose, que varia de 10^5 a 10^6 g/mol (BULÉON et al. 1998). Modelos simplificados para a estrutura de amilose são apresentados na Figura 1. Embora ilustrada tipicamente por uma estrutura linear de cadeia, a amilose de fato é freqüentemente helicoidal. O interior da hélice contém átomos de hidrogênio sendo, portanto, hidrofóbico e permite que a amilose forme complexos com ácidos graxos livres, com componentes glicéridos dos ácidos graxos, com alguns alcoóis e com iodo. A complexação com iodo é uma importante ferramenta de diagnóstico para caracterização do amido (THOMAS e ATWELL, 1999).

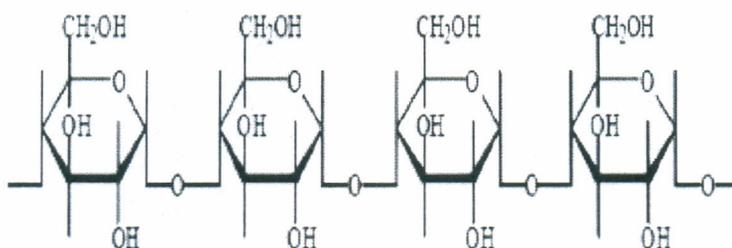


Figura 1 – Estrutura da amilose
Fonte: MATUDA, 2004

Outro atributo conhecido da amilose é sua habilidade de formar pasta depois do grânulo de amido ter sido cozido, isto é, gelatinizado. Este comportamento é evidente em certos amidos que contêm maiores teores de amilose. Amido de milho, trigo, arroz e particularmente amido de milho com alto teor de amilose (*high-amylose*), isolado de plantas híbridas de milho são usualmente considerados amidos formadores de pasta. A formação da pasta decorre principalmente da re-associação (chamado de retrogradação) dos polímeros de amido solubilizados depois de cozidos e pode acontecer bem rapidamente com polímeros de cadeia linear (THOMAS; ATWEEL, 1999).

A amilose é um dos componentes responsáveis pela estrutura do grânulo de amido e sua quantificação é de grande importância para se entender o comportamento do amido. O teor de amilose é comumente medido por métodos que envolvem a reação com iodo, como potenciométricos, amperométricos, ou espectrofotométricos pela medida da absorbância do complexo amido-iodo (*Blue value*) (GERARD et al., 2001; PERONI, 2003).

Esses métodos se baseiam na capacidade que a estrutura helicoidal da amilose tem em formar complexos de inclusão com iodo, apresentando uma coloração azul característica, pela absorção máxima no comprimento de onda de 620 nm. Quanto maior a afinidade por iodo, maior será o teor de amilose do amido. O teor de amilose apresentado em trabalhos científicos é geralmente expresso como teor de amilose aparente, isto devido à capacidade de algumas cadeias ramificadas externas de amilopectina interagirem com o iodo superestimando o teor de amilose (JANE et al., 1999; KASEMSUWAM, 1995;).

As características físico-químicas e suas propriedades, podem ser em sua maior parte explicada pelos teores de amilose. Na Tabela 1 é possível visualizar alguns teores de amilose de amidos de fontes tropicais determinados por alguns autores.

Tabela 1– Teores de Amilose e lipídeos de amido de batata e milho

Fonte	% de amilose	% de lipídeos
Batata	25,4 ¹	0,60 ²
Milho	24,5 ³	0,05 a 0,1 ²

Fonte: 1 HOOVER (2001); 2 MESTRES (1996); 3 ZHENG e SOSULSKI (1998)

1.3.1.1.2 Amilopectina

Como a amilose, é formada de ligações $\alpha(1\rightarrow4)$ nas porções retilíneas, diferindo desta, porém, por apresentar muitas ramificações devido a presença de ligações $\alpha(1\rightarrow6)$ entre cadeias de glicose. Resulta em coloração avermelhada quando em contato com solução de iodo. De cada 20 a 30 moléculas de glicose, ocorre ponto de ramificação. Essa característica a torna mais susceptível que a amilose à ação de certas enzimas, o que é fator importante para explicar a ação de enzimas sobre o amido e sua aplicação em processos industriais (FRANCO et al., 2001).

A amilopectina foi descrita por Buléon et al.(1998), Franco et al. (2001), Hoover (2001) como uma grande molécula altamente ramificada. As moléculas de amido desenvolvem-se a partir de uma única unidade de α - D - glucopiranosil que são adicionadas seqüencialmente, doadas pelas moléculas de adenosina difosfato glicose para produzir uma cadeia de unidades α - D - glucoporinanosil unidas por ligações $\alpha(1\rightarrow4)$, como pode ser observado na Figura 2. Além da enzima que aumenta o tamanho da cadeia, a enzima ramificadora está ativa. Esta por sua vez, precisa de uma cadeia linear de 40 a 50 unidades antes de transferir uma porção de cadeia, que se torna uma ramificação de ligação $\alpha(1\rightarrow6)$, e depois disto, ambos os terminais não redutores podem continuar sendo alongados. Esses pontos de ligação das ramificações constituem 4 a 5% do total de ligações. A molécula de amilopectina é constituída por uma cadeia principal, chamada cadeia C, que possui um grupamento final não redutor e numerosas ramificações, chamadas de cadeias B, nas quais o terceiro tipo de cadeia, as cadeias A, são fixadas. A amilopectina está presente em todos os amidos conhecidos, constituindo em torno de 75% dos amidos mais comuns e possui peso molecular de 10^7 a 10^9 g/mol, dependendo de sua origem (FRANCO et al., 2001).

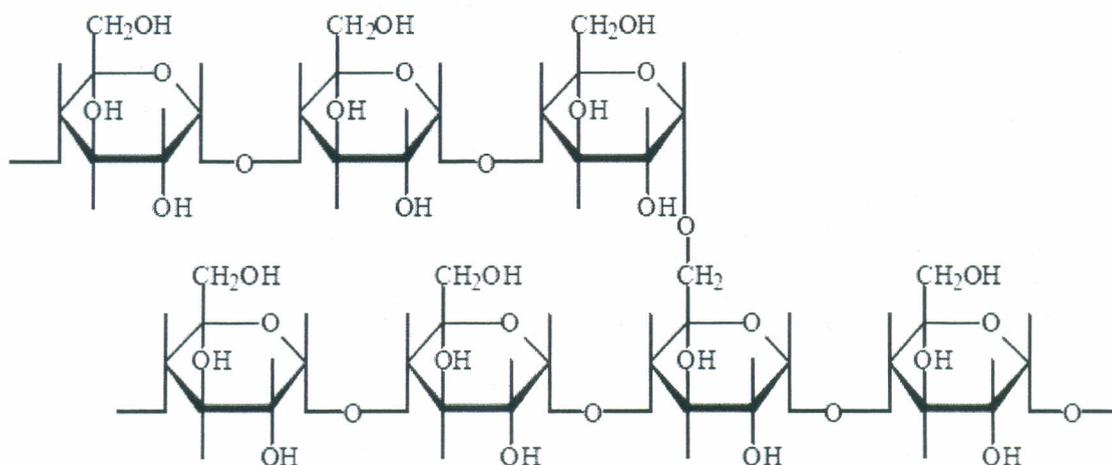


Figura 2 – Estrutura da Amilopectina
Fonte: MATUDA, 2004

A diferença na proporção relativa entre a amilose e amilopectina depende diretamente da cultura. Características relacionadas à estrutura dos grânulos de amido, tais como teor de amilose, entre outros, afetam profundamente as propriedades funcionais do amido (JANE et al., 1999).

A compreensão da estrutura dos grânulos de amido, segundo Peroni (2003) em sua dissertação de mestrado é importante para o entendimento das propriedades físico-químicas, as quais determinam o seu comportamento nos mais diversos processos industriais. A estrutura fina da amilopectina tem sido assunto de pesquisas durante os últimos anos. Vários modelos estruturais têm sido propostos para explicar o modo das cadeias unitárias arranjam-se para proporcionar estrutura altamente ramificada (FRANCO et al., 2001; WANG et al., 1993).

1.3.1.1.3 Outros Componentes

O amido é constituído apenas de carboidratos. No entanto, o produto industrial apresenta como acompanhante substâncias tais como matéria graxa, proteínas e cinzas (tabela 2). Essas substâncias são parte da própria planta de onde o amido foi extraído. A quantidade delas no amido depende da composição da planta e do método de extração e purificação. Quanto menor o teor destas substâncias, melhor a qualidade do amido. Teores menores também refletem processos de extração e purificação mais eficientes (FRANCO et al., 2001).

Ácidos graxos livres e lisofosfolípeios formam complexos de inclusão com amilose. Estes complexos existem no amido natural e não são artefatos formados durante o isolamento e purificação do mesmo (MORRISON, 1996).

Kasemsuwan e Jane (1996) comentam a importância do teor de fósforo no amido. O conteúdo de fósforo na matéria seca varia de 0,003% em amido de milho ceroso a 0,09% em fécula de batata.

O fósforo pode aparecer em duas formas: fósforo mono-éster e fosfolipídeos, que apresentam papéis opostos sobre as propriedades da pasta. O fosfato mono-éster aumenta a transparência e a viscosidade da pasta é mais freqüente nas féculas de raízes e tubérculos. Os fosfolipídeos tornam a pasta mais opaca e menos viscosa (FRANCO et al., 2001).

Tabela 2 - Umidade e componentes minoritários em amidos nativos

Composição	Batata	Milho
% Umidade	16 a 18	10 a 12
% Matéria seca		
Lipídios	0,05	0,70
Proteína	0,06	0,35
Cinzas	0,40	0,10
Fósforo	0,09	0,02

Fonte: Adaptado de ALEXANDER (1995)

1.3.1.2 Estrutura e Características dos Grânulos de Amido

O amido é a principal substância de reserva nas plantas superiores, fornecendo de 70 a 80% das calorias consumidas pelo homem. É considerado um dos principais componentes da maioria dos vegetais, e os depósitos permanentes de amido nas plantas ocorrem principalmente nos órgãos de reserva como é o caso de grãos de cereais (arroz, milho e trigo) e de leguminosas (feijão, ervilha, lentilha) e em tubérculos e raízes (batata, mandioca, taro, inhame) (CIACCO; CRUZ, 1987; GEBRE-MARIAN et al., 1998; JANOUSKOVA et al., 2001). De todos os polissacarídeos, o amido é o único produzido em pequenos agregados individuais, denominados grânulos (WHISTLER; DANIEL, 1993).

A biossíntese do amido ocorre em uma organela subcelular especializada, o amiloplasto, que possui uma membrana lipoprotéica limitante. Dentro dos amiloplastos estão as enzimas que catalisam a biossíntese da amilose e amilopectina. O material inicial para a biossíntese do amido é a sacarose, que é transportada dos tecidos fotossintéticos da planta em desenvolvimento para os órgãos de armazenamento. A formação das cadeias poliméricas do amido ocorre em uma matriz lipoprotéica e o amiloplasto em

desenvolvimento contém materiais lipídicos e protéicos, ambos na membrana que constitui o envoltório do mesmo e nas membranas da matriz interna no interior dos mesmos. O desenvolvimento do grânulo de amido dentro do amiloplasto ocupa uma proporção crescente do volume até que, com o grânulo totalmente desenvolvido, o volume interno é completamente ocupado pelo amido (GALLIARD; BOWLER, 1987).

O amido é constituído de carboidratos, no entanto, substâncias como lipídeos, proteínas, cinzas e sais minerais estão presentes em sua composição em pequenas quantidades. A quantidade destes constituintes no amido depende da composição da planta e do método de extração. Quanto menor o teor dessas substâncias, melhor a qualidade do amido. As proteínas, que também aparecem em menores teores nos amidos de raízes e tubérculos pouco influenciam suas propriedades tecnológicas. Os lipídeos que permanecem nos amidos de cereais são responsáveis pela fixação de cor, desenvolvimento de aromas e complexações que não ocorrem nos amidos de tuberosas. Nestes, os teores de lipídeos são mais baixos, o que faz destes amidos os mais neutros e menos sujeitos a complexação (PERONI, 2003).

O amido é composto por dois polímeros de estruturas diferentes; a amilose é essencialmente linear consistindo de unidades de D-glicose unidas entre si por ligações glicosídicas $\alpha(1\rightarrow4)$ e a amilopectina, molécula muito grande e altamente ramificada constituída de unidades D-glicose ligadas em $\alpha(1\rightarrow4)$, e essas cadeias por sua vez estão ligadas entre si por ligações $\alpha(1\rightarrow6)$ (BELLO-PEREZ et al., 1996; ELLIS et al., 1998; SASAKI et al., 2000). A proporção de amilose e amilopectina, e suas respectivas estruturas moleculares diferenciam os amidos de origens botânicas distintas e até mesmo de cultivo em diferentes condições (KITAHARA; COPELAND, 2004). O massa molecular da amilose varia de 1×10^5 a 1×10^6 g/mol e o da amilopectina varia de 1×10^7 a 5×10^8 g/mol (YOU, et al., 2002). A estrutura e a organização do grânulo são apresentadas na Figura 3.

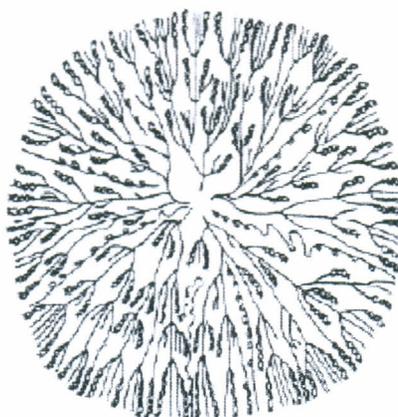


Figura 3 – Representação esquemática do grânulo de amido
Fonte: LINEBACK, 1986 apud FENIMAN, 2004 p.8.

1.3.1.2.1 Tamanho e Organização dos Grânulos de Amido

O tamanho dos grânulos de amido está compreendido entre 1 a 100 μm (EVANS; HAISMAN, 1979). Tamanho e forma dos grânulos variam com a espécie, enquanto que a distribuição de tamanho varia com o estágio de desenvolvimento da planta e forma de tuberização (Tabela 3).

Tabela 3 - Variação da forma e diâmetro (μm) de grânulos de amido

Nome científico	Forma	Diâmetro (μm)	
		Maior	Menor
Batata	Elipsóide	31	23
Milho	Poliédrica	15	12

Fonte: HURTADO et al., 1997

Os grãos de amido de milho são descritos na literatura como sendo simples e tendo suas camadas de deposição muito tênues, sendo de aproximadamente 0,5 micrômetros a espessura de cada camada, com algumas sendo de apenas 0,1 micrômetro, fazendo com que a distinção entre estas camadas através de microscópio ótico seja muito difícil, ao contrário do que ocorre com o amido de batata, cujas camadas possuem espessura em torno de 2 a até 7 micrometros, tornando-as bem distintas entre si (WHISTLER and TURNER, 1955). A tabela 4 apresenta as características dos grânulos de amido de milho e de batata que são comercialmente explorados.

