

PRODUÇÃO SIMULTÂNEA DE α -AMILASE E PROTEASES PELO
Bacillus sp. SMIA-2 TERMOFÍLICO E APLICAÇÃO DESTAS
ENZIMAS EM FORMULAÇÕES DE DETERGENTE

THAMY LÍVIA RIBEIRO CORRÊA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
FEVEREIRO - 2009

PRODUÇÃO SIMULTÂNEA DE α -AMILASE E PROTEASES PELO
Bacillus sp. SMIA-2 TERMOFÍLICO E APLICAÇÃO DESTAS
ENZIMAS EM FORMULAÇÕES DE DETERGENTE

THAMY LÍVIA RIBEIRO CORRÊA

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

Orientador: Prof^a. Meire Lelis Leal Martins

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
FEVEREIRO – 2009

PRODUÇÃO SIMULTÂNEA DE α -AMILASE E PROTEASES PELO
Bacillus sp. SMIA-2 TERMOFÍLICO E APLICAÇÃO DESTAS
ENZIMAS EM FORMULAÇÕES DE DETERGENTE

THAMY LÍVIA RIBEIRO CORRÊA

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

Aprovada em 10 de fevereiro de 2009

Comissão Examinadora:

Prof^a. Marília Amorim Berbert de Molina (D.Sc., Tecnologia Bioquímico-
Farmacêutica) - UENF

Prof^a. Adriane Nunes de Souza (D.Sc., Ciências) - UENF

Prof^a. Raquel Vieira de Carvalho (D.Sc., Ciências) – UFES

Prof^a. Meire Leis Leal Martins (PhD., Microbiologia Industrial) - UENF
(Orientadora)

A Anabela e Lucas, dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo ânimo ao levantar todas as manhãs e pela certeza constante de que não vivo em vão;

A Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro por tornar meu grande sonho, realidade;

A CAPES pela concessão da bolsa de estudos;

À professora Meire Lelis Leal Martins pelos conhecimentos dispensados durante a graduação e o mestrado.

Às professoras Marília Amorim Berbert de Molina, Adriane Nunes de Souza e Raquel Vieira de Carvalho pela gentil contribuição a este trabalho ao aceitarem fazer parte da banca;

Aos demais professores do Laboratório de Tecnologia de Alimentos – LTA;

À estagiária Stella Karla dos Santos Moutinho pela amizade e ajuda nos experimentos;

À amiga Luciana Pinto de Azevedo Konda pela amizade, principalmente nos últimos meses;

Aos meus pais Ilza e Geraldo por chorarem minhas derrotas e cantarem as minhas alegrias sempre ao meu lado;

As minhas irmãs, cunhados e sobrinhos Greice, Vanessa, Maurício, João Paulo, Lucas e Anabela pelas conversas e pela compreensão;

Aos meus amigos-irmãos-eternos Ana Beatriz, Felipe, Camila e Raquel;

Aos amigos conquistados durante o mestrado.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Microrganismos termófilos e suas enzimas.....	3
2.2. Amilases e proteases microbianas.....	5
2.3. Classificação das amilases.....	7
2.4. Classificação das proteases.....	8
2.5. Valorização biotecnológica de resíduos agroindustriais.....	9
2.6. Aplicações industriais das amilases e proteases microbianas.....	11
3. TRABALHOS.....	14
PRODUÇÃO SIMULTÂNEA DE α -AMILASE E PROTEASES ALCALINAS E TERMOESTÁVEIS PELO <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2 TERMOFÍLICO.....	14
Resumo.....	14
Abstract.....	15
1. INTRODUÇÃO.....	16
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
2.1. Microrganismo e manutenção.....	17
2.2. Condições de cultivo.....	17

2.3. Preparo do inóculo.....	17
2.4. Medida do crescimento.....	18
2.5. Medida do pH.....	18
2.6. Ensaio enzimático.....	18
2.6.1. Determinação da atividade da α -amilase.....	18
2.6.2. Determinação da atividade das proteases.....	19
2.6.3. Determinação de proteínas.....	20
2.7. Caracterização parcial da α -amilase e proteases.....	20
2.7.1. Efeito do pH na atividade e estabilidade da α -amilase e proteases.....	20
2.7.2. Efeito da temperatura na atividade e estabilidade da α -amilase e proteases.....	21
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	21
3.1. Perfil do crescimento e atividade de α -amilase e proteases secretadas pelo <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2.....	21
3.2. Caracterização parcial de α -amilase e proteases secretadas pelo <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2.....	25
4. CONCLUSÕES.....	29
5. REFERÊNCIAS.....	29
OTIMIZAÇÃO DO MEIO DE CULTIVO PARA A PRODUÇÃO SIMULTÂNEA DE α -AMILASE E PROTEASES PELO <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2 E APLICAÇÃO DESTAS EM FORMULAÇÕES DE DETERGENTE.....	33
Resumo.....	33
Abstract.....	34
1. INTRODUÇÃO.....	35
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	36
2.1. Microrganismo e condições de cultivo.....	36
2.2. Medida do crescimento e pH.....	36
2.3. Ensaio enzimático.....	36
2.3.1. Determinação da atividade da α -amilase.....	37
2.3.2. Determinação da atividade das proteases.....	37
2.4. Efeito das condições da cultura sobre a produção simultânea de	

α -amilase e proteases.....	38
2.5. Compatibilidade e estabilidade da α -amilase e proteases com detergentes comerciais.....	38
2.6. Teste de lavagem.....	39
2.7. Delineamento experimental.....	39
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
3.1. Efeito das condições da cultura para a produção simultânea de α -amilase e proteases pelo <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2.....	39
3.2. Compatibilidade e estabilidade de α -amilase e proteases com detergentes comerciais.....	44
3.3. Teste de lavagem.....	46
4. CONCLUSÕES.....	47
5. REFERÊNCIAS.....	48
4. RESUMO E CONCLUSÕES.....	52
5. REFERÊNCIAS.....	54

LISTA DE TABELAS

	Página
1 Principais indústrias consumidoras de enzimas.....	12
2 Efeito de diferentes concentrações de amido solúvel e proteínas do soro de queijo na atividade da α -amilase e proteases produzidas pelo <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2 crescido durante 24 horas a 50°C.....	40
3 Efeito de diferentes concentrações de água de maceração de milho na atividade da α -amilase e proteases produzidas pelo <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2 crescido durante 24 horas a 50°C.....	41
4 Efeito de diferentes concentrações de CaCl ₂ na atividade da α -amilase e proteases produzidas pelo <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2 crescido durante 24 horas a 50°C.....	42
5 Efeito do pH do meio de cultivo na atividade da α -amilase e proteases produzidas pelo <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2 crescido durante 24 horas a 50°C.....	43
6 Efeito da temperatura de incubação do meio de cultivo na atividade da α -amilase e proteases produzidas pelo <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2 crescido durante 24 horas a 50°C.....	44