Tabela 4. Características dos grânulos de amido de batata e milho

Característica	Batata	Milho
Tipo *	Tubérculo	Cereal
Formato*	Oval, esférico	Redondo, poligonal
Grânulo (μm)	5-100	2-30
Peso médio (mm) *	40	15
Nº Grânulos/g amido x 10 ⁶ *	60	1300
% Amilose	21	28
T _{gelatinização} (°C)	58-65	62-80
Viscosidade	Muito alta	Média
Clareza	Translúcida	Opaca
Tendência a retrogradação	Média baixa	Alta

Fonte: BEYNUM et al., 1985; *Adaptado de ALEXANDER (1995)

Todos os grânulos apresentam um hilo, que constitui o centro de nucleação, ao redor do qual desenvolve-se o grânulo, pode ser observado na Figura 4. Os grânulos têm regiões cristalinas e não cristalinas em camadas alternadas. As ramificações agrupadas de amilopectina ocorrem como feixes de dupla hélice. Essas estruturas, a partir de muitas regiões cristalinas pequenas nas camadas densas dos grânulos de amido, se alternam com camadas amorfas (CIACCO;CRUZ, 1987; WHISTLER; DANIEL, 1993).

Os grânulos de amido são birrefringentes e quando observados sob luz polarizada apresentam a típica cruz de malta. Os diferentes graus de ordenamento estrutural dos grânulos são responsáveis pelas propriedades de birrefringência e cristalinidade. A birrefringência óptica e as propriedades de difração de raios-X fornecem ampla evidência de uma estrutura ordenada do grânulo de amido. Esta estrutura é formada por camadas concêntricas, que podem ser observadas em microscopia eletrônica de grânulos de amido submetidos a tratamento ácido ou a digestão parcial por amilases. Esta técnica ilustra o fato de que o grânulo possui regiões mais cristalinas ordenadas e regiões amorfas, nas quais as cadeias poliméricas estão menos ordenadas e mais susceptíveis ao ataque ácido ou enzimático (ZHOU et al., 1998).

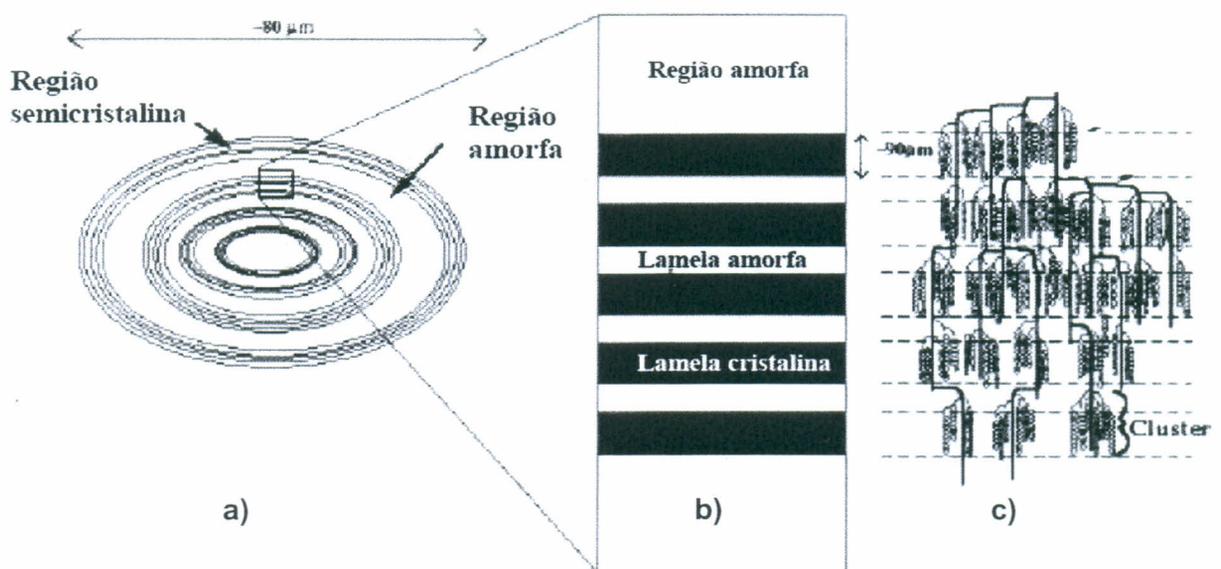


Figura 4 – Diferentes níveis de organização dos grânulos de amido: a) esquema do grânulo de amido inteiro; b) camadas semi-cristalinas constituídas do empilhamento de lamelas amorfas e cristalinas; c) correspondência entre o modelo bioquímico das lamelas cristalinas e amorfas.

Fonte: FRENCH, 1984

De acordo com Biliaderis (1991), são as áreas cristalinas do amido que mantêm a estrutura do grânulo, controlam o seu comportamento na presença de água e os tornam

mais ou menos resistentes aos ataques químicos e enzimáticos. A zona amorfa dos grânulos de amido (figura 4) é a região menos densa, mais suscetível aos ataques enzimáticos e absorve mais água em temperaturas abaixo da temperatura de gelatinização. Segundo este autor não existe uma demarcação forte entre as regiões cristalina e amorfa. Há evidências de uma estrutura supramolecular onde as fases amorfas e cristalinas são interdependentes (Figura 4).

1.3.1.3 Propriedades Funcionais

1.3.1.3.1 Poder de Inchamento e Solubilidade dos Grânulos

Amidos de diferentes fontes botânicas apresentam distintos poder de inchamento (intumescimento) e solubilidade dos grânulos. O amido de milho, por exemplo, apresenta inchamento limitado, que ocorre em dois estágios. Isto sugere dois tipos de forças envolvidas nas interações entre as cadeias poliméricas que relaxam a diferentes temperaturas. Féculas como a de batata apresentam grande inchamento e a temperaturas baixas, o que indica interações mais fracas e uniformes. De maneira geral a solubilidade e o poder de inchamento apresentam-se correlacionados (LEACH et al., 1959).

A tabela 5 apresenta os teores bem como algumas características de amilose e amilopectina do amido nativo de batata e milho.

Tabela 5 - Características da amilose e amilopectina de amidos nativos

Características	Batata	Milho
Amilose % MS	21	28
Amilopectina % MS	79	72
Amilose GP	3000	800
Amilopectina GP x 10 ⁶	2	2

MS – Matéria seca; GP - Grau de polimerização

Fonte: adaptado de ALEXANDER (1995)

De acordo com Alexander (1995) chama a atenção para o fato de que no setor industrial, amidos catiônicos de batata são muito superiores na fabricação de papel. Este derivado apresenta propriedades anfóteras, que são particularmente úteis para reter vários produtos químicos adicionados no processo úmido de fabricação de papel. Concluindo, as propriedades de pasta (tabela 6) e a disponibilidade tornaram o amido de batata um ingrediente particularmente valioso para o preparo de muitos alimentos e para usos

industriais específicos. O preço do amido de batata é maior que o de trigo e milho, mas também alcança preço maior no mercado, em razão de suas propriedades especiais.

Tabela 6 - Características das pastas de amidos de batata e milho

Características	Batata	Milho
Sabor	Suave	Forte
Viscosidade	Muito alta	Média
Textura	Longa	Curta
Transparência	Muito clara	Opaca
Taxa de retrogradação	Baixa	Alta

Fonte: adaptado de ALEXANDER (1995)

Muhrbeck (1996) afirma que com o tratamento hidrotérmico (27% de umidade a 100°C/16h) o padrão de cristalinidade do amido de batata passa do tipo B para tipo A, quando avaliado por difração de raio X. isto também foi relatado por Leach et al. (1959), que promoveram tratamento térmico a 100°C com 20 a 25% de umidade em fécula de batata. Apesar de microscopicamente não haver sido detectadas alterações, nem perda de birrefringência, houve mudança no padrão de difração de raio X, de B para A, similar ao amido de milho. As pastas formadas têm reologia curta, são opacas, e quando são resfriadas, resultam em géis rígidos parecidos com os de amido de milho. Há sugestão de que o tratamento térmico promove uma re-cristalização na fécula tornando-a parecida com o amido de milho. Ocorre grande redução do poder de inchamento e da solubilidade após o tratamento térmico de amidos (LEACH et al. 1959).

1.3.2 Enzimas

As enzimas são macromoléculas apresentando cadeias predominantemente protéicas com funções biológicas específicas, imprescindíveis a qualquer ser vivo, pois podem acelerar ou retardar as reações químicas que mantêm e regulam os processos vitais. As enzimas estão presentes em todos os seres vivos através de unidades funcionais nos diversos processos metabólicos existentes, favorecendo assim a obtenção de elementos essenciais como também a utilização de alguns compostos externos como fonte de energia, podendo ser extraídas e aplicadas, sob a forma livre ou imobilizada, em diversos sistemas diferentes daqueles em que foram originadas (LEHNINGER, 1976; BOBBIO et al, 1992; NIELSEN et al., 1994; SAID e PIETRO, 2004).

Diferentemente das enzimas vegetais e animais, as de origem microbiana não dependem das intempéries climáticas, uma vez que são produzidas em fermentadores onde

as condições de cultivo são controladas por monitores eletrônicos. A enorme biodiversidade de microrganismos disponíveis nos mais variados habitats da natureza, contribui para que as pesquisas envolvendo a produção das enzimas microbianas aumentem cada vez mais. A introdução de microrganismos geneticamente modificados nos processos de produção de enzimas têm contribuído para o aumento da produção enzimática, pois diminuem o tempo de produção, conseqüentemente aumentam os lucros das empresas produtoras. As enzimas de origem microbiana ocupam lugar de destaque no mercado biotecnológico, sendo inúmeras as aplicadas em processos industriais e comercializadas em grandes quantidades, como as proteases bacterianas na indústria de detergentes e couro, as amilases fúngicas e bacterianas na indústria do amido e panificação, as celulases e pectinases na indústria têxtil e de sucos naturais (DECLERCK et al., 2000; SAID e PIETRO, 2004; BOERSMA, et al.; 2007).

O mercado mundial das enzimas industriais foi estimado em torno de 1,7 a 2,0 bilhões de dólares em 2005, e a metade destas são produzidas por espécies de *Bacillus* (MEIMA and VAN DIJL, 2003). Foram feitas projeções que a comercialização mundial das enzimas amilolíticas movimentem 225 milhões de dólares nos últimos anos (WALSH, 2002; PANDEY et al., 2005).

1.3.2.1 Amilase

As amilases são enzimas que pertencem à classe de hidrolases, e são extensamente produzidas por microrganismos, plantas e animais, e são enzimas conversoras do amido (PANDEY et al., 2000; BURHAN et al., 2003; MURALIKRISHNA e NIRMALA, 2005). Embora elas possam ser derivadas de diversas fontes, as de origem microbiana são geralmente as mais procuradas pelas indústrias. As espécies do gênero *Bacillus* são consideradas as principais fontes de amilases (OLIVEIRA et al, 2007). Atualmente são descritas na literatura quatro tipos de enzimas conversoras de amido: as endoamilases, as exoamilases, as enzimas desramificadoras e as transferases (VAN, 2002; SAID e PIETRO, 2004).

As amilases são responsáveis pelo processo de germinação e maturação de sementes e grãos que são fundamentais na digestão do amido nos animais, resultando assim na formação de diversos açúcares, que são usados subseqüentemente para várias atividades metabólicas (LELOUP et al, 1994).

A figura 1 apresenta a hidrólise enzimática das ligações α -1,4 das cadeias de amido pela amilase (α , β) e amiloglucosidase e ligações α -1,3 ou α -1,6 por enzimas desramificadoras (pululanases).

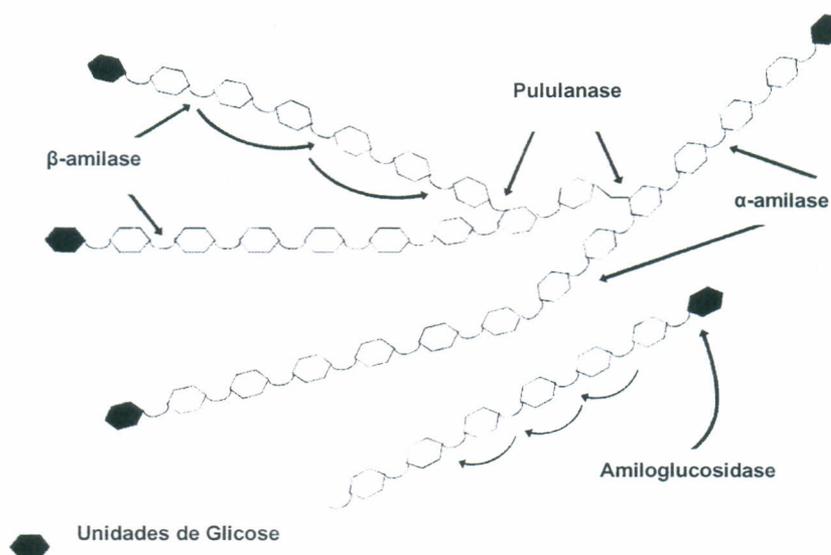


Figura 5 - Hidrólise enzimática das ligações α -1,4 das cadeias de amido pela amilase (α , β) e amiloglucosidase e ligações α -1,3 ou α -1,6 por enzimas desramificadoras (pululanase).
Fonte: STAUFFER, 1994a,b.

A utilização das amilases, nos processos de hidrólise do amido, é considerada bastante antiga, pois em 1833, o extrato de malte precipitado foi utilizado para produzir um açúcar, cujo material desconhecido responsável pela reação foi denominado "diástase", que deriva da palavra francesa que significa separação. Progressivamente, a diástase veio a se tornar um termo genérico para as amilases (HEBEDA e TEAGUE, 1993). A nomenclatura comercial das enzimas foi, posteriormente, procedida pela adição do sufixo 'ase' ao prefixo da palavra que denota o substrato ou a ação da enzima em particular. Vários esforços foram realizados para produzir enzimas que degradassem amido cru em escala industrial (NAKAJIMA et al, 1986).

Diversas espécies de microrganismos descritos na literatura produzem amilases microbianas (tabela 1), os principais gêneros são os *Bacillus*, *Aspergillus*, *Staphylococcus*, *Thermococcus* e *Clostridium* (GUPTA, et al., 2003; TAFARELLO, 2004).

As amilases têm sido utilizadas em diferentes aplicações industriais, como em alimentos, detergentes, bebidas destiladas, processos fermentativos, indústrias têxteis, indústria de papéis e de panificação. Essas enzimas têm substituído os ácidos no processamento industrial de hidrolisados de amido. Elas podem ser potencialmente utilizadas na indústria de fármacos e na indústria química refinada (FOGARTY e KELLY, 1980; PANDEY et al., 2000; ROSELL et al., 2001; ELLAIAH et al., 2002; GIGRAS et al., 2002). Além de representarem a maior parte do mercado de enzimas no mundo (GUZMAN-MALDONADO, 1995; GUPTA et al., 2003; SAXENA et al., 2007).

1.3.2.2 Alfa-Amilase

A α -amilase (E.C.3.2.1.1: α -1-4 glucano-4-glucanohidrolase) é uma endoenzima carbohidratase que apresenta atividade hidrolítica nas ligações glicosídicas α -1,4 em polissacarídeos dispersos em meio aquoso, contendo, pelo menos, três resíduos de glicose na cadeia. Algumas α -amilases apresentaram atividade de hidrólise das ligações glicosídicas α -1,6, mas apresentam uma eficiência de reação considerada reduzida (FOGARTY e DIXON, 1979; SALVA, 1990; KURIKI et al., 1993; CHRISTOPHERSEN et al., 1998; KWAK et al., 1998; LÉVÊQUE et al., 2000; PANDEY et al., 2000; FITTER et al., 2001; SUVD et al., 2001; AVIVI, GEDANKEN, 2007).

De acordo com a padronização de nomenclatura de enzimas proposta em 1955 pela “Comissão de Nomenclatura e Classificação de Enzimas”, pela União Internacional de Bioquímica, trata-se de uma enzima pertencente à classe Hidrolases, codificada com o número 3 (BOBBIO et al, 1992; SCHOMBURG; SALZMANN, 1991).

Essa classe de enzimas pode ainda ser classificada como enzimas sacarificantes que hidrolisam o amido, produzindo monossacarídeos em sacarídeos de baixa massa molar, como glicose, maltose e maltotriose, e também como uma enzima liquidificante que hidrolisa o amido, produzindo maltodextrinas de variadas massas molares, com grau de polimerização acima de 4, sem a grande produção de monômeros ou dímeros (NEBESNY et al. 1993; KIM et al., 1994; KICHAKOVA et al., 1998; LÉVÊQUE, 2000; PANDEY et al., 2000; ODIBO et al. 2001). A Figura 2 representa a classificação segundo a ação sacarificante ou liquidificante das amilases.

A eficácia da utilização das α -amilases bacterianas como agentes conservantes em alimentos cozidos, começou a ser observada em meados do século 20. Um aumento significativo na produção e na utilização da amilase ocorreu no início dos anos sessenta em que a α -amilase produzida pelo *Bacillus subtilis* e a glucoamilase produzida pelo *Aspergillus niger* foram utilizadas para substituir as reações envolvendo a catalise ácida na produção da dextrose do amido.

Tabela 7 – Microrganismos produtores de alfa-amilase e características de habitat, temperatura e pH de atividade enzimática e localização da enzima

Gênero e espécie		Habitat do microrganismo	Temperatura de atividade (°C)	pH ótimo de atividade	Localização da enzima
<i>Aspergillus sp.</i>	<i>A. oryzae</i> <i>A. niger</i>	Solo	30-60	5,0-5,5	Extracelular
<i>Bacillus sp.</i>	<i>B. acidocaldarius</i> <i>B. licheniformis</i> <i>B. stearothermophilus</i> <i>B. amyloliquefaciens</i> <i>B. subtilis</i> <i>B. thermooleovorans</i>	Solo	60-até110 ^{*2}	5,5-8,0	Extracelular
<i>Pyrococcus sp.</i>	<i>P. furiosus</i> <i>P. woesei</i>	Marinho e solos sulfurosos	100	5,0-7,5	intra e extracelular
<i>Staphylococcus marinus</i>		Solos marinhos	100	5,0	nd ⁻¹
<i>Clostridium sp.</i>	<i>C. butyricum T-7</i>	nd ⁻¹	37	5,0	Extracelular
<i>Sulfolobus sp.</i>	<i>S. solfataricus</i> <i>S. acidocaldairus</i>	Solos vulcânicos	70-80	5,0-6,0	Extracelular
<i>Thermococcus sp.</i>	<i>T. celer</i> <i>T. profundus</i>	Solos marinhos (deep sea)	75-100	5,0-6,0	Extracelular

Fonte: TAFFARELLO, 2004

^{*1} – não determinado ^{*2} – notificada necessidade de íons cálcio

O desenvolvimento de ferramentas da engenharia genética na década de setenta, abriu caminho com sucesso para a produção de amilases clonadas de *Bacillus stearothermophilus* e na década de oitenta e noventa para algumas aplicações industriais (BRUMM, et al., 1991; PANDEY et al., 2005).

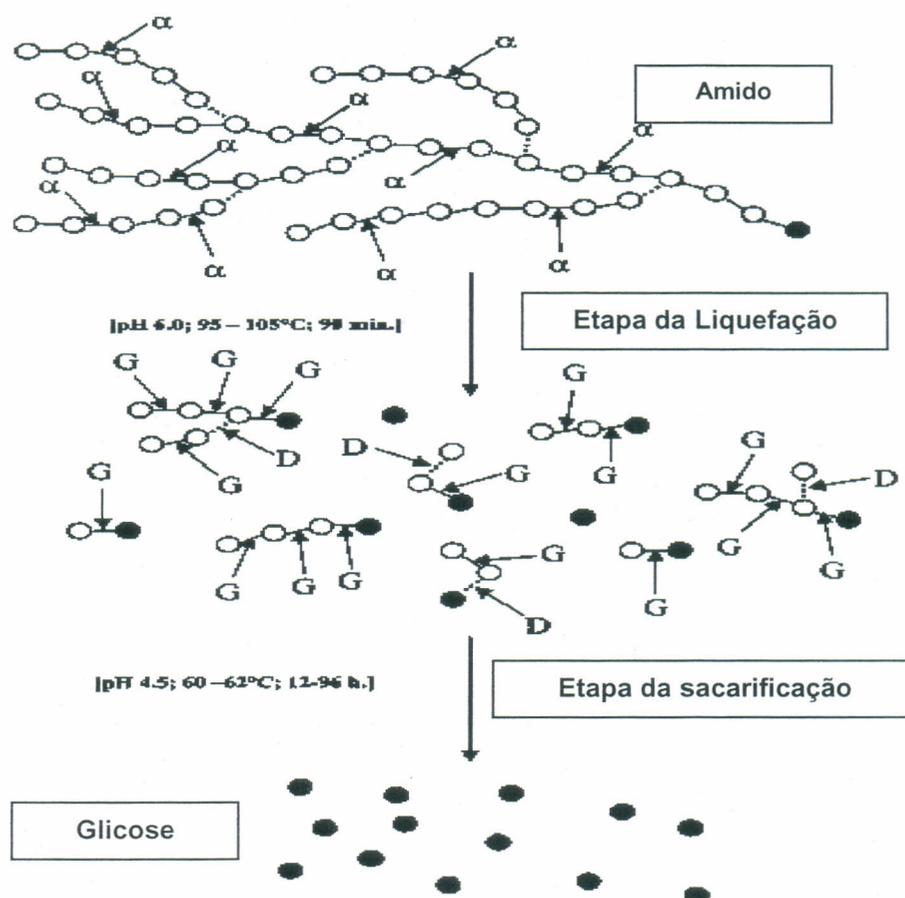


Figura 6 - Hidrólise enzimática industrial do amido em glicose e o modelo da ação das enzimas amilolíticas (amilase) —: ligações α-1,4 glicosídicas;: Ligações α-1,6 glicosídicas; A: α-amilase; G: glicosidase; D: enzimas desramificadoras (pululanase); ○: resíduo de α-D-glicose não redutor; ●: resíduo α-D-glicose redutor.
Fonte: FOGARTY e DIXON, 1979.

As α-amilases podem ser obtidas por diversas espécies microbianas, principalmente por linhagens de *Aspergillus sp.* e *Bacillus sp.*, especialmente *Bacillus amyloliquefaciens* e *Bacillus licheniformis* são as mais utilizadas em processos de fermentação submersa e em diversas aplicações industriais, (RAIMBAULT, 1980; KRUGER et al, 1987; BOSE e DAS, 1996; EGAS et al., 1998; VISWANATHAN e SURLIKAR, 2001; RUBINDER et al., 2002; RAMACHANDRAN et al., 2004; WANDERLEY et al. 2004; GOYAL et al., 2005;

HERNÁNDEZ et al., 2006; NAZMI et al., 2006; KONSOUA, LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES, 2007).

Durante décadas as α -amilases tiveram aplicações restritas a processos de panificação, sendo sempre utilizadas na forma não purificada. Nos últimos anos as α -amilases não têm sido usadas apenas em processos de fermentação, mas extensivamente estudada e, em consequência disto, encontra-se hoje, no mercado sob formas diversas de α -amilases, com diferentes características e aplicações na indústria de processamento de alimentos (ex. panificação), nas indústrias têxteis e de papel, (BEYNUM et al., 1985; KEARSLEY et al, 1995; ELLAIAH et al, 2002; GIGRAS et al., 2002; UMA MAHESWAR RAO, SATYANARAYANA, 2007). A maior aplicação para a α -amilase está na produção de hidrolisados de amidos (GUPTA et al., 2003).

A figura 3 ilustra a atuação da α -amilase na molécula do amido.

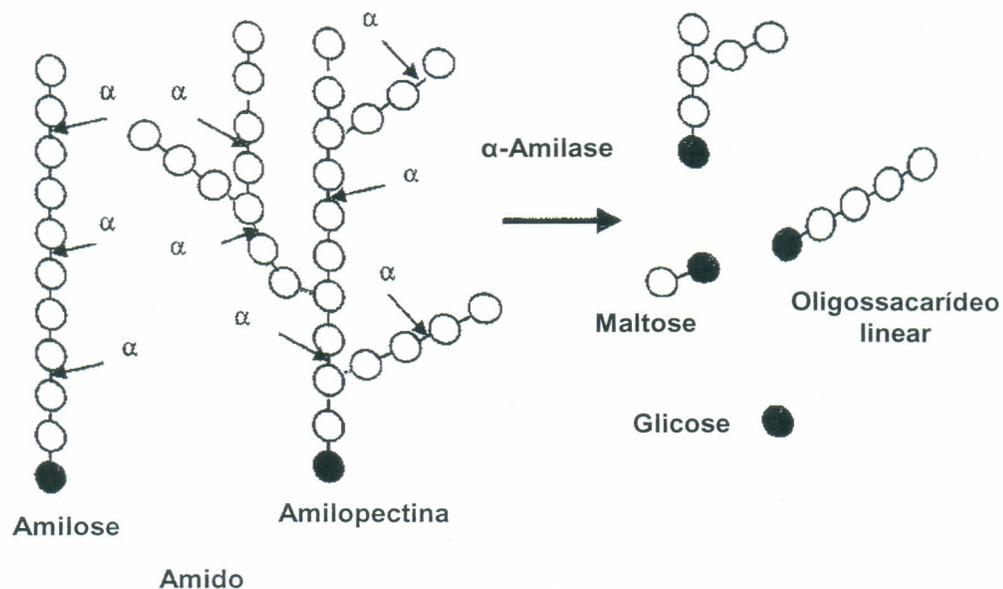


Figura 7 - A ação da α -amilase no amido. Os círculos preenchidos simbolizam o final redutor de uma cadeia de poliglucose.
Fonte: BERNHARDSDOTTER, 2004.

A ação da α -amilase sobre a amilose ocorre em duas etapas. A primeira etapa consiste no ataque aleatório e rápido do substrato, resultando nos compostos maltose e maltotriose, enquanto que a segunda etapa, bem mais lenta, permite a formação de glicose e maltose. A hidrólise da amilopectina pela α -amilase fornece como produtos finais glicose, maltose e as α -dextrinas limite (oligossacarídeos contendo quatro ou mais unidades de glicose unidas por ligações do tipo α -1,6). Em geral, são diferenciadas em função da sua atividade, termoestabilidade e faixas de pH de atuação, fatores que determinam sua

adequação aos processos industriais (KRUGER et al., 1987; JACQUES et al., 1999; AQUARONE et al., 2001).

Nos últimos anos, as α -amilases bacterianas têm recebido uma maior atenção dos pesquisadores, devido a sua alta termoestabilidade, incentivando assim um aumento no número de pesquisas sobre a produção dessa classe de enzimas. O peso molecular da α -amilase varia de 10 a 210 KDa, dependendo de sua origem, as de origem fúngica apresentam valores na faixa de 41 a 69 KDa, e as bacterianas de 28 a 78 KDa (PANDEY et al, 2005).

1.3.3.1 *Bacillus licheniformis*

O gênero *Bacillus* produz uma grande variedade de enzimas extracelulares, algumas delas como as α -amilases são de maior importância industrial (BOLTON et al., 1997). Dentre essa enzimas, as variedades termoestáveis são mais versáteis com respeito a importância industrial. As α -amilases produzidas por diferentes variedades de espécies de *Bacillus* variam não apenas em suas aplicações (sacarificação ou liquefação), mas também na faixa do pH e temperatura para sua melhor atividade. Os microrganismos responsáveis por essas enzimas são os *Bacillus amyloliquefaciens* ou *Bacillus licheniformis* (DECLERCK et al., 2000).

O *Bacillus licheniformis* é uma bactéria saprófita, gram-positiva, móvel, formadora de esporos, anaeróbica facultativa, podendo ser isolada nos mais variados nichos ecológicos, pertencente ao grupo do *B. subtilis*. É um organismo considerado não patogênico, sendo muito difundido na natureza, contribuindo substancialmente nos diversos ciclos de nutrientes existentes devido a sua grande capacidade de produção de enzimas e biossurfactantes. A diversidade metabólica deste organismo conduziu a sua exploração em uma variedade de processos biotecnológicos, incluindo a produção das enzimas, de antibióticos e de produtos químicos finos (HARWOOD, 1992; DE BOER et al., 1994; LEE et al., 1996; DESAI; BANAT, 1997; CLAUS; BERKELEY, 1999; BANAT et al., 2000; EPPERSON; MING, 2000; STEWART; FOGLER, 2001; ISHIHARA et al., 2002; MAKKAR; CAMEOTRA, 2002; HE et al., 2006; MURPHY et al., 2006). Recentemente, uma nova bacteriocina, produzida pelo *B. licheniformis*, foi relatado e estudada para seu uso como conservante de alimentos (MARTIRANI, et al., 2002).

No solo, sua presença está associada principalmente a plantas e raízes, podendo ser isolados em quase todas as partes dos vegetais devido aos seus endósporos serem altamente resistentes e se disseminarem pelo ar (VEITH et al., 2004).

O *B. licheniformis* apresenta uma histórica relevância na produção das proteases, de amilases e de lipopeptídeos surfactantes, que são usados na produção de detergentes, na liquefação do amido e na recuperação de óleos respectivamente. Amostras de *B. licheniformis* recombinante têm sido pesquisadas e usadas extensivamente nos processos de fermentação em larga escala (OUTTRUP e JORGENSEN, 2002). Diversas pesquisas tem sido realizadas para explorar ainda mais estes microrganismos, melhorando os rendimentos de produção através de modificações genéticas em sua estrutura (PARINI et al., 1991; OUTTRUP e JORGENSEN, 2002).

O *Bacillus licheniformis* e as espécies relacionadas são usadas também na produção de enzimas industriais, inseticidas e proteínas farmacêuticas e outros compostos como alimentos e fármacos (HARWOOD, 1992; SCHALLMEY et al., 2004; WESTERS et al., 2004). As cepas selvagens da espécie *Bacillus* esporulam em resposta às limitações de nutrientes. Quando alguns compostos comercialmente importantes, tais como as proteínas de *B. thuringiensis*, são produzidas concomitantemente com esporulação (HARWOOD, 1992), a produção de enzimas no processo alimentício é amparada pela esporulação. Conseqüentemente, mutantes não esporulados foram desenvolvidos para o uso como cepas base para enzimas recombinantes. Uma vantagem de usar a espécie *Bacillus* como base para a produção em grande escala de enzimas heterólogas e de outras proteínas é sua habilidade de secretar proteínas diretamente no meio da fermentação (SIMONEN e PALVA, 1993).