LISTA DE FIGURAS

		Página
1	Estrutura química da amilose (a) e amilopectina (b).....	5
2	Densidade ótica, pH do meio e atividade da α -amilase e proteases secretadas pelo <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2 em meio de cultivo contendo amido solúvel (0,25%).....	22
3	Densidade ótica, pH do meio e atividade da α -amilase e proteases secretadas pelo <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2 em meio contendo amido solúvel (0,25%) e proteínas do soro de queijo (0,1%).....	23
4	Densidade ótica, pH do meio e atividade da α -amilase e proteases secretadas pelo <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2 em meio contendo amido solúvel (0,25%), proteínas do soro de queijo (0,1%) e água de maceração de milho (0,3%).....	24
5	Efeito do pH na atividade (Δ) e estabilidade (\blacktriangle) da α -amilase secretada pelo <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2 crescido a 50°C durante 18horas.....	25
7	Efeito do pH na atividade (∇) e estabilidade (\blacktriangledown) das proteases secretadas pelo <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2 crescido a 50°C durante 18horas.....	26
8	Efeito da temperatura na atividade (Δ) e estabilidade (\blacktriangle) da α -amilase secretada pelo <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2 crescido a 50°C durante 18horas.....	27

10	Efeito da temperatura na atividade (v) e estabilidade (▼) das proteases secretadas pelo <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2 crescido a 50°C durante 18horas.....	28
11	Compatibilidade da α -amilase e proteases secretadas pelo <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2 com fórmulas comerciais de detergente....	45
12	Estabilidade da α -amilase e proteases de <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2 incubadas a 50°C com detergente Campeiro®.....	46
13	Efeito da solução “detergente-enzimas” na remoção de manchas de molho de tomate e gema de ovo.....	47

RESUMO

CORRÊA, Thamy Livia Ribeiro; M. S., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Janeiro, 2009. Produção simultânea de α -amilase e proteases pelo *Bacillus* sp. SMIA-2 termofílico e aplicação destas enzimas em formulações de detergente. Orientadora: Prof^ª: Meire Lelis Leal Martins.

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), em Campos dos Goytacazes, RJ, com o objetivo de estudar a produção simultânea de α -amilase e proteases pelo *Bacillus* sp. SMIA-2 termofílico e avaliar algumas propriedades bioquímicas destas enzimas, bem como a potencial aplicação das mesmas em formulações comerciais de detergentes. O microrganismo foi capaz de crescer e secretar α -amilase e proteases quando cultivado em meio contendo amido solúvel como fonte de carbono. Nesta condição, a atividade da α -amilase atingiu 325 U/mg de proteína em 36 horas de fermentação e a das proteases, 47 U/mg de proteína em 18 horas. A suplementação do meio de cultivo com proteínas do soro de leite, um resíduo da agroindústria, não só aumentou a atividade da α -amilase para 352 U/mg de proteína e das proteases para 66 U/mg de proteína, como possibilitou a síntese das duas ao mesmo tempo (12-18 horas). A adição da água de maceração de milho fez com que os índices de atividade da α -amilase alcançassem 401 U/mg de proteína e das proteases, 78 U/mg de proteína (18 horas). O pH ótimo da α -amilase foi 9 e esta enzima foi estável até pH 9 quando incubada por 2 horas em temperatura ambiente. Em pH 9,5 e 10, reteve cerca de 78 e 64%,

respectivamente, da sua atividade original. A temperatura ótima foi 90°C e a enzima se apresentou estável quando incubada por 1 hora em temperaturas entre 40 e 70°C. A 90°C cerca de 68% da atividade máxima foi perdida. O pH ótimo das proteases foi 9 e a atividade das mesmas foi bastante estável nos valores de pH testados. Em pH 10, 5% da atividade máxima foi perdida. A temperatura ótima foi 70°C e a enzima foi estável entre 40 e 50°C. Dentre as concentrações de amido solúvel e proteínas do soro de leite testadas, as que propiciaram a maior indução de α -amilase (374 U/mg de proteína) e proteases (103 U/mg de proteína) foram 0,25% e 0,1%, respectivamente. A água de maceração de milho, na concentração de 0,1%, aumentou a atividade da α -amilase para 518 U/mg de proteína e das proteases para 113 U/mg de proteína. Íons cálcio, até a concentração de 2 mM, tiveram efeito positivo na atividade da α -amilase enquanto as proteases secretadas por *Bacillus* sp. SMIA-2 foram cálcio-independente. As atividades máximas de ambas as enzimas foram encontradas em meio de cultivo com pH inicial 7,5 incubado a 42°C. A α -amilase e as proteases foram compatíveis com todas as marcas de detergentes comerciais testadas. A α -amilase foi mais estável quando incubada com solução do detergente Campeiro[®] a 50°C por 120 minutos quando comparada com as proteases. Um teste de lavagem foi realizado e comprovou a eficácia das duas enzimas na remoção de manchas de molho de tomate e gema de ovo de pedaços de tecido de algodão.

ABSTRACT

CORRÊA, Thamy Livia Ribeiro; M.S., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. January, 2009. Simultaneous production of α -amylase and protease by thermophilic *Bacillus* sp. SMIA-2 and application of these enzymes in detergent formulations. Prof. Adviser: Meire Lelis Leal Martins.

This work was carried out at the Food Technology Laboratory of the Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), Campos dos Goytacazes, RJ, with the objective of studying the simultaneous production of α -amylase and protease by thermophilic *Bacillus* sp. SMIA-2, evaluate some biochemical properties of these enzymes and its potential application in commercial detergents formulas. The microorganism was capable of grow and secrete α -amylase and protease when cultivated in liquid culture containing soluble starch as a carbon source. In such conditions, the α -amylase activity ranges 325 U/mg of protein in 36 hours' fermentation and the proteases, 47 U/mg of protein in 18 hours. The supplementation of media culture with whey protein concentrate, not only increased the α -amylase activity to 352 U/mg of protein and protease activity to 66 U/mg of protein, but became possible the production of both enzymes at the same time (12-18 hours). The addition of corn steep liquor increased the activity of α -amylase and protease to 401 U/mg of protein and 78 U/mg of protein, respectively (18 hours). The pH optimum of α -amylase was found to be 9.0 and this enzyme was stable until pH 9.0 when incubated for 2 hours at room temperature. The enzyme retained about 78 and 64% in pH 9.5 E 10, respectively, of its original activity. The optimum temperature was 90°C and the

enzyme shows a great stability when incubated for 1 hour at temperatures ranging from 40 and 70°C while at 90°C, about 68% of its maximum activity was lost. The optimum pH of protease was 9 and these enzymes shown high stability. In pH 10, 5% of its maximum activity was lost. The optimum temperature was 70°C and the enzyme was stable at temperatures ranging from 40 and 50°C. High activities of α -amylase (374 U/mg of protein) and protease (103 U/mg of protein) were obtained when 0.25% and 0.1% of soluble starch and whey protein concentrate were addicted to the culture media. The supplementation with 0.1% of corn steep liquor increased the activity to 518 U/mg of protein to α -amylase and 113 U/mg of protein to protease. Ions calcium, until 2 mM, shown positive effect on α -amylase activity while the induction of protease was calcium-independent. The maximum production of both enzymes was in a medium culture with initial pH 7.5 and incubated at 42°C. α -amylase and proteases were compatible with tested detergent commercial trends. The α -amylase was more compatible with the Campeiro[®] solution detergent at 50° for 120 minutes when compared with the protease. A washing test proved the efficiency of both enzymes on remove tomato sauce and egg yolk stains of clothes pieces.