Referências Bibliográficas

- ALEXANDER, R. Potato starch: New prospects for an old product. **Cereal foods world**, 40 (10): 763-764, 1995.
- AGUILAR, G.; MORLON-GUYOT, J.; TREJO-AGUILAR, B. and GUYOT, J. P. Purification and characterization of an extracellular alpha-amylase produced by *Lactobacillus manihotivorans* LMG 1801 (T), an amylolytique lactic acid bacterium. **Enzyme and Microbial Technology**, 27(6), 406–413, 2000.
- AKHER, M.; LEITHY, M.A.; MASSAFY, M.K.; KASIM, S.A. Optimal conditions of the production of bacterial amylase. **Zentralbl. Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene** 128 (5–6), 483–490, 1973.
- AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A. Biotecnologia industrial: biotecnologia na produção de alimentos. 1. ed. São Paulo: **Edgar Blücher**, 4, 365–395. 2001.
- AVIVI (LEVI), S.; GEDANKEN, A. Are sonochemically prepared alpha-amylase protein microspheres biologically active?. **Ultrasonics Sonochemistry**, 14, 1–5, 2007.
- BANAT, I.M; MAKKAR, M.R.S; CAMEOTRA, S.S. Potential commercial applications of microbial surfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 53 (5): 495–508, 2000.
- BELLO-PEREZ, L.A. et al. Amylopectin – properties and fine structure. **Food Chemistry**, 56 (2): 171-176, 1996.
- BEN ALI, M., MHIRI, S., MEZGHANI, M., BEJAR, S. Purification and sequence analysis of the atypical maltohexaose forming alpha-amylase of the *B. stearothermophilus* US100. **Enzyme Microbial Technol.** 28 (6): 537–542, 2001.
- BERNHARDSDOTTER, E. C. J. Production and characterization of two alpha-amylase from extremophiles. Tesis (Doctor of Philosophy, Program: Material Science) – **The University of Alabama in Huntsville**, Huntsville, Alabama, 2004.

BEYNUM, G. M. A. van; ROELS, J. A. Starch Conversion Technology. **Food Science and Technology**. vol. 14. Marcel Dekker Inc. New York, NY, 362. 1985.

BILLIADERIS, C.G. The structure and interactions of starch with food constituents, **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, 69 (1): 60-78, 1991.

BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A. Introdução à Química de Alimentos. **Livraria Varela-2^a** edição. cap.1. São Paulo, 1992.

BOERSMA, Y. L.; DRÖGE, M. J. and QUAX, W. J. Selection strategies for improved biocatalysts. **FEBS Journal** 274, 2181–2195, 2007.

BOLTON, D. J.; KELLY, C. T.; FOGARTY, W. M. Purification and characterization of the α -amylase of *Bacillus flavothermus*. **Enzy. Microbiol. Technol.** 20 (5): 340–343, 1997.

BOSE, K.; DAS, D. Thermostable α -amylase production using *Bacillus licheniformis* NRRL B 14368. **Ind. J. Exp. Biol.**; 34 (12):1279–82, 1996.

BRUMM, P. J.; HEBEDE, R. E.; TEEGUE, W. M. Purification and Characterization of the Commercialized, Cloned *Bacillus megaterium* α -Amylase. Part I: Purification and Hydrolytic Properties. **Starch/starke**. 43 (8): 315–319, 1991.

BULÉON et al. Starch granules:structure and biosynthesis. **International Journal of Biological Macromolecules**, 23, 85-112, 1998.

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**. 38 (10): 1397–1403, 2003.

CHIRUMAMILLA, R. R., MURALIDHAR, R., MARCHANT, R. And NIGAM, P. Improving the quality of industrially important enzymes by directed evolution. **Molecular and Cellular Biochemistry**, 224 (1-2): 150-168. 2001.

CHRISTOPHERSEN, C.; OTZEN, D. E.; NORMAN, B. E.; CHRISTENSEN, S.; SCHAFER, T. Enzymatic Characterisation of Novamyl[®], a Thermostable α -Amylase. **Starch/stärke**. 50 (1): 39–45, 1998.

CIACCO, C.F.; CRUZ, R. **Tecnologia Agroindustrial**: Fabricação de amido e sua utilização. São Paulo: Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia, v.7. 152p. 1987.

CLAUS, D.; BERKELEY, R. C. W. Genus *Bacillus* Cohn 1872, 1105–1139. In: **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, Vol. 2, Baltimore, 1999.

COUTO, S. R., SANROMÁN, M^a Ángeles. Application of solid-state fermentation to food industry—A review. **Journal of Food Engineering**. 76 (3): 291–302, 2006.

CORONADO, M. J., VARGAS, C., HOFEMEISTER, J., VENTOSA, A., NIETO J. J. Production and biochemical characterization of an α -amylase from the moderate halophile *Halomonas meridiana*. **FEMS Microbiology Letters**, 183 (1): 67–71. 2000.

DE BOER, A. S., PRIEST, F.; DIDERICHSEN, B. On the industrial use of *Bacillus licheniformis*: a review, **Appl Microbiol Biotechnol**. 40 (5): 595–598, 1994.

DECLERCK, N.; MACHIUS, M.; WIEGAND, G.; HUBER, R.; GAILLARDIN, C. Probing structural determinants specifying high thermostability in *Bacillus licheniformis* α -amylase. **J. Mol. Biol.**, 301, 1041-1057, 2000.

DESAI, J. D.; BANAT, I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, 61 (1): 47–64, 1997.

EGAS, M. C.; Da COSTA, M. S.; COWAN, D. A.; PIRES, E. M. Extracellular alpha-amylase from *Thermus filiformis* Ork A2: Purification and biochemical characterization. **Extremophiles**, 2 (1), 23–32, 1998.

ELLAIAH, P.; ADINARAYANA, K.; BHAVANI, Y.; PADMAJA, P.; SRINIVASULU, B. Optimization of process parameters for glucoamylase production under solid state fermentation by a new isolated *Aspergillus* species. **Process Biochemistry**, 38 (4): 615–620, 2002.

ELLIS, R.P. et al. Starch production and industrial use. **Journal production science food and agriculture**, 77 (3): 289-311, 1998.

EPPERSON, J. D. and MING, LI-JUNE. Proton NMR Studies of Co(II) Complexes of the Peptide Antibiotic Bacitracin and Analogues: Insight into Structure-Activity Relationship. **Biochemistry**, Vol. 39, No. 14, 2000.

ERRINGTON, J. Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*. **Nat. Rev. Microbiol**, 1, 117-126, 2003.

EVANS, I.D.; HAISMAN, D.R. Rheology of gelatinized starch suspensions. **Journal of textures Studies**, 10, 347-370, 1979.

FENIMAN, C.M. Caracterização de raízes de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) dos cultivares 576-70 quanto à cocção, composição química e propriedades do amido em duas épocas de colheita. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – **Escola Superior de agricultura Luiz de Queiroz, Universidade São Paulo**, Piracicaba. 99f. 2004.

FITTER, J.; HERRMANN, R.; DENCHER, N. A.; BLUME, A.; HAUSS, T. Activity and stability of a thermostable α -amylase compared to its mesophilic homologue: mechanisms of thermal adaptation. **Biochemistry**, 40, 10723-10731, 2001.

FOGARTY, W. M.; KELLY, C. T. in Economic Microbiology, Microbial Enzymes and Bioconversions, vol. 5 (Rose, A. H., ed.), London, **Academic Press**, 115-170, 1980.

FRANCO, C. M. L.; DAIUTO, E. R.; DEMIATE, I. M.; CARVALHO, L. J. C. B.; LEONEL, M.; CEREDA, M. P.; VILPOUX, O. F. e SARMENTO, S. B. S. Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas: Propriedades Gerais do Amido, Campinas: **Fundação Cargill**, v.1. 224p 2001.

FRENCH, D. Chemical and physical properties of starch. **J. Anim. Sci.** 37 (4): 1048-1061, 1973.

FRENCH, D. Organization of starch granules. In: WHISTLER, R. L.; BEMILLER, J. N.; PASCHOAL, E. F. **Starch: chemistry and technology**. 2 ed, London: Academic Press, 183-247. 1984.

GALLIARD, T; BOWLER, P. Morphology and composition of starch. In: GALLIARD, D.T. **Starch Properties and Potencial**, Chichester: Wiley, 13, 55-78, 1987. (Critical Reports on Applied Chemistry).

GEBRE-MARIAN, T.; ADABA, A.; SCHMIDT, P.C., Some physicol-chemical properties of dioscorea starch from Ethiopia. **Starch/Stärke**, 50 (6): 241-246, 1998.

GERÁRD, C. et al. Amylose determination in genetically modified starches. **Carbohydrate polymers**, 44 (1): 19-27, 2001.

GHOSH, S. B.; CHANDRA, A. K. Nutritional requirements and cultural characteristics of *Bacillus apiarius* CBML-152 for the production of thermostable alpha-amylase. **Microbiological Research [ZENTRALBL. MIKROBIOL.]**. 139 (4): 293-304, 1984.

GIGRAS, P.; SAHAI, V.; GUPTA, R. Statistical media optimization and production of ITS α -amylase from *Aspergillus oryzae* in a bioreactor. **Current Microbiology**, 45 (3): 203-208, 2002.

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

GUILBOT, A.; MERCIER, C. Starch, In: ASPINALL, G.D. (Ed.). The polysaccharides. New York: **Academic Press**, 3, 229-295. 1985.

GUPTA, R., GIGRAS, P., MOHAPATRA, H., GOSWAMI, V. K. and CHAUHAN, B. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. **Process Biochemistry**, 38 (11): 1599-1616, 2003.

GUZMAN-MALDONADO, O.; PAREDES-LOPEZ, Amylolytic enzymes and products derived from starch: a review, **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.** 35 (5): 373-403, 1995.

HAKI, G. D.; RAKSHIT, S. K. Developments in industrial important thermostable enzymes: a review. **Biosource Technology**. 89 (1): 17–34, 2003.

HAMILTON, L. M, KELLY, C. T, FOGARTY, W. M. Purification and properties of the raw starch degrading α -amylase of *Bacillus* sp. IMD434. **Biotechnol. Lett.** 21 (1): 111-115, 1999.

HAQ, I.; ASHRAF, H.; ALI, S.; QADEER, M. A. Submerged fermentation of alpha-amylase by *Bacillus licheniformis* GCB-36. **Biologia** 43 (2): 39–45, 1997.

HAQ, I.; ASHRAF, H.; ZAHARA, R.; QADEER, M.A. Biosynthesis of alpha amylase by *Bacillus subtilis* GCB-12 using agricultural by products as substrates. **Biologia** 44 (1-2): 154–163, 1998.

HARGER, C; SPRADA, D; HIRATSUKA, E. **Amilase Fúngica**. In: Bioquímica das Fermentações, 56p, 1982.

HARWOOD, C. R.; *Bacillus subtilis* and its relatives: molecular biological and industrial workhorses, **Trends Biotechnol.** 10 (7): 247–256, 1992.

HE, L., CHEN. W., LIU, Y. Production and partial characterization of bacteriocin-like peptides by *Bacillus licheniformis* ZJU12. **Microbiological Research**. 161 (4): 321–326, 2006.

HEBEDA, R. E.; TEAGUE, W. M. In R. J. Alexander, and H. F. Developments in carbohydrate chemistry. **Zobel** (Eds.), (pp. 65–85). St Paul, USA: AACC. 1993.

HIZUKURI, S.; TAKEDA, Y.; YASUDA, M. Multi-branched nature of amylase and the action of debranching enzymes. **Carbohydr. Res.** 94, 205-209, 1981.

HOOVER, R. Composition, molecular structure, and physicochemical properties of tuber and root starches: a review. **Carbohydrates Polymers**, 45, 253-267, 2001.

HURTADO, J. Et al. Procesamiento de la arracacha (*Arracacha xanthorrhiza*): Estudio de la factibilidad técnica y económica para la producción de almidón y harina y sus propiedades fisicoquímicas. **Seminário Técnico sobre Raíces y Tubérculos autóctonos**. Ibagué, Colombia, 27-29 de mayo 1997. International Starch Institute. Determination of reductive power in starch. Disponível em: <http://home3.inet.tele.dk./starch/isi/methods/35rcu.htm>. Access> Acesso em: 03 maio, 2005.

ISHIHARA, H., et al. Distribution and Variation of Bacitracin Synthetase Gene Sequences in Laboratory Stock Strains of *Bacillus licheniformis*. **Current Microbiology** Vol. 45 (1): 18–23, 2002.

JACQUES, K.; LYONS, T. P.; KELSALL, D. R. The alcohol textbook. 3. ed. Nottingham: **Nottingham Press**, 386p, 1999.

JANE, et al. Effects of amylose branch chain length and amylose content on the gelatinization and pasting properties of starch. **Cereal Chemistry**, 76 (5): 629-637, 1999.

JANOUSKOVA, J. et al. Optimization of experimental conditions for the separation of small and large granules by gravitational field-flow fractionation. **Journal of Chromatography A**, 914, 183-187, 2001.

KANDRA, L. α -Amilases of medical and industrial importance. **Theochem**, vol.666-67, 487–498, 2003.

KASEMSUAWAM, T. et al. Characterization of the dominant mutant amylose-extender (Acl – 5180) maize starch. **Cereal Chemistry**, 72 (5): 457-464, 1995.

KASEMSUWAN, T.; JANE, J. Quantitative method for survey of starch phosphate derivatives and starch phospholipids by ^{31}P nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Cereal Chem.** 73, 702-707, 1996.

KEARSLEY, M. W.; DZIEDIC, S. Z. Handbook of Starch hydrolysis products and their derivatives. **Chapman & Hall**, 275, 1995.

KICHAKOVA, N. A.; PAVLOVA, I. N.; ZAKHAROVA, Y. Purification and identification of amylolytic enzymes from *Bacillus licheniformis*. **Applied Biochemistry and Microbiology**. 34 (5): 458–461, 1998.

KIM, K.; BAJSZAR, G.; LEE, S. Y.; KNUDSEN, F.; MATTOON, J. R. Cloning of a new allelic variant of a *Saccharomyces diastaticus* glucoamylase gene and its introduction into industrial yeasts. **Appl. Biochem. Biotechnol.** 44 (2): 161–185, 1994.

KIM, I. C.; YOO, S. H.; LEE, S. J.; OH, B. H.; KIM, J. W.; PARK, K. H. Synthesis of branched oligosaccharides from starch by two amylases cloned from *Bacillus licheniformis*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**. 58 (2): 416–418, 1995.

KITAHARA, K.; COPELAND, L. A simple method for fractionating debranched starch using a solid reversed-phase cartridge. **Journal Cereal Science**, 39, 91–98, 2004.

KONSOULA, Z.; LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES, M. Co-production of α -amylase and β -galactosidase by *Bacillus subtilis* in complex organic substrates. **Bioresource Technology**. 98, 150–157, 2007.

KRUGER, J. E.; LINEBACK, D. R. In J. E. Kruger, D. Enzymes and their role in the cereal technology. **Lineback, and C. E. Stautter** (Eds.), St Paul, Minnesota: AACC. 117–139, 1987.

KURIKI, T.; YANASE, M.; TAKATA, H.; TAKESADA, Y.; IMANADA, T.; OKADA, S. A new way of producing isomalto-oligosaccharide syrup by using the transglycosylation reaction of neopullulana. **Applied and Environmental Microbiology**. 59 (4): 953–959, 1993.

KWAK, Y. S.; AKIBA, T.; KUDO, T. Purification and characterization of alpha-amylase from Hyperthermophilic Archeon *Thermococcus profundis*, which hydrolyzes both α -1,6, glucosidic linkages. **Journal of Fermentation and Bioengineering**. 86 (4): 363–367, 1998.

LEACH, H.W.; McCOWEN, L.D.; SCHOCH, T.J. Structure of starch granule. I. Swelling and solubility patterns of various starches. **Cereal Chemistry**, 36 (6): 534–544, 1959.

LEE, J. and GRFFIN, J. H. Solid-Phase Total Synthesis of Bacitracin A. **J. Org. Chem.** 61 (12): 1996.

LELOUP, V.; COLONA, P.; BULÉON, A. In B. Godon (Ed.), **Bioconversion of cereal products**. New York: VCH., 79–127, 1994.

LÉVÊQUE, E.; JANECEK, S.; HAYE, B.; BELARBI, A. Thermophilic archaeal amylolytic enzymes. **Enzyme Microbiol. Technol.**, 26 (1): 3–14, 2000.

LOWE, D. A. Fungal enzymes, In: Handbook of Applied Mycology – **Fungal Biotechnology**, V. 04, 681–706, 1992.

MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 58 (4): 428–434, 2002.

MARTIRANI, L.; VARCAMONTI, M.; NACLERIO, G.; DE FELICE, M. Purification and partial characterization of bacillocin 490, a novel bacteriocin produced by a thermophilic strain of *Bacillus licheniformis*. **Microbiol. Cell. Fact.** 1, 1, 2002.

MATUDA, T.G. Análise Térmica da massa de pão francês durante os processos de congelamento e descongelamento: Otimização do uso de aditivos. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) **Escola Politécnica da Universidade de São Paulo**, São Paulo. 142f. 2004.

MCMAHON, H. E. M.; KELLY, C. T.; FOGARTY, W. M. Thermostability of three α -amylases of *Streptomyces* sp. IMD 2679. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, 22, 96–99, 1999.

MEIMA, R., VAN DIJL, J.M. Protein secretion in Gram-positive bacteria. In: Oudega, B. (Ed.), Protein Secretion Pathways in Bacteria. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, p. 273, 2003.

MESTRES, C. Los estados físicos del almidón. In: **CONFERENCIA INTERNACIONAL DE ALMIDÓN**, 1996, Quito. Anais... Quito, p.2. 1996.

MORRISON, W.R. Starch lipids and how they relate to starch granule structure and functionality. **Cereal Food World**, 40 (6): 437-446, 1995

MUHRBECK, P. Annealing effects on potato starch functionality. In: **CONFERENCIA INTERNACIONAL DE ALMIDÓN**, 1996, Quito. Anais... Quito, p.123-128.1996.

MURALIKRISHNA, G. NIRMALA, M. Cereal α -amylases—an overview. **Carbohydrate Polymers**. 60, 163–173. 2005.

MURPHY, T, et al., PARRA, R., RADMAN, R., ROY, I., HARROP, A., DIXON, K., KESHAVARZ, T. Novel application of oligosaccharides as elicitors for the enhancement of bacitracin A production in cultures of *Bacillus licheniformis*, **Enzyme and Microbial Technology**, 2006. doi:10.1016/j.enzmictec.2006.10.030

NAESSENS, M. and VANDAMME, E. R. Multiple forms of microbial enzymes, **Biotechnology Letters**, 25 (14): 1119-1124, 2003

NAKAJIMA, R.; IMANAKA, T.; AIBA, S. Comparison of amino acid sequences of eleven different α -amylases. **Applied Microbiology**, 23 (5): 355–360, 1986.

NAZMI, A. R., Reinisch, t. and Hinz, H. J. Ca-binding to *Bacillus licheniformis* α -amylase (BLA). **Archives of Biochemistry and Biophysics**. 453, 16–23, 2006.

NEBESNY, E. Changes of carbohydrates compositions during enzymatic hydrolysis of starches of various origin. **Starch/Starke**. 45 (12): 426–429, 1993.

NIELSEN, P. H.; MALMOS, H.; DAMHUS, T.; DIDERICHSEN, B.; NIELSEN, H. K.; SIMONSEN, M.; SCHIV, H. E.; OESTERGAARD, A.; OLSEN, H. S.; EIGTVED, P.; NIELSEN, T. K. Enzyme applications (industrial). In: fourth ed.. Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology, Vol. 9. **John Wiley & Sons, Inc, New York**, 567–620, 1994.

NIGAM, P.; SINGH, D. Enzymes and microbial system involved in starch processing. **Enzyme. Microb. Technol.** 17 (9): 770–778, 1995.

ODIBO, F. L. C.; ULBRICH-HOFMANN, R. Thermostable α -amylase and glucoamylase from *Thermomyces lanuginosus* F1. **Acta Biotechnol.** 21 (2): 141–153, 2001.

OLIVEIRA, A. N.; OLIVEIRA, L. A.; ANDRADE, J. S.; CHAGAS-JÚNIOR, A. F. Produção de amilase por rizóbios, usando farinha de pupunha como substrato. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, 27(1): 61-66, 2007.

OUTTRUP, H.; JORGENSEN, S. T. The importance of *Bacillus* species in the production of industrial enzymes. In: Applications and Systematics of *Bacillus* and Relatives (Berkeley, R.C.W., Heyndrickx, M., Logan, N.A. and De Vos, P., Eds.). **Blackwell**, Oxford, 2002.

PANDEY, A.; NIGAM, P.; SOCCOL, C. R.; SOCCOL, V. T.; SINGH, D.; MOHAN, R. Advances in Microbial Amylases, **Biotechnol. Appl. Biochem.**, 31, 135–152, 2000.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MITCHEL, D. New developments in solid state fermentation: l-bioprocesses and products. **Process Biochem.**, 35, 1153–1169, 2000.

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

PARINI, C.; FORTINA, M. G.; MANACHINI, P. L.; DEROSI, E.; RICCARDI, G. Detection and characterization of naturally-occurring plasmids in *Bacillus licheniformis*. **FEMS Microbiol. Lett.** 81, 329–334, 1991.

PEDERSON, H.; NIELSEN, J. The influence of nitrogen sources on the α -amylase productivity of *Aspergillus oryzae* in continuous cultures. **Appl. Microbial Biotechnol.** 53 (3), 278–281, 2000.

PERONI, F.H.G. Características estruturais e físico-químicas de amidos obtidos de diferentes fontes botânicas..Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de alimentos) - **Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”**, São José do Ri o Preto. 118f. 2003.

RAMACHANDRAN, S., PATEL, A. K., NAMPOOTHIRI, K. M., CHANDRAN, S., SZAKACS, G., SOCCOL, C. R., PANDEY, A. Alpha Amylase from a Fungal Culture Grown on Oil Cakes and Its Properties. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. 47 (2): 309-317, 2004.

RAIMBAULT, M. Fermentation en milieu solide, croissance de champignons filamenteux sur substrat amylacé. **O.R.S.T.O.M.** 291.1980.

ROSAS, J. Curso de Biología Molecular Y Celular. **Enzimas: aceleradores de las reacciones químicas de los seres vivos**, 120 p, 2003.

ROSELL, C. M.; HAROS, M.; ESCRIVA, C.; BENEDITO de BARBER, C. Experimental approach to optimize the use of α -amylases in breadmaking. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 49(6): 2973–2977, 2001.

RUBINDER, K.; CHADHA, B. S.; SINGH, N.; SAINI, H. S. and SINGH, S. Amylase hyperproduction by *T. lanuginosus* mutants. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**. 29, 70 –74, 2002.

SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R. Enzimas como agentes Biotecnológicos. Ribeirão Preto: **Legis Summa**, 412 p, 2004.

SALVA, T. J. G. Alfa-amilase de *Bacillus subtilis* ATCC 601 B: produção e propriedades da enzima não purificada. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, **Universidade Estadual de Campinas**, 1990.

SÁNCHEZ–PORRO, C.; MARTINS, S.; MELLADO, E. and VENTOSA, A. Diversity of moderately halophilic bacteria producing extracellular hydrolytic enzymes, **Journal of Applied Microbiology**, 94, 295-3000, 2003.

SASAKI, T.; YASUI, T.; MATSUKI, J. Effect of amylose content on gelatinization, retrogradation and pasting properties of starch from waxy and nonwaxy wheat and their F1 seeds. **Cereal Chemistry**, 77 (1): 58-63, 2000.

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

SCHALLMEY, M.; SINGH, A.; WARD, O. P. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. **Can. J. Microbiol.** 50, 1–17, 2004.

SCHOMBURG, D., SALZMANN, M. Hydrolases. Enzyme Handbook. **Springer-Verlag**, Berlin Heidelberg, . 1 –11. 1991.

SHIGECHI, H., KOH, J., FUJITA, Y., MATSUMOTO, T., et al. Direct Production of Ethanol from Raw Corn Starch via Fermentation by Use of a Novel Surface-engineered Yeast Strain Codisplaying Glucoamylase and α -Amylase. **Appl. Environ. Microbiol.** 70 : p. 5037–5040, 2004.

SIMONEN, M.; PALVA, I. Protein secretion in *Bacillus* species. **Microbiol. Rev.** 57, 109–137, 1993.

STAUFFER, C. E. Enzymes used in bakery products. 1. Fundamentals of enzymes. **AIB. Tech. Bull.** XVI/4, 1–6, 1994a.

STAUFFER, C. E. Improvements in enzyme technology expand the range of biological catalysts available and their applications. **Baking Snack. November**, 31–41, 1994b.

STEWART, T. L.; FOGLER, H. S. Biomass plug development and propagation in porous media. **Biotechnol. Bioeng.**, 72, p. 353–363, 2001.

STONER, M. R., et al. Ca^{2+} -Surfactant Interactions Affect Enzyme Stability in Detergent Solutions. **Biotechnol. Prog.** 21: p. 1716-1723, 2005.

SUVD, D.; FUJIMOTO, Z.; TAKASE, K.; MATSUMURA, M.; MIZUNO, H. Crystal structure of *Bacillus stearothermophilus* alpha-amylase possible factors determining the thermostability. **Journal of Biochemistry.** 129: 461–468, 2001.

TAFFARELLO, L. A. B. Produção, purificação parcial, caracterização e aplicações de alfa-amilase termoestável produzida por bactérias. Tese (Mestrado em Ciências dos Alimentos) – Faculdade de Ciência Alimentos, **Universidade Estadual de Campinas**, 2004.

THOMAS, D.J., ATWELL, W. Starches: Practical Guides for the Food Industry. **Minnesota: Eagan Press**, 94p. 1999.

TIGUE, M. A.; KELLY, C. T.; DOYLE, E. M.; FOGARTY, W. M. The alkaline amylase of the alkalophilic sp. IMD 370. **Enzyme Microbial Technol.** 17, 570–573, 1995.

UMA MAHESWAR RAO, J. L.; SATYANARAYANA, T. Improving production of hyperthermostable and high maltose-forming α -amylase by an extreme thermophile *Geobacillus thermoleovorans* using response surface methodology and its applications. **Bioresource Technology**. 98, 345–352, 2007.

VAN DER MAAREL et al. Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. **Journal of Biotechnology**, 94, p. 137–155, 2002.

VEITH, B.; HERZBERG, C.; STECKEL, S.; FEESCHE, J.; MAURER, K. H.; EHRENREICH, P.; BAUMER, S.; HENNE, A.; LIESEGANG, H.; MERKL, R.; EHRENREICH, A.; GOTTSCHALK, G. The complete genome sequence of *Bacillus licheniformis* DSM13, an organism with great industrial potential. **J. Mol. Microbiol. Biotechnol.** 7, 204–211, 2004.

VISWANATHAN, P.; SURLIKAR, N. R. Production of α -amylase with *Aspergillus flavus* on Amaranthus grains by solid-state fermentation. **Journal of Basic Microbiology**, 41(1), 57–64, 2001.

WALSH, G. Industrial enzymes, an introduction. In: Walsh, G. (Ed.), **Biochemistry and Biotechnology**. John Wiley and Sons Corporation Limited, New York, pp. 393–454, 2002.

WANDERLEY, K. J., TORRES, F. A. G., MORAES, L. M. P. and ULHOA, C. J. Biochemical characterization of α -amylase from the yeast *Cryptococcus flavus*. **FEMS Microbiology Letters**. 231: p. 165–169, 2004.

WANG, Y.J.; WHITE, P., POLLAK, L. Physicochemical properties of starches from mutant genotypes of the Inbred line. **Cereal Chemistry**, 70 (2): 199–203, 1993.

WESTERS, L.; WESTERS, H.; QUAX, W. J. *Bacillus subtilis* as a cell factory for pharmaceutical proteins: a biotechnological approach to optimize the host organism. **Biochim. Biophys. Acta.** 1694, 299–310, 2004.

WHISTLER, R. L., TURNER, E. S. Fine structure of starch granule sections. **Journal Polymer Science**, New York, 18, 153-156, 1955.

WHISTLER, R.L.; DANIEL, J.R. Carbohidratos In: FENNEMA O.R. **Química de los alimentos** Zaragoza: Acribicia, , 81-156. 1993.

YOU, S. et al. Separation and characterization of barley starch polymers by a flow field-flow fractionation technique in combination with multiangle light scattering and differential refractive index detection. **Cereal Chemistry**, 79 (5): 624-630, 2002.

ZHENG, G.H.; SOSULSKI, F.W. Determination of water separation from cooked starch and flour pastes after refrigeration and freeze-thaw. **Journal of food science**, 63 (1): 134-139, 1998.

ZHOU, M. et al. Structure and Pasting Properties of Oat Starch. **Cereal Chemistry**, 75 (7): 273-281, 1998.

Capítulo 2

Production of Amylase in Submerged Culture for *Bacillus licheniformis* Using Alternative Medium

Daniel Paulo de Oliveira¹, Kaoru Okada^{1,2} e Carlos Alberto Alves da Silva^{1,2*}

1- Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais; 2- Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais (NPCIAMB), Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP), R. do Príncipe, 526, Boa Vista, Recife, PE., Brasil

ABSTRACT

The microbial enzyme use has increased in the last years, therefore the same ones present a series of advantages front of animal and vegetal origin. The alpha amylases are enzymes produced for diverse types of microorganisms, mainly of the *Bacillus* genus. Screening with isolated samples of *Bacillus licheniformis* was carried through one of soil contaminated with oil in the 28 and 37°C. The isolated sample UCP 1009 isolated at 37 °C, presented the best ones resulted in the test of detection of amylase, being chosen for the assays of kinetic production with three medium of culture with different starch sources (soluble starch, potato starch and maize starch). The results obtained evidenced that the maize starch shown an specific activity of 0.756 U/mg, and a pH of 8.82 and enzymatic activity of 0.99 U/dL.

Key words: amylase, *Bacillus licheniformis*, enzyme production.

INTRODUCTION

In the last years, the enzymes have been the microbial products more explored in the biotechnological industry, being widely used in the processing of foods, production of biological detergents, in the textile industry, pharmaceutical, in the biochemistry, molecular biology and diverse biomedical applications (Said and Pietro, 2004).