1. INTRODUÇÃO

As amilases são enzimas empregadas na hidrólise completa do amido em maltooligossacarídeos e glicose enquanto as proteases atuam sobre proteínas gerando oligopeptídeos e aminoácidos. Estas enzimas são produzidas em escala industrial, principalmente por bactérias do gênero *Bacillus* sp. (Mabrouk, et al., 1999; Mehrotra, et al., 1999; Schallmey et al., 2004) e juntas, movimentam aproximadamente 90% do mercado mundial de enzimas (Banerjee et al., 1999; Van der Maarel et al., 2002; Merheb et al., 2007), sendo passíveis de aplicação em diversos setores industriais como indústria de alimentos, detergente, papel e celulose, têxtil, farmacêutica e de química fina (Anwar e Saleemudin, 1998; Kumar e Takagi, 1999; Kirk et al., 2002, Gupta et al., 2002; Gupta et al., 2003; Kandra, 2003).

Dentre as indústrias citadas acima, deve-se ressaltar a de detergentes como a maior consumidora de enzimas (Lima et al., 2001; Saeki et al., 2007). Atualmente, a maioria das formulações de detergente contém amilases, proteases, lipases e celulasas em sua composição (Mitidieri et al., 2002; Saeki et al., 2007).

A fonte de carbono utilizada para o crescimento do microrganismo responde por cerca de 30-40% do custo de produção destas enzimas (Joo e Chang, 2005). Sendo assim, a adição de reagentes ricos em moléculas de alto valor biológico e de baixo custo ao meio de cultivo torna-se interessante. Vários autores reportam a utilização de resíduos da agroindústria como as proteínas do soro de queijo e água de maceração de milho na obtenção destas hidrolases com

resultados satisfatórios (Romero et al., 2001; Nusrah e Rahman, 2002; Azeredo et al., 2006; Carvalho et al., 2008).

A produção de amilases e proteases por bactérias do gênero *Bacillus* sp. é bastante citada na literatura. No entanto, a produção simultânea das mesmas não é muito discutida. Um meio de cultivo que propicie a obtenção destas duas enzimas significa simplificação, rapidez e economia do processo.

Sendo assim, este trabalho objetivou otimizar um meio de cultivo e algumas condições do processo fermentativo para propiciar a produção simultânea de α -amilase e proteases pelo *Bacillus* sp. SMIA-2, avaliar algumas propriedades bioquímicas destas enzimas e suas potenciais aplicações em formulações comerciais de detergente.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Microrganismos termófilos e suas enzimas

Os extremófilos, termo utilizado pela primeira vez por MacElroy em 1974, são microrganismos que sobrevivem e desenvolvem-se em condições extremas de temperatura, pressão, salinidade e pH. Incluem os termófilos, psicrófilos, piezófilos, halófilos, alcalófilos e acidófilos (Atomi, 2005) e encontram-se bem distribuídos na natureza (Ferrer et al., 2007).

A temperatura é um dos fatores ambientais que mais influencia o crescimento e a sobrevivência dos seres vivos (Fomenkova et al., 1998). A maioria dos organismos conhecida atualmente pode crescer somente dentro de uma faixa estreita de temperatura. Entretanto, a existência de ambientes geotermicamente estáveis tem permitido a seleção ou a persistência de microrganismos que não apenas resistem, mas requerem altas temperaturas para sua sobrevivência (Gomes et al., 2007).

Segundo análises genéticas, os organismos são divididos em três domínios distintos: *Eukarya* (eucariotos), *Bacteria* e *Archaea* (procariotos) (Tehei e Zaccai, 2005). Exemplos de extremófilos ocorrem em ambos os domínios procariotas, mas os dados disponíveis permitem concluir que estes tendem a pertencer ao domínio *Archaea* (Hough e Danson, 1999; Santos et al., 2001).

Bacteria e *Archaea* quanto às temperaturas ideais de proliferação, são classificados em psicrófilos, mesófilos e termófilos com temperaturas ótimas de crescimento variando entre 0-20, 10-50 e 40-110°C, respectivamente (Tolner et

al., 1997). O último grupo ainda pode ser subdividido em termófilos moderados, termófilos e hipertermófilos (Demirjian et al., 2001).

As biomoléculas (proteínas, ácidos nucleicos e lipídios) de extremófilos são adaptadas para a atuação adequada em ambientes extremos (Atomi, 2005).

Algumas modificações necessárias à sobrevivência dos microrganismos em condições ambientais extremas incluem: proteínas termoestáveis, que conferem resistência à desnaturação e proteólise; proteínas especializadas como, por exemplo, as chaperonas, que restauram moléculas protéicas a sua conformação e função nativas; membrana celular composta de ácidos graxos saturados unidos à molécula de glicerol por interações do tipo éter, que provêm um ambiente hidrofóbico favorecendo sua rigidez e DNA girase reversa, enzima que requer altas temperaturas para que ocorra a separação da dupla fita da molécula de DNA (Haki e Rakshit, 2003).

Bactérias termófilas têm sido extensamente estudadas bioquimicamente (Madigan et al., 1996) devido à secreção de suas extremozimas que apresentam mecanismos moleculares desenvolvidos para atuarem em condições físico-química extremas (Ferrer et al., 2007), o que as torna interessantes para aplicações biotecnológicas.

Amilases, proteases, celulasas, xilanases, pectinases e outras isoladas de microrganismos termófilos, devido às altas temperaturas em que atuam, têm sido extensamente utilizadas em setores industriais por prevenirem a contaminação microbiana por mesófilos, proporcionarem menor viscosidade ao meio, tornarem os reagentes mais solúveis facilitando a difusão dos mesmos e permitirem que concentrações maiores destes compostos sejam utilizadas (Aguilar, 1996; Archana e Satyanarayana, 1997; Bruins et al., 2001; Lee et al., 2001; Van den Burg, 2003; Haki e Rakshit, 2003). Além disso, estas enzimas são termoestáveis e ativas na presença de desnaturantes protéicos como detergentes, solventes orgânicos e enzimas proteolíticas (Klingeberg et al., 1991).

2.2. Amilases e proteases microbianas

As membranas biológicas são dotadas de póros e proteínas que regulam o acesso de determinados metabólitos ao interior da célula. Polissacarídeos como celulose, xilanas, pectina e amido, por exemplo, pela alta massa molecular e

estrutura que apresentam, devem ser hidrolisados antes de captados pelas células, o que se torna possível através da atuação de determinadas enzimas.

O amido, polímero de glicoses, é sintetizado pelas plantas durante a fotossíntese e armazenado em plastídeos e amiloplastos (Van der Maarel et al., 2002). Possui forma irregular ou redonda e os grânulos são unidos por ligações de hidrogênio (Nigam e Singh, 1995).

Dois polissacarídeos compõem a estrutura do amido: amilose e amilopectina. A primeira é uma molécula linear contendo mais de 6000 unidades de glicose conectadas por ligações glicosídicas α -1,4 e a segunda, muito similar ao glicogênio (Myers et al., 2000), é altamente ramificada contendo ligações α -1,4 entre os monômeros de glicose e α -1,6 nos pontos de ramificação a cada 24-30 resíduos de glicose (Figura 1) (Buléon et al., 1998; Brena et al., 2006).

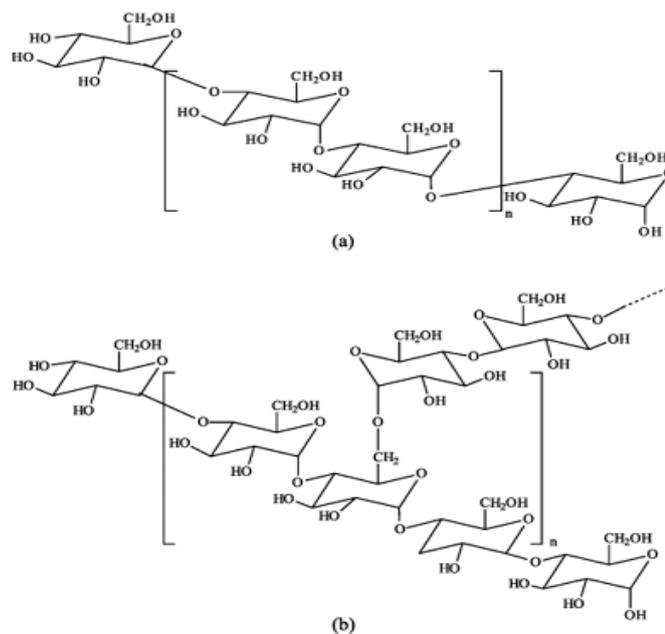


Figura 1 - Estrutura química da amilose (a) e amilopectina (b) (Corradini et al., 2005).

Para que a hidrólise do amido seja completa faz-se necessária a atuação de várias enzimas (Haki e Rakshit, 2003) pertencentes ao grupo das amilases. Estas enzimas liberam maltooligossacarídeos e glicose após a amilólise (Kandra, 2003).

Já as proteases, conhecidas também como peptidases ou enzimas proteolíticas, clivam proteínas em oligopeptídeos ou aminoácidos livres por meio da hidrólise de ligações peptídicas (Sookkheo et al., 2000 e Alberts et al., 2004).

São moléculas de baixo peso molecular, esféricas, compactas (Polgar, 1989, citado por Aftab et al., 2006) e de natureza intra ou extracelular.

As proteases intracelulares estão envolvidas com processos metabólicos como esporulação e manutenção do conjunto de proteínas. Já as extracelulares são importantes para a disponibilização de nutrientes a serem captados pelas células (Kalisz, 1988).

Tanto enzimas amilolíticas quanto proteolíticas são inerentes aos tecidos animais, às plantas, bactérias, fungos e leveduras (Kandra, 2003; Banik e Prakash, 2004), exercendo papel dominante no metabolismo de carboidratos e proteínas.

Tendo em vista que a demanda destas enzimas pelo setor industrial é grande (Sellami-Kamoun et al., 2008), a obtenção de amilases e proteases de fontes microbianas torna-se interessante devido à grande diversidade bioquímica, facilidade de manipulação genética e rapidez com que estas moléculas são obtidas a partir dos mesmos (Rao et al., 1998).

Vários estudos sobre a produção de amilases e proteases são conduzidos com fungos. É comum o emprego do gênero *Thermomonospora* (Ben et al., 1999, citado por Reddy et al., 2003) na obtenção de enzimas amilolíticas enquanto as proteases produzidas por estes microrganismos são menos reativas e menos termotolerantes em relação àquelas das bactérias (Rao et al., 2008).

Segundo Schallmey et al. (2004), a habilidade de produzir e secretar grandes quantidades de enzimas extracelulares (20-25 g/L), apresentar espécies termófilas capazes de fermentar em uma ampla variedade de pHs, faz com que as cepas do gênero *Bacillus* sp. sejam dominantes nos processos de fermentação microbiológica gerando produtos enzimáticos comerciais com aplicabilidades específicas.

Cepas de *Bacillus licheniformis* (Ikram-ul-Haq et al., 2003), *Bacillus subtilis* (Konsoula e Liakopoulou-Kyriakides, 2007) e *Bacillus amyloliquefaciens* (Tanyildizi et al., 2007) são comumente empregadas em processos fermentativos visando a produção de amilases, enquanto *Bacillus licheniformis*, *Bacillus firmus*, *Bacillus alcalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus proteolyticus*, *Bacillus subtilis* e *Bacillus thuringiensis* (Prakasham et al., 2006) são bons produtores de proteases.

2.3. Classificação das amilases

As enzimas são catalisadores biológicos essenciais à manutenção da vida por tornarem possíveis determinadas reações do metabolismo celular dos seres vivos.

A *International Union of Biochemistry and Molecular Biology* classifica estas biomoléculas de acordo com o seu modo de ação sobre o substrato em: oxirredutases (classe 1), transferases (classe 2), hidrolases (classe 3), liases (classe 4), isomerases (classe 5) e ligases (classe 6). Por catalisarem a transferência de grupos funcionais para a água, as amilases são classificadas como hidrolases (IUBMB, 2008).

As amilases estão reunidas em um grupo formado segundo a análise da homologia de seus aminoácidos e obedecem aos seguintes itens: atuam sobre ligações glicosídicas, produzem α -mono e oligossacarídeos, possuem quatro regiões altamente conservadas e contêm os resíduos Asp 206, Asp 297 e Glu 230 em seus sítios catalíticos (Kuriki e Imanaka, 1999).