The ample utilization of enzymes comes to be reflection of the raised specificity of its action as biocatalyst, however enzymes with the same profile of actuation under the same substratum, can expose a good functioning in pH and temperature different. Due the presence of these variables, the screening of adequate enzymes to the conditions makes necessary the one use where the same ones will be used (Lowe, 1992; Boersma, et al.; 2007). α -amylases can also be produced by processes of submerged fermentation (Fogarty and Kelly, 1980; Kruger et al, 1987; Bose and Das, 1996; Egas et al., 1998; Aguilar, et al., 2000) or in solid state (Raimbault, *1980; Viswanathan and Surlikar, 2001).

Amongst the diverse applications of amylase, rebounds the manufacture of bread, of leavened drink industry, of ethanol, in the textile industries, of tannery, pharmaceutical and of detergent (Pandey et al., 2000; Ben Ali, 2001; Rosell et al., 2001; Gupta et al. 2003; Shigechi et al. 2004; Stoner et al. 2005; Couto and Sanromán, 2006; Avivi; Gedanken, 2007). α -amylases can be produced in bacteria, leavenings and fungi. Strains of *Aspergillus sp* and *Bacillus sp*, especially *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus licheniformis* are the most used in industrial applications. Studies were carried out with the production of alpha-amylase using *B. licheniformis* UCP 1009, having as inductive substratum the soluble starch and two alternative starch sources (maize and potato) through an factorial planning 2³, having 4 central points and response variable the production of alpha amylase.

MATERIALS AND METHODS

Microorganisms

Samples of five isolated of *B. licheniformis* in different temperatures (28 and 37 °C) were used,

* Author for correspondence

from the ground of the port of the city of Recife, and deposited in the Collection of Cultures of the Nucleus of Research in environmental sciences (NPCIAMB), University Catholic of Pernambuco (UNICAP), kept in nutrient agar.

Amylase detection

Cellular Suspension and Inoculum

After 24 hours of growth, had been removed colonies and made the cellular suspensions in pipes of assay contend 10mL of sterile water. After homogenization, had been removed 100 μ L of the suspension and inoculated in plates of Petri contend the specific medium for detention of the enzymatic activity. For the detention of the amylase activity the methodology of Hankin and Anagnostakis was used (1975), using the medium Agar Nutritive (AN) supplemented of a solution of 0,2% of soluble starch (pH 6,0). The medium of culture was distributed in plates of Petri, and after the solidification was made a well in the center of the plates, with diameter of 0,8 cm. In following had been inoculated 100 μ L of the suspension of spores previously prepared. The plates had been incubated to the 28, 37, 45 and 50 °C, during 72 hours with daily accompaniment. After the period of microbial growth, the plates had been disclosed with an iodine solution 0,1N during 5 minutes. The formation of a transparent halo around the colony, evidenced the presence of amylase (figure 1). All the assays had been carried out in triplicates.

Alfa-Amylase Production

Pre-inoculum - the bacterial culture was grown "overnight" in pipes contends medium AN and transferred to flasks of Erlenmeyers of 250 mL of capacity, contends 50 mL of Nutrient Broth for 18 hours, at 37 °C until the microorganism to reach a $DO_{600nm} = 1,0$.

Fermentative process - 10 % of the inoculum were transferred to Erlenmeyers flasks of 500 mL, contend 250 mL of the standard medium of production of amylase contend commercial starch and the alternative medium contend other starch sources (maize starch, potato starch). The Erlenmeyers were incubated under agitation of 150 rpm, at 37 °C, during 96 hours.

Kinetic of Production - It was followed through the determination of the growth curve, of the

variation of pH, the glucose consumption for the method of the DNS. The maximum speed of growth (μ_{max}) and the time of generation (T_g) had been determined in accordance with the described methodology for PIRT (1975).

Amylase activity

The analysis of the amylolytic activity was carried out based in the described method for Caraway (1959). 0,5 mL of iodine solution (0,01N) was added in the samples of 0,5 mL of the supernatant. The samples were homogenized, and read in spectrophotometer at 660 nm. To quantify the activity of amylase, the following equation was used:

$$\text{Units of amylase/dL} = (\text{Abs (control)} - \text{Abs (sample)}) / \text{Abs (control)}$$

The control consisted of the medium of production without the enzyme, and the gotten result was express in Units for deciliter (U/dL).

Quantitative activity of Alpha Amylase

The enzymatic activity was carried out using the described methodology for Smith & Roe, cited for Medda, et al., (1980). The determination of the enzymatic activity consisted of the reaction mixture (0,5 mL of starch solution 1% + 0,4 mL of phosphate buffer 0,05M (pH 7,5) + 0.1 mL of the metabolic liquid). The reaction mixture was kept in warm bath (60 °C) per 30 minutes. The reaction was interrupted placing all the pipes in ice bath. Aliquot of 100 μ L had been removed of the reaction of mixture and added 0,9 μ L of reagent DNS. The pipes were warmed in bath per 5 minutes. After the warming, was made the cooling of the pipes in water current and made the readings in spectrophotometer Biochrom Libra S-32 at 540 nm, having as standards the soluble starch, of maize and potato.

Total proteins

The total proteins were determined using the kit LABTEST Diagnostic. The principle of this technique consists of the reaction of proteins with biuret developing a coloration purple, proportional to the protein concentration in the sample. The reading was carried out in one spectrophotometer Biochrom S-32 Pound the 545 nm.

Factorial planning - A complete factorial planning with 2^3 with 4 central points was carried out to analyze the main effect and the interactions of the variable peptone, extract of meat and starch on the alpha amylase production. The codified matrix of the planning and the independent values in levels -1, 0 and +1 (table 1). The analysis of the results was carried out using the program STATISTICA version 6.0 of the Statsoft, the USA.

Table 1 - Planning of the variable with 2^3

Factor (g/L)	Levels		
	+1	0	-1
Extract of meat	10	7,5	5
Peptone	6	4,5	3
Starch	4	3	2

RESULTS AND DISCUSSION

For an evaluation of the enzymatic profile of the 05 samples of *Bacillus licheniformis* isolated in different temperatures (28 and 37 °C) in the samples proceeding from the soil contaminated by oil, in the port of the city of Recife was carried out one screening enzymatic for detection of amylase for the described method for Hankin and Anagnostakis, 1975. The gotten results are described in table 1, that they evidence that called sample UCP 1009, isolated at 37 °C presented the formation of a characteristic halo of 55 mm, after 72 hours of enzymatic assay (Figure 1).

After the election of the producing microorganism of amylase, was carried out a factorial planning 2^3 , to select the fixed number of variable for execution of experiments for all the possible combinations of the levels of the factors. Table 2 describes the utilization of a medium of production (g/L) from the component of medium production it: extract of meat, peptone and starch. 36 experiments with different levels of concentration of substrate calculated through the proposal matrix. Sánchez-Porro et al., (2003); Santos and Martins (2003) had described the importance and the diverse concentrations of the components in the medium of production of bacterial amylases and had reported that the composition of the medium affects the production of amylase directly, due to the process of sporulation presented for diverse species of *Bacillus*, mainly the *B. licheniformis*.

The presence of the starch in the composition of the medium of production, is considered an excellent inductor of the amylase production. It was also verified that the excess of nitrogen source can cause a drastic reduction of the production of amylase (Naessens and Vandamme, 2003; Haki and Rakshit, 2003; Gupta et al., 2003).

The substitution of carbon sources as the dextrin, glucose, lactose, maltose and the soluble starch in the medium of production, for agricultural by-products of low cost as flours and brans of different grains and tubercles, as the rice, barley, maize, wheat, cassava and potato, it becomes the process of enzymatic production of microbial enzyme more economic (Ramesh al., 2001; Haq et al, 2002; Haq et al., 2005; Oliveira et al., 2007).

In the figure 2A is described the curve of growth of *Bacillus licheniformes* UCP 1009 in the medium contends soluble starch. The maximum speed of growth was of $0,59 \text{ h}^{-1}$ and a time of generation of 1,16 hours. The glucose consumption (figure 2B) was evidenced a discrete consumption in the first 24 hours of growth. The production of the alpha amylase was evidenced through the quantitative determination of amylase (figure 2C), demonstrating that the activity kept constant and got a maximum peak at 72 hours of the $0,97 \text{ U/mL}$.

The Diagram of Pareto presents the result of response variable for the amylase activity with 72 hours of production using the medium contends soluble starch (figures 3A and 3B). It is observed that for the assurance level of 95% only the independent variables starch and peptone had produced a negative effect and statistically significant for the amylase activity (figure 2A). However, for the specific activity, a positive effect for the peptone was observed, being the same, statistically significant.

The data gotten with the use of the medium contend potato starch are described in figure 4. The growth curve (4A) presented a maximum activity of $0,38 \text{ h}^{-1}$ and a generation time of 1,81 hours. The glucose consumption (4B) also showed little accented in the first 24 hours of fermentation and the quantitative activity (4C) presented a fast addition after 48 hours of production. Figure 5 (A and B) present the Diagram of Pareto referring to the effect of the components of the medium contend as inductive of the amylase activity produced by *B.*

licheniformis. It was observed that the peptone and the starch had presented negative effect, however with independent variable statistically significant. The results demonstrate that to as much the starch as the peptone had influenced directly in the increase of the amylase activity.

In the figure 6 are described the gotten results using the maize starch. The growth curve (figure 6A) presented a maximum speed of growth of $0,23 \text{ h}^{-1}$, and a time of generation of 3 hours. The glucose consumption (figure 6B) kept constant during first the 48 hours of microbial growth. With regard to amylase activity (figure 6C) an increase from the 36 hours was detected and keeping constant during all the assay. Figure 7 presents the codified experiments and the result of the reply variable amylase activity of the enzymatic extract of the medium using the maize starch. In the diagram of Pareto of standardized effect for the assurance level of 95%, observes the independent variables extract of meat and peptone, with positive effect and statistically significant for the activity of amylase and the specific activity. In the moreover variables ones, the effect are not significantly important, even so the starch have presented a positive effect.

PH is one of the most important factors of that they determine the growth and the morphology of the producing microorganism and diverse existing biotechnological products, mainly the microbial enzymes, therefore the same ones are sensible the concentration of ions H^+ existing in the medium. Diverse studies carried out, had disclosed that the fungus due its eukaryotic structure need pH acid and the bacteria of pH neutral for the growth and consequently pH alkaline for the enzymatic production. The pH affects the synthesis and secretion for the extracellular medium of alpha-amylase, thus affecting the stability of the chemistry composed formed. Cultures of *B. Subtilis*, *B. licheniformis* and *B. amyloliquefaciens* need one pH initial in the band of 7,0 and to the ending of the fermentative process, alkaline values in the band of 8,0 to produce the diverse types of microbial enzymes and bacterial biotechnological products. The values of pH in the microbial growth are described in table 2, that they describe the twelve used different conditions in the factorial planning, demonstrating that after 72 hours of growth, all the gotten values was found in the alkaline band, presenting values of 8,70 the 8,86 for the three tested medium. These values

coincide with described in literature for alpha amylase production (Meers, 1972; Saito and Yamamoto, 1975; Rothstein, et al., 1986; Haq, et al., 2005; Gupta, et al., 2003).

CONCLUSIONS

Ahead of the gotten results it was possible to conclude that:

In the enzymatic screening all the tested samples had presented the formation of the characteristic halo of the production of amylase, however the called sample UCP 1009, isolated at 37°C , presented the biggest gotten characteristic halo, that was of 55 mm;

In the assays of kinetic of growth, the medium contend soluble starch presented a specific tax of growth of $0,59 \text{ h}^{-1}$ and time of generation of 1,16 hours, while that the alternative medium of maize and potato, had presented tax specific of growth of $0,23$ and $0,38 \text{ h}^{-1}$ and times of generation of 1,81 and 3 hours, respectively;

The best ones resulted had been gotten with the medium contend maize starch, that presented values of specific activity of $0,756 \text{ U/mg}$, pH of 8,82 and 0,99 a quantitative activity of amylase of U/dL.

RESUMO

A utilização de enzimas microbianas têm aumentado consideravelmente nos últimos anos, pois as mesmas apresentam uma série de vantagens frente as de origem animal e vegetal. As alfa-amilases são enzimas produzidas por diversos tipos de microrganismos, principalmente do gênero *Bacillus* em diferentes temperaturas. Foi realizado um screening com amostras de *Bacillus licheniformis* isoladas de solo contaminado com petróleo nas temperaturas de 28 e 37°C . A amostra UCP 1009 isolada a 37°C , apresentou os melhores resultados no teste de detecção da amilase, sendo escolhida para os ensaios de produção cinética utilizando três meios de cultivo com fontes de amido diferentes (amido solúvel, amido de batata e amido de milho) através de um planejamento experimental 2^3 . Os resultados obtidos evidenciaram uma maior produção de alfa amilase no meio contendo amido de milho, que apresentou uma atividade específica de $0,756 \text{ U/mg}$, pH de 8,82 e

uma atividade quantitativa da amilase de 0,99 U/dL.