As principais enzimas relacionadas à hidrólise do amido são as endoamilases, por exemplo, α -amilase (α -1,4-D-glucano glucanohidrolase; E.C.3.2.1.1.), que atuam ao acaso em ligações α -1,4 no interior da molécula de amilose ou amilopectina e outros polissacarídeos gerando oligossacarídeos de variados tamanhos; exoamilases, β -amilase (α -1,4-glucan maltohidrolase; E.C.3.2.1.2) e glicoamilase (α -1,4-glucan glucohidrolase; E.C.3.2.1.3), que clivam exclusivamente ligações α -1,4 ou ambas α -1,4 e α -1,6, sendo esta última de uma forma bem mais lenta que a primeira e atuam através da extremidade não redutora do amido fornecendo maltose no caso da β -amilase; enzimas desramificadoras, pululanase (pullulan 6-glicohidrolase; E.C.3.2.1.41), que atuam sobre ligações glicosídicas α -1,6 gerando maltotriose; transferases, amilomaltase (4- α -glucanotransferase; E.C. 2.4.1.25), que atuam em ligações glicosídicas do tipo α -1,4 gerando um produto linear, e a ciclodextrina glicosil transferase (cyclomaltodextrin glucanotransferase; E.C. 2.4.1.19) que produz pequenos oligossacarídeos e dextrinas de alto peso molecular e altamente ramificadas (Marchal et al., 1999; Sarikaya et al., 2000; Van der Maarel et. al., 2002; Gomes et. al., 2007).

A α -amilase é uma metaloenzima que contém pelo menos um íon cálcio ligado à sua estrutura (Vallee et al., 1959), possui pH ótimo entre 2 e 12, estabilidade satisfatória entre pH 4 e 11 (Vihinen e Mantisala, 1989), massa molecular entre 10 e 210 kDa (Gupta et al., 2003) e é ativa em temperaturas entre 30 (Chary e Reddy, 1985) e 130°C (Ray et al., 1995).

2.4. Classificação das proteases

As proteases não são facilmente inseridas nos sistemas gerais de nomenclatura de enzimas devido à sua grande diversidade de atuação e estrutura.

As proteases são classificadas como classe 3 e subclasse 3.4 das peptídeo hidrolases ou peptidases (Vermelho e Branquinha, 2005) e são as hidrolases mais estudadas (Oliveira et al., 2006).

Elas ainda podem ser subdivididas em exopeptidases (E.C. 3.4.11-19) e endopeptidases ou proteinases (E.C. 3.4. 21-99). As primeiras atuam somente sobre as extremidades das cadeias polipeptídicas. Enzimas que agem sobre a extremidade N- ou C-terminal são conhecidas como amino ou carboxipeptidases, respectivamente. As endopeptidases operam em regiões internas das cadeias polipeptídicas, longe das extremidades (Rao et al., 1998).

Quanto à estrutura química do sítio ativo, as exopeptidases são definidas como serino proteases (E.C. 3.4.21), cisteíno proteases (E.C. 3.4.22) e metalo proteases (E.C. 3.4.24). As endopeptidases apresentam, além das citadas acima, as chamadas aspártico proteases (E.C. 3.4.23) (Leopold e Fricke, 1997).

As serino proteases apresentam um resíduo de serina (Ser/S) em seu sítio catalítico. São amplamente produzidas pelos organismos, o que sugere seu papel vital. São ativas em pHs neutros a alcalinos, com um valor ótimo entre 7 e 11. O ponto isoelétrico (pI) está na faixa entre 4 e 6 e sua massa molecular varia entre 18 e 35 kDa. Algumas serino proteases podem atuar em pHs bastante alcalinos, o que as torna ideais para a aplicação, por exemplo, na indústria de detergentes (Rao et al., 1998).

Todas as proteases aplicadas na indústria de detergentes são serino proteases produzidas por *Bacillus* sp. (Chellappan et al., 2006).

As cisteíno proteases ou tiol proteases dependem de um resíduo de cisteína (Cys/C) para sua atuação e são ativas em pH neutro. Já as metalo proteases requerem um íon divalente, normalmente o Zinco (Zn^{+2}), para a catálise. Podem ser ácidas, neutras ou alcalinas (Leopold e Fricke, 1997; Rao et al., 1998).

As aspártico proteases são conhecidas também como proteases ácidas e contêm dois resíduos de ácido aspártico (Asp/D) no seu sítio ativo. O pH ótimo de atuação varia entre 3 e 4 e o pI entre 3 e 4,5. A massa molecular se encontra entre 30 e 45 kDa (Rao et al., 1998).

2.5. Valorização biotecnológica de resíduos agroindustriais

A economia brasileira é baseada na agricultura e pecuária. Pela geração de resíduos ser inerente a qualquer processo produtivo, por ano, milhares de toneladas dos mesmos são produzidos e a maior parte é direcionada à ração animal ou simplesmente descartados no meio ambiente (Villas-Bôas e Esposito, 2000).

Os resíduos agroindustriais são classificados como sólidos (tortas, restos de frutas e hortaliças, carcaças de animais, aparas de couro e outros), líquidos (emanações do processo industrial e esgoto, por exemplo) e gasosos (monóxido de carbono, óxido de enxofre, hidrocarbonetos, clorofluorcarbonos, dentre outros) (Matos, 2005).

Apesar deste tipo de poluente ser biodegradável, um tempo mínimo faz-se necessário para que ele seja mineralizado. No entanto, a intensa atividade humana sobre os ecossistemas terrestres dificulta a reciclagem natural destes nutrientes (Villas-Bôas e Esposito, 2000).

A disposição destes resíduos no meio ambiente é crime previsto por lei e significa rejeitar compostos de alto valor biológico. Uma alternativa para se agregar valor a esses resíduos seria a sua bioconversão empregando microrganismos (Villas-Bôas e Esposito, 2000) capazes de utilizar a matéria orgânica contida nestes resíduos como substrato para seu crescimento e reprodução.

As proteínas do soro de queijo e a água de maceração de milho são dois resíduos da agroindústria comumente empregados em processos biotecnológicos

visando obtenção de produtos de interesse comercial como as enzimas, por exemplo (Romero et al., 2001; Nusrah e Rahman, 2002; Azeredo et al., 2006; Carvalho et al., 2008).

O Brasil é o maior produtor de leite da América do Sul e o sexto em escala mundial (EMBRAPA, 2007). A produção de queijo prevista para o Brasil em 2008 foi de 640 milhões de toneladas (EMBRAPA, 2008).

O processo de manufatura do queijo inclui a pasteurização do leite, adição de cloreto de cálcio, fermento e coalho (coagulação). A partir daí, a massa é cortada de modo a permitir a saída do soro e amassada para formar uma estrutura homogênea (FAPEMIG, 2008).

A produção de 1 quilo de queijo consome 10 litros de leite (FAPEMIG, 2008). O soro gerado é um líquido amarelo-esverdeado composto principalmente de proteínas, lactose e minerais. Sua disposição no meio ambiente, principalmente cursos d'água, aumenta a demanda bioquímica de oxigênio (DBO) destes ecossistemas podendo ocasionar um desastre ambiental (Smithers et al., 1996).

Alguns estudos têm sido executados buscando alternativas viáveis para a aplicação deste rejeito em processos biotecnológicos. Atualmente, grandes investimentos são feitos na produção de soro de queijo. Sendo assim, o soro não é mais considerado apenas um "resíduo", mas sim, um subproduto do queijo (UNOPAR, 2005).

Milho, arroz e trigo são os principais cereais produzidos mundialmente (FAO, 2005). Os Estados Unidos são os maiores produtores de milho (40%), seguidos por China (18%) e Brasil (7%) (EMBRAPA, 2003).

O milho é processado pela moagem seca ou úmida. A primeira gera canjica, farinhas, fubás, flocos, farelo e óleo refinado enquanto a segunda, xaropes, álcool e amido (ABIMILHO, 2008).

A água de maceração de milho, resultante da moagem úmida deste cereal, é rica em aminoácidos e polipeptídeos. Trata-se de uma fonte de nitrogênio de baixo custo, substituindo o extrato de levedura e peptona nos processos fermentativos. Ela retém cerca de 6,9% dos sólidos e 30% do nitrogênio encontrados no milho. Quando hidrolisada, cerca de $\frac{1}{4}$ dos aminoácidos gerados são a alanina, é fonte de vitaminas como riboflavina, niacina, ácido pantotênico, piridoxina, biotina e minerais, principalmente cálcio,

cobre, ferro, manganês, magnésio, fósforo, potássio, enxofre e zinco (Liggett e Koffler, 1948).

2.6. Aplicações industriais das amilases e proteases microbianas

As enzimas mais empregadas em processos industriais são hidrolíticas quanto ao seu modo de ação degradando várias substâncias naturais (Gupta et al., 2003; Oliveira et al., 2006) em outras de maior valor. Dentre elas, as amilases e proteases são as mais importantes sob o ponto de vista industrial (Ghorbel et al., 2002).

O mercado de enzimas é estimado em 2,3 bilhões de dólares anuais (Mussato et al., 2007) e as enzimas proteolíticas, principalmente as alcalinas, correspondem a 60% deste montante (Banerjee et al., 1999; Merheb et al., 2007). Deste valor, 40% são de fontes microbianas (Gupta et al., 2002) e cerca de 35% respondem pelas proteases que são aplicadas na indústria de detergentes (Kalisz, 1988, citado por Hadj-Ali, 2007). As amilases vêm logo em seguida movimentando 30% deste mercado (Van der Maarel et al., 2002). O mercado brasileiro ainda é pouco representativo, correspondendo a cerca de 2% do total mundial (Mussato et al., 2007).

As amilases, principalmente a α -amilase, apresentam amplo espectro de aplicações industriais como na indústria de alimentos, para a obtenção de xaropes ricos em glicose e frutose que, posteriormente, são utilizados como adoçantes em refrigerantes; panificação, onde aprimoram as características organolépticas do produto; têxtil, para degradar o amido que é aplicado nos fios protegendo-os de danos estruturais durante a tecelagem; papel, na remoção da camada de amido que protege o mesmo contra danos mecânicos durante o processamento e detergentes, na remoção de manchas amiláceas. Outras abordagens encontradas na literatura ainda citam o emprego destas hidrolases na indústria farmacêutica e de química fina (Kirk et al., 2002, Gupta et al., 2003; Kandra, 2003).

As proteases possuem extensas aplicações biotecnológicas na indústria de detergentes, auxiliando na remoção de manchas proteináceas de sangue, queratina, ovos, molhos, suor humano e outros; indústria do couro, onde enzimas com atividades elastinolíticas e queratinolíticas aumentam a área de superfície da

pele através da degradação dos pêlos do animal; indústria de alimentos, na produção de hidrolisados protéicos utilizados como aditivos em sucos, alimentação infantil e produtos de dieta; indústria química, pela síntese de peptídeos; tratamento de resíduos industriais e domésticos, disponibilizando nutrientes aos peixes e gado; recuperação da prata em filmes de raios-X, auxiliando também na recuperação do poliéster destes filmes e usos médicos no tratamento de queimaduras, furúnculos e abscessos da pele (Anwar e Saleemudin, 1998; Kumar e Takagi, 1999; Gupta et al., 2002).

Dentre as aplicações explicitadas acima, a indústria de detergentes constitui a maior demanda por enzimas industriais (Saeki et al., 2007) (Tabela 1).

Tabela 1 - Principais indústrias consumidoras de enzimas (Lima et al., 2001)

Indústrias	%
Detergentes	40-45
Processamento do amido	20-25
Laticínios	12-15
Cervejarias	2-4
Sucos de frutas e vinhos	3-5
Panificação	1-2
Têxtil e papel	4-6
Couro	1-2
Outras	6-10

Os detergentes biológicos biodegradáveis contêm uma mistura de amilases, lipases, celulasas e proteases, cada uma atuando especificamente sobre o seu substrato (Mitidieri et al., 2002, Saeki et al., 2007).

O primeiro detergente que continha enzimas em sua formulação data de 1913 e foi proposto por Röhm. No entanto, apenas na década de 60 um detergente contendo a subtilisina Carlsberg (serinoprotease) de *Bacillus licheniformis* chegou ao mercado. A boa compatibilidade da enzima com o detergente provocou o estímulo ao desenvolvimento de outros detergentes contendo agentes biológicos em suas formulações (Saeki et al., 2007).

Enzimas amilolíticas são aplicadas em fórmulas de detergentes desde 1975. No entanto, são muito sensíveis ao meio deficiente em íons cálcio ou agentes oxidantes que fazem parte da composição dos mesmos (Gupta et al., 2003).

Para ser passível de aplicação em detergentes, as amilases e proteases devem apresentar atividade satisfatória, especificidade ao substrato, enantioseletividade e estabilidade a altos valores de pH e temperatura, íons metálicos, surfactantes e solventes orgânicos (Kandra, 2003; Podar e Reysenbach, 2006).

A eficiência de limpeza dos detergentes com enzimas é tão grande que a adição de menos de 1% das mesmas já mostra resultados bastante superiores em relação aos produtos que possuem o fosfato como base (Bollier e Vons Genencor, 2005).

Atualmente, algumas empresas como a Novozymes, Genencor e Gist - Brocades investem pesadamente no estudo de novas fontes microbianas e otimização de processos que permitam o aumento de produção e efetividade destas enzimas em seus produtos buscando a satisfação de seus clientes.

A aplicação de enzimas em processos industriais beneficia também o meio-ambiente. Elas auxiliam na diminuição do impacto ambiental por serem biodegradáveis, substituírem produtos químicos tóxicos que seriam despejados na natureza, diminuem a demanda bioquímica de oxigênio (DBO) dos ecossistemas aquáticos e atenuam o tempo necessário para lavagens, o que resulta em economia de energia e água.