BIBLIOGRAPHICAL REFERENCES

- Aguilar, G.; Morlon-Guyot, J.; Trejo-Aguilar, B. and Guyot, J. P. Purification and characterization of an extracellular alpha-amylase produced by *Lactobacillus manihotivorans* LMG 1801 (T), an amyolytic lactic acid bacterium. *Enzyme and Microbial Technology*, **27** (6): 406–413, 2000.
- Avivi (Levi), S.; Gedanken, A. Are sonochemically prepared alpha-amylase protein microspheres biologically active?. *Ultrasonics Sonochemistry*, **14**, 1–5, 2007.
- Ben Ali, M., Mhiri, S., Mezghani, M., Bejar, S. Purification and sequence analysis of the atypical maltohexaose forming alpha-amylase of the *B. stearothermophilus* US100. *Enzyme Microbial Technol.* **28** (6): 537–542, 2001.
- BOERSMA, Y. L.; DRÖGE, M. J. and QUAX, W. J. Selection strategies for improved biocatalysts. *FEBS Journal*. **274**, 2181–2195, 2007
- Bose, K.; Das, D. Thermostable alpha-amylase production using *Bacillus licheniformis* NRRL B 14368. *Ind. J. Exp. Biol.*; **34** (12):1279–82, 1996.
- Caraway, W. T., A stable starch substrate for the determination of amylase in serum and other body fluids. *Am. J. Clin. Pathol.* **32**, 97-99, 1959.
- Couto, S. R., Sanromán, M^a Ángeles. Application of solid-state fermentation to food industry - A review. *Journal of Food Engineering*. **76** (3): 291–302, 2006.
- Egas, M. C.; Da Costa, M. S.; Cowan, D. A.; Pires, E. M. Extracellular alpha-amylase from *Thermus filiformis* Ork A2: Purification and biochemical characterization. *Extremophiles*, **2** (1): 23–32, 1998.
- Fogarty, W. M.; Kelly, C. T. in *Economic Microbiology, Microbial Enzymes and Bioconversions*, vol. **5** (Rose, A. H., ed.), London, Academic Press, 115–170, 1980.
- Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V. K. and Chauhan, B. Microbial alpha-amylases: a biotechnological perspective. *Process Biochemistry*, **38** (11): 1599–1616, 2003.
- Haki, G. D.; Rakshit, S. K. Developments in industrial important thermostable enzymes: a review. *Biosource Technology*. **89** (1): 17–34, 2003.
- Hankin, L.; Anagnostakis, S. L. The use of solid media for detection of enzymes production by fungi. *Mycologia*, **67** (3): 597-607, 1975.
- Haq, I; Ashraf, S; Omar, S; Qadeer, M.A. Biosynthesis of amyloglucosidase by *Aspergillus niger* using wheat bran as substrate. *Pak. J. Biol. Sci.*, **5** (9): 962-964, 2002.
- Haq, I; Ashraf, S; Qadeer, M.A; Iqbal, J. Pearl millet, a source of the alpha amylase production by *Bacillus licheniformis*. *Bioresour. Technol.* **96** (10):1201-1204, 2005.
- Lowe, D. A. Fungal enzymes, In: *Handbook of Applied Mycology – Fungal Biotechnology*, V. **04**, 681–706, 1992.
- Kruger, J. E.; Lineback, D. R. In J. E. Kruger, D. Enzymes and their role in the cereal technology. Lineback, and C. E. Stautter (Eds.), 117–139, 1987. St Paul, Minnesota: AACC.
- Meers, J.L. The regulation of alpha-amylase production in *Bacillus licheniformis*. *Antonie van Leeuwenhoek*, **38**, 585-590, 1972.
- Medda, S.; Chandra, K. New strains of *Bacillus licheniformis* and *Bacillus coagulans* producing thermostable alpha-amylase active at alkaline pH. *Journal of Applied Bacteriology*. **48**, 47-58, 1980.
- Naessens, M. and Vandamme, E. R. Multiple forms of microbial enzymes, *Biotechnology Letters*, **25** (14): 1119-1124, 2003
- Oliveira, A.N; Oliveira, L.A; Andrade, J.S; Chagas-Júnior, A.F. Produção de amilase por rizóbios, usando farinha de pupunha como substrato, *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, **27** (1): 61-66, 2007.
- Pandey, A.; Soccol, C. R.; Mitchel, D. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. *Process Biochem.*, **35**, 1153–1169, 2000.
- Pirt, S.J. Principles of microbe and cell cultivation. London : Blackwell Scientific. 214-215, 1975.
- Raimbault, M. Fermentation en milieu solide, croissance de champignons filamenteux sur substrat amylicé. O.R.S.T.O.M. 291.1980.
- Ramesh, B; Reddy, P.R.M; Seenayya, G.; Reddy, G. Effect of various flours on the production of thermostable alpha-amylase and pullulanase by *Clostridium thermosulfurogenes* SV2. *Bioresour. Technol.* **76** (2): 169-171,2001.
- Rosell, C. M.; Haros, M.; Escriva, C.; Benedito de Barber, C. Experimental approach to optimize the use of alpha-amylases in breadmaking. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49** (6): 2973–2977, 2001.
- Rothstein, D. M; Devlin, P.E; Cate, R.L. Expression of alpha-amylase in *Bacillus licheniformis*. *Journal of Bacteriology*, **168** (2): 839-842, 1986.
- Said, S.; Pietro, R. C. L. R. Enzimas como agentes Biotecnológicos. Ribeirão Preto: Legis Summa, 412 p, 2004.
- Saito, N; Yamamoto, K. Regulatory factors affecting alpha-amylase production in *Bacillus licheniformis*. *Journal of Bacteriology*, **121** (3): 848-856, 1975.
- Sánchez-Porro, C.; Martins, S.; Mellado, E. and Ventosa, A. Diversity of moderately halophilic bacteria producing extracellular hydrolytic enzymes, *Journal of Applied Microbiology*, **94**, 295-3000, 2003.
- Santos, E. O. and Martins, M. L. L. Effect of the Medium Composition on Formation of Amylase by

- Bacillus sp.* Brazilian Archives of Biology and Technology. **46** (1): 129-134, 2003
- Shigechi, H., Koh, J., Fujita, Y., Matsumoto, T., et al. Direct Production of Ethanol from Raw Corn Starch via Fermentation by Use of a Novel Surface-engineered Yeast Strain Codisplaying Glucoamylase and α -Amylase. Appl. Environ. Microbiol. **70**, 5037-5040, 2004.
- Stoner, M. R., et al. Ca^{2+} -Surfactant Interactions Affect Enzyme Stability in Detergent Solutions. Biotechnol. Prog. **21**, 1716-1723, 2005.
- Viswanathan, P.; Surlikar, N. R. Production of α -amylase with *Aspergillus flavus* on Amaranthus grains by solid-state fermentation. Journal of Basic Microbiology, **41** (1): 57-64, 2001.

Tabela 2 – Seleção de linhagens de *Bacillus licheniformis*, produtoras de amilase em meio sólido de acordo com Hankin e Anagnostakis

Amostras de <i>Bacillus licheniformis</i>	Temperatura	Amilase*		
		24h	48h	72h
UCP 1014	28°C	25	30	35
UCP 1016	28°C	25	35	40
UCP1008	37°C	30	40	55
UCP 1009	37°C	35	45	55
UCP1010	37°C	25	40	50

*Halos medidos em mm.

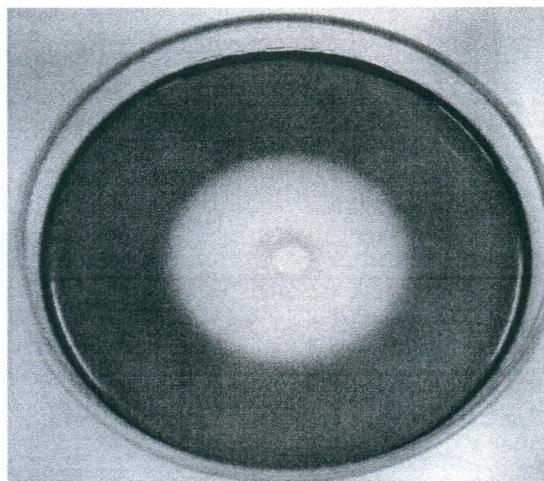


Figura 1 - Ensaio enzimático para amilase com a linhagem bacteriana de *Bacillus licheniformis* (UCP 1009), em meio AN acrescido de amido, após a adição da solução iodo-iodeto de potássio (solução lugol).

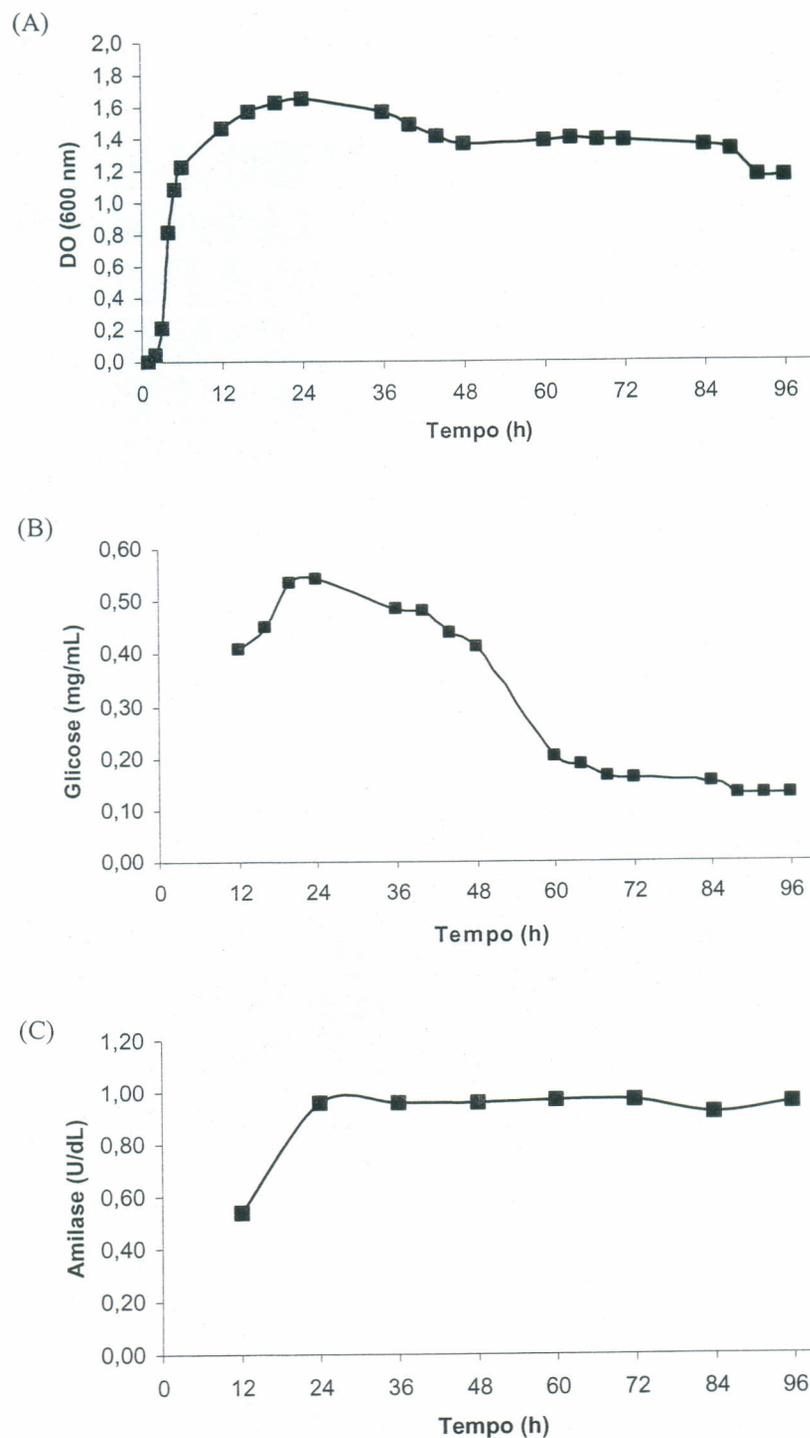


Figura 2- Curva de crescimento do *Bacillus licheniformis* no meio contendo amido solúvel (A), durante 96hrs. Consumo de glicose pelo método do DNS (B) e produção de α -amilase (C).

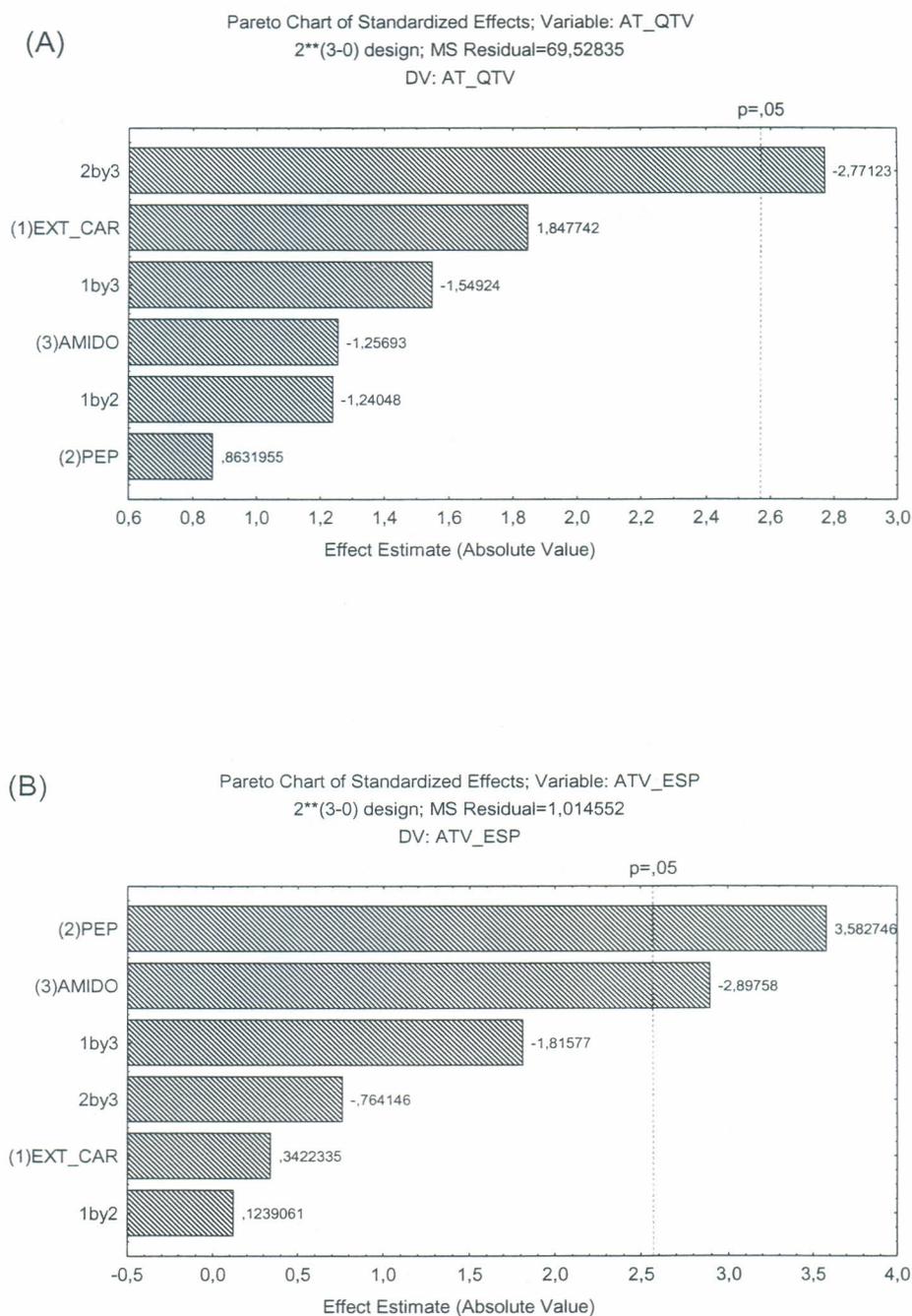


Figura 3 – Diagrama de Pareto dos efeitos das variáveis utilizadas sobre a atividade da amilase produzida em *Bacillus licheniformis*. (A) Atividade amilásica (U/mL); (B) Atividade específica (U/mg).