3. TRABALHOS

PRODUÇÃO SIMULTÂNEA DE α -AMILASE E PROTEASES ALCALINAS E TERMOESTÁVEIS PELO *Bacillus* sp. SMIA-2 TERMOFÍLICO

Thamy Livia Ribeiro Corrêa, Stella Karla dos Santos Moutinho e Meire Lelis Leal Martins*

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

RESUMO

A produção simultânea de α -amilase e proteases pelo *Bacillus* sp. SMIA-2 em meio de cultivo contendo amido solúvel como fonte de carbono foi estudada. A suplementação do meio com proteínas do soro de queijo (0,1%) e água de maceração de milho (0,3%) não apenas incrementou a atividade de ambas as enzimas como tornou possível a produção simultânea das mesmas. Nestas condições, a maior atividade da α -amilase e das proteases ocorreu após 18 horas de fermentação alcançando níveis de 401 e 78 U/mg de proteína, respectivamente. Os valores de pH e temperatura que propiciaram uma maior atividade da α -amilase (9, 90°C) e das proteases (9, 70°C) também foram

estudados. A α -amilase foi estável entre pH 6 e 9 e as proteases apresentaram estabilidade até pH 10. Quando incubada durante 1 hora em temperaturas entre 40 e 100°C, a α -amilase foi estável entre 40 e 70°C e as proteases, entre 40 e 50°C.

Palavras-chave: α -amilase, proteases, *Bacillus* sp., pH, temperatura.

SIMULTANEOUS PRODUCTION OF ALKALINE AND THERMOSTABLE α -AMYLASE AND PROTEASE BY THERMOPHILIC *Bacillus* sp. SMIA-2

**Thamy Livia Ribeiro Corrêa, Stella Karla dos Santos Moutinho e Meire Lelis
Leal Martins***

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

ABSTRACT

The simultaneous production of α -amylase and protease by thermophilic *Bacillus* sp. SMIA-2 was investigated in batch culture using soluble starch as a carbon source. The supplementation of the culture medium with whey protein concentrate (0.1%) and corn steep liquor (0.3%) not only improved the activity of both enzymes but made possible its simultaneous production. In such conditions, the α -amylase and protease activities reached the maximum at 18 hours with levels of 401 and 78 U/mg protein, respectively. The parameters studied were the optima pH and temperature for α -amylase (9, 90°C) and protease (9, 70°C) activities. α -amylase was stable in pH values ranging from 6 to 9 and protease shown high stability until pH 10. α -amylase was stable at temperatures ranging from 40 and 70°C while protease, 40 and 50°C.

Key-words: α -amylase, protease, *Bacillus* sp., pH, temperature.

1. INTRODUÇÃO

A maioria das enzimas empregadas em processos industriais pertence ao grupo das hidrolases (Oliveira et al., 2006), dentre as quais devem ser destacadas as amilases e proteases (Ghorbel et al., 2002, Nguyen et al., 2002). Estas enzimas são passíveis de aplicação em indústrias de detergentes, alimentos, papel e celulose, farmacêutica, dentre outras (Kirk et al., 2002) e podem ser obtidas por meio de plantas, animais e microrganismos (Kandra, 2003). No entanto, apenas as produzidas por microrganismos atendem às demandas industriais. Neste sentido, deve-se ressaltar as bactérias do gênero *Bacillus* sp (Schallmey et al., 2004).

Tendo em vista que a fonte de carbono para o crescimento microbiano responde por cerca de 30-40% do custo da produção de enzimas em escala industrial (Joo e Chang, 2005), o estudo de alternativas a fim de baratear o processo torna-se interessante.

Rejeitos agroindustriais tais como os derivados da indústria do milho (Liggett e Koffler, 1948) e laticínios (González-Siso, 1996) são ricos em moléculas orgânicas, possuem baixo custo e são empregados em processos fermentativos visando à obtenção de produtos de alto valor comercial.

Outra alternativa adotada a fim de aumentar a eficiência e economia do processo é a produção de mais de uma enzima em um só passo fermentativo. Isto se torna especialmente importante tendo em vista que as amilases e proteases respondem por cerca de 60% e 30% do mercado industrial de enzimas, respectivamente (Van der Maarel et al., 2002; Merheb et al., 2007).

Diante do exposto acima, o objetivo deste trabalho foi estudar o crescimento e a produção simultânea de α -amilase e proteases pelo *Bacillus* sp. SMIA-2 em meio de cultivo contendo resíduos da agroindústria e caracterizar estas enzimas parcialmente.

1. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Microrganismo e manutenção

O microrganismo empregado neste estudo foi a bactéria termofílica *Bacillus* sp. SMIA-2 isolada por Souza e Martins (2001) a partir de amostras do solo do município de Campos dos Goytacazes – RJ, no Laboratório de Tecnologia de Alimentos (LTA) da Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF). Segundo os mesmos autores, a comparação das seqüências de 16S rRNA indicaram que o isolado possui 94% de similaridade com *B. caldoxylyticus* e *Bacillus* sp. AK1.

Culturas de *Bacillus* sp. SMIA-2 crescidas em meio TSY (g.L⁻¹ de água destilada): triptona, 20; NaCl, 10; extrato de levedura, 10 e ágar, 20, descrito por Liao et al., 1986, foram mantidas em solução estéril de glicerol 20% (m/v) em freezer a -70°C.

2.2. Condições de cultivo

O meio de crescimento utilizado para a produção de α -amilase e proteases continha aproximadamente (g.L⁻¹ de água destilada): KCl, 0,3; K₂HPO₄, 0,87; CaCl₂, 0,29; MgSO₄, 0,5; peptona, 1,0; amido solúvel, 2,5, proteínas do soro de queijo, 1,0, água de maceração de milho, 3,0 e traços de metais (CaCl₂, 2,2x10⁻³; ZnO, 2,5x10⁻³; FeCl₃.6H₂O, 2,7x10⁻²; MnCl₂.4H₂O, 1,0x10⁻²; CuCl₂.2H₂O, 8,5x10⁻⁴; CoCl₂.6H₂O, 2,4x10⁻³, NiCl₃.6H₂O, 2,5x10⁻⁴, H₃BO₃, 3,0x10⁻⁴; Na₂MoO₄, 1,0x10⁻³). O pH do meio foi ajustado para 7,5 com solução de NaOH 1 M e o mesmo foi esterilizado por autoclavagem a 121°C por 15 minutos.

A partir daí, o meio de crescimento foi inoculado com 0,3-0,5 mL do inóculo.