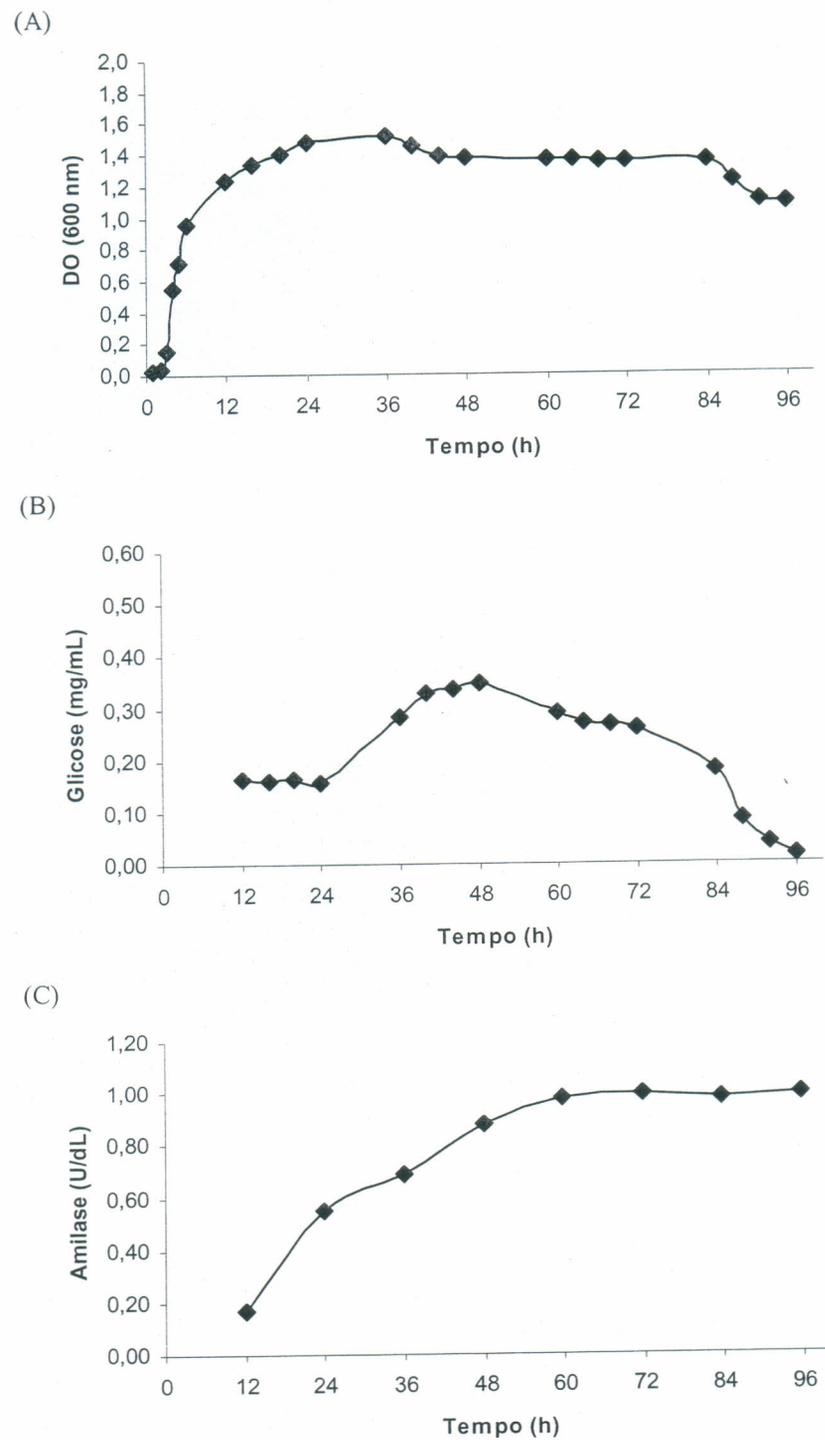


Figura 4- Curva de crescimento do *Bacillus licheniformis* (UCP 1009) no meio contendo amido de batata (A), durante 96hrs. Consumo de glicose pelo método do DNS (B) e produção de α -amilase (C).

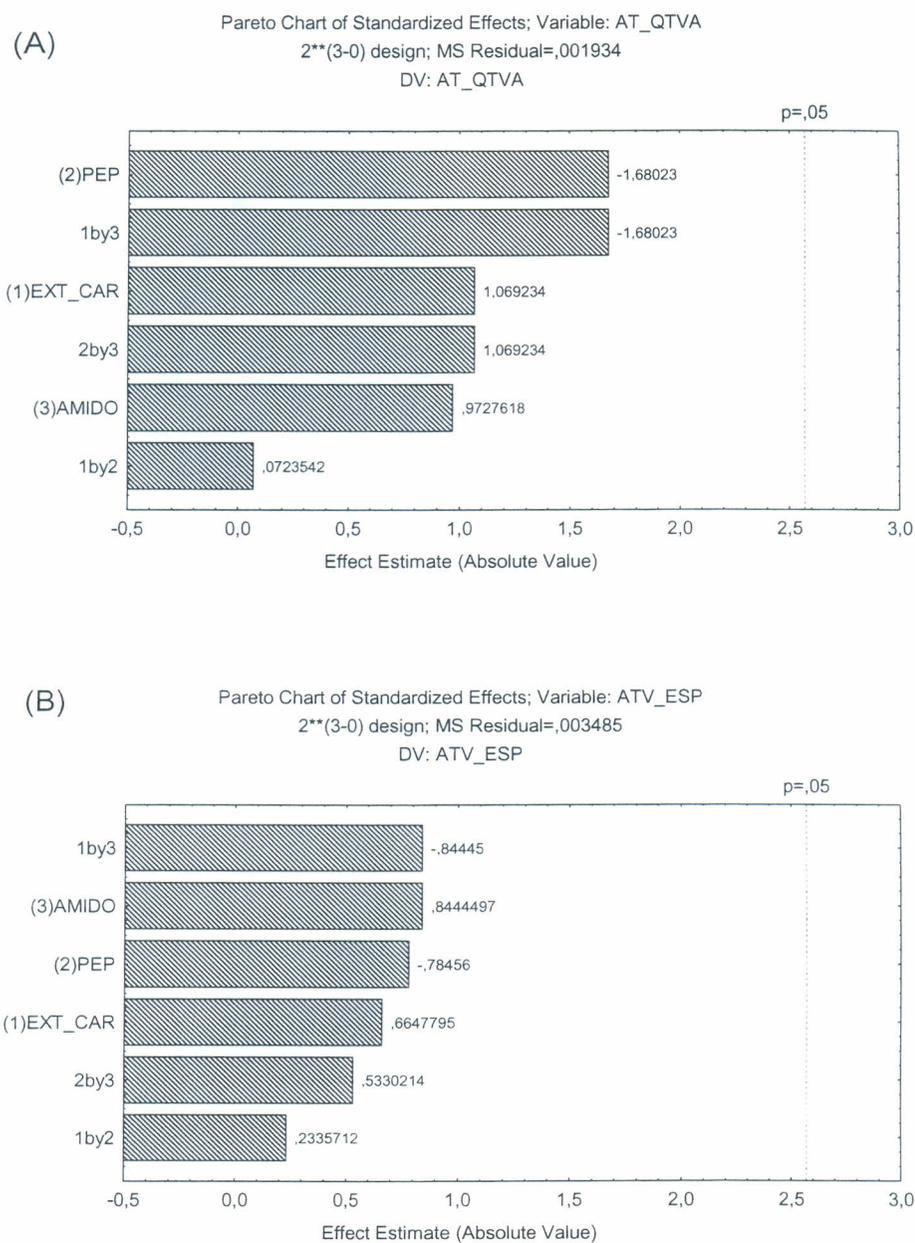


Figura 5 – Diagrama de Pareto dos efeitos das variáveis utilizadas sobre a atividade da amilase no amido de batata produzida em *Bacillus licheniformis*. (A) Atividade amilásica (U/mL); (B) Atividade específica (U/mg)

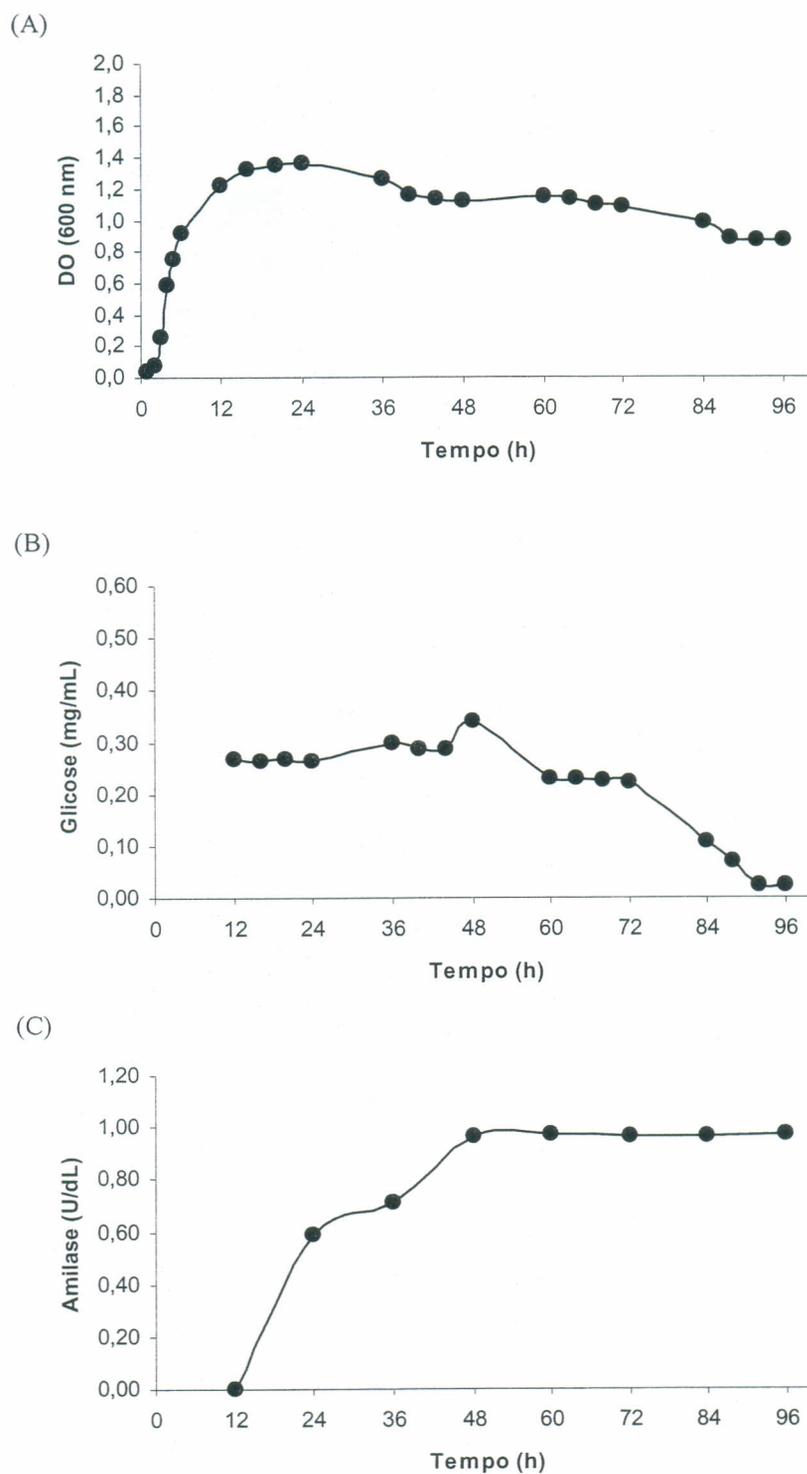


Figura 6- Curva de crescimento do *Bacillus licheniformis* (UCP 1009) no meio contendo amido de milho (A), durante 96hrs. Consumo de glicose pelo método do DNS (B) e produção de α -amilase (C).

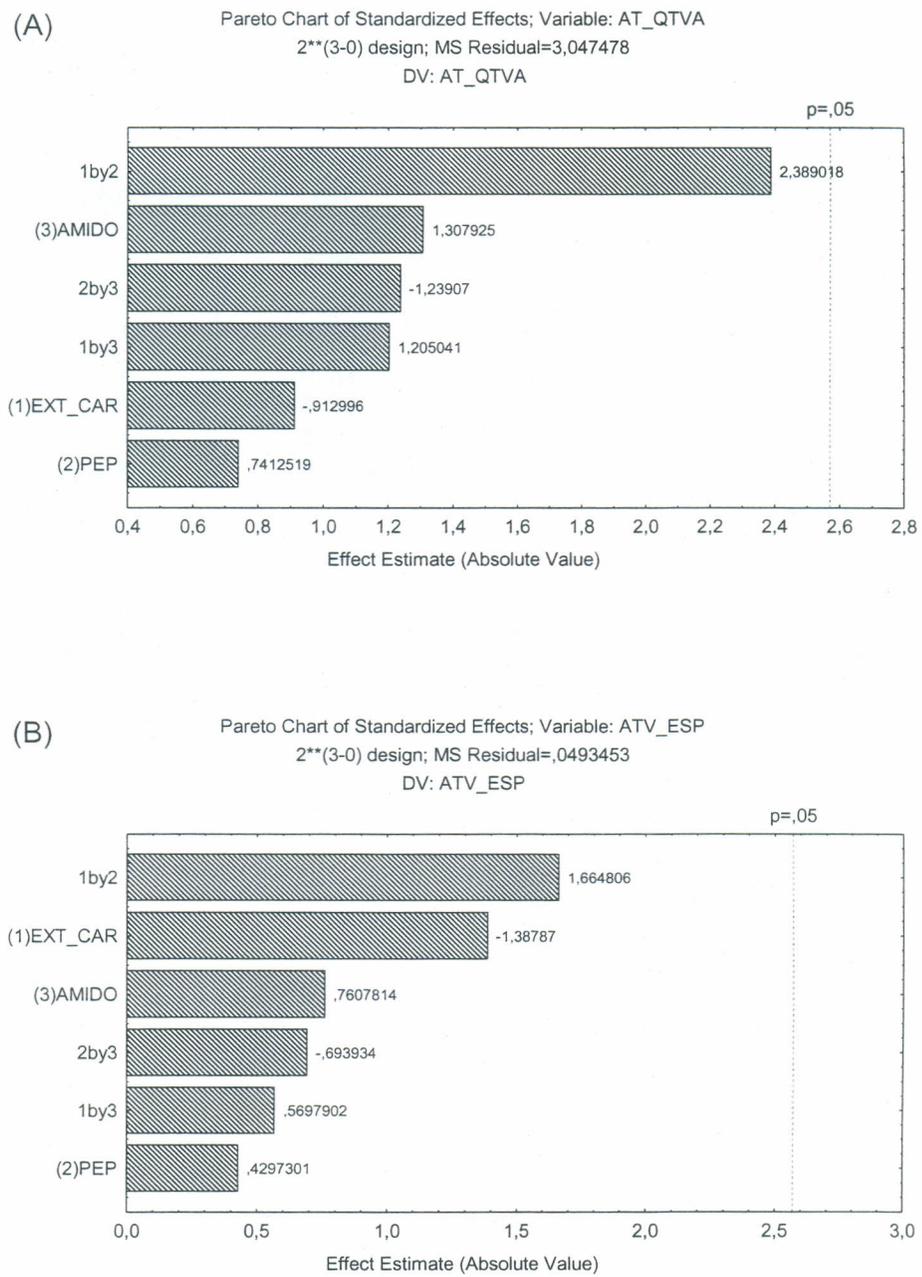


Figura 7 – Diagrama de Pareto dos efeitos das variáveis utilizadas sobre a atividade da amilase no amido de milho produzida em *Bacillus licheniformis*. (A) Atividade amilásica (U/mL); (B) Atividade específica (U/mg).

Tabela 3 – Valores de pH obtidos durante a produção de amilase por *Bacillus licheniformis* durante o planejamento fatorial.

*Condições	Amido solúvel	Amido de batata	Amido de milho
	pH	pH	pH
1	8,82	8,83	8,82
2	8,70	8,78	8,83
3	8,57	8,86	8,80
4	8,73	8,84	8,74
5	8,83	8,84	8,82
6	8,72	8,76	8,79
7	8,83	8,83	8,80
8	8,73	8,78	8,81
9	8,72	8,83	8,81
10	8,80	8,82	8,75
11	8,77	8,83	8,82
12	8,74	8,83	8,78

* Condições utilizadas no crescimento envolvendo o planejamento fatorial, onde cada ponto apresenta concentrações dos reagentes diferenciados, durante 72 horas.