2.3. Preparo do inóculo

O microrganismo foi germinado em placas de Petri contendo meio TSY descrito anteriormente. As placas foram incubadas em estufa QUIMIS, modelo Q-315 D26, por 18 horas a 50°C. Transcorrido este tempo, 5 mL do meio de

crescimento descrito em 2.2 foram transferidos para as placas a fim de ressuspender as células. As células ressuspensas foram, posteriormente, sugadas com o auxílio de uma pipeta estéril e inoculadas em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 25 mL do mesmo meio de crescimento e incubadas durante 16 horas a 50°C em *shaker* rotatório TECNAL TE-420 operando a 150 rpm.

2.4. Medida do crescimento

Obedecendo-se a intervalos de tempo determinados, o crescimento do microrganismo foi determinado pela turbidez do meio, medindo-se a densidade ótica a 600 nm em espectrofotômetro SHIMADZU UV-mini 1240.

2.5. Medida do pH

As variações do pH durante o crescimento celular foram determinadas utilizando-se pHmetro da marca WTW pH 330.

2.6. Ensaio enzimático

O sobrenadante, livre de células, obtido por centrifugação do caldo fermentativo em centrífuga modelo Hermle-Z 382 (1020g durante/15 minutos/4°C) foi utilizado para determinação da atividade enzimática.

2.6.1. Determinação da atividade da α -amilase

A atividade desta enzima foi determinada segundo a metodologia do ácido 3,5-dinitrossalicílico ou reagente de Miller (DNS) (Miller, 1959), que mede o incremento dos açúcares redutores na solução como resultado da ação da α -amilase sobre o amido.

A reação continha 0,5 mL do sobrenadante, 0,5 mL da solução de amido a 0,5% preparada em tampão Tris-HCl 0,05 M (pH 8,5) e 0,2 mL do mesmo tampão. Esta mistura foi incubada a 90°C por 10 minutos. Em seguida, a reação foi paralisada pela adição de 1 mL da solução de DNS e colocada em água em ebulição durante 10 minutos. Transcorrido este tempo, as amostras foram

resfriadas em banho de gelo durante 5 minutos e adicionadas de 4,8 mL de água destilada. A coloração desenvolvida foi medida em espectrofotômetro, utilizando-se o comprimento de onda de 540 nm. O mesmo procedimento foi realizado com o controle, exceto que o DNS foi adicionado antes do sobrenadante à solução de amido 0,5% e 0,2 mL de tampão Tris-HCl 0,05 M (pH 8,5) e todas as análises foram realizadas em triplicata.

O teor de açúcares redutores foi determinado por meio de uma curva de glicose. Uma unidade de atividade da amilase foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de açúcares redutores por minuto em tampão Tris-HCl 0,05 M (pH 8,5) e solução de 0,5% de amido solúvel como substrato a 90°C.

2.6.2. Determinação da atividade das proteases

A atividade de proteases foi determinada em triplicata pela quantificação de peptídeos solúveis em ácido tricloroacético (TCA) 15% (p/v). O substrato utilizado para essa determinação foi uma solução de azocaseína 0,2% (p/v) preparada em tampão TRIS-HCl 0,2 M (pH 8,5).

Nesta análise, uma amostra de 0,5 mL do sobrenadante foi adicionada a 1 mL do substrato e, após a incubação em banho-maria a 70°C por 10 minutos, a reação foi paralisada pela adição de 0,5 mL de TCA. A amostra foi, então, centrifugada a 11340 g durante 5 minutos a 4°C e o sobrenadante foi transferido para tubos de ensaio contendo 0,5 mL de NaOH 1 M, conforme descrito por Janssen et al. (1994). Paralelamente, foi feito um tubo controle que continha todos os reagentes do ensaio, exceto o TCA, que foi adicionado antes do extrato enzimático.

A coloração desenvolvida foi medida em espectrofotômetro, utilizando-se o comprimento de onda de 420 nm. Uma unidade da enzima foi definida como a quantidade da enzima requerida para produzir um aumento na absorbância a 420 nm igual a 0,1 em 60 minutos.

2.6.3. Determinação de proteínas

A dosagem de proteína no sobrenadante foi determinada pelo método de Lowry, conforme modificações propostas por Peterson (1977), utilizando albumina do soro bovino (BSA) como padrão. Os reagentes empregados foram os seguintes: Reagente A (carbonato de sódio, 20 g/L; NaOH 2 M, 50 mL/L; tartarato de sódio e potássio, 0,2 g/L), B ($\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 5 g/L) e C (50 partes do Reagente A e uma parte do Reagente B).

A mistura de reação era constituída de 40 μL da amostra, 360 μL de água destilada e 2000 μL da solução C. Esta mistura foi agitada vigorosamente. Após o repouso da mesma por 15 minutos, foi adicionado 200 μL do reagente de Folin. A mistura foi agitada novamente e em seguida deixada em repouso por mais 30 minutos. O mesmo procedimento foi realizado com o controle exceto que a amostra foi substituída por água destilada.

A coloração desenvolvida foi medida através de espectrofotômetro utilizando comprimento de onda de 750 nm.

2.7. Caracterização parcial da α -amilase e proteases

2.7.1. Efeito do pH na atividade e estabilidade da α -amilase e proteases

O efeito do pH na atividade da α -amilase e proteases foi avaliado na faixa de 6 a 10 com intervalos de 0,5 unidades. As soluções tamponantes utilizadas foram tampão fosfato (pH 6-7,5), tampão Tris-HCl (pH 8-9) e tampão Borax-NaOH (pH 9-10).

O pH ótimo foi determinado preparando-se o substrato, amido 0,5% (p/v) e azocaseína 0,2% (p/v), nas soluções tampão com diferentes valores de pH explicitados acima. A partir daí, a reação foi executada conforme descrito no item 2.6.

A estabilidade da enzima em diferentes valores de pH foi avaliada incubando-se apenas o sobrenadante nas soluções tampão descritas anteriormente por 2 horas em temperatura ambiente. Após este tratamento, a atividade residual (%) da α -amilase e das proteases foi determinada de acordo com o item 2.6.

2.7.2. Efeito da temperatura na atividade e estabilidade da α -amilase e proteases

O efeito da temperatura na atividade das enzimas foi determinado incubando-se a reação em temperaturas entre 40 e 100°C, com intervalos de 10°C. Após 10 minutos de incubação em cada temperatura, a atividade enzimática foi determinada nas condições descritas em 2.6.

A estabilidade térmica foi avaliada pela incubação do sobrenadante durante 1 hora em banhos-maria com temperaturas constantes entre 40 e 100°C. Transcorrido este tempo, a atividade residual (%) foi obtida segundo item 2.6 nas temperaturas ótimas para cada enzima.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Perfil do crescimento e atividade de α -amilase e proteases secretadas pelo *Bacillus* sp. SMIA-2

O perfil do crescimento microbiano, pH do meio e atividade da α -amilase e proteases secretadas por *Bacillus* sp. SMIA-2 em meio de cultivo contendo amido solúvel como fonte de carbono são mostrados na Figura 1.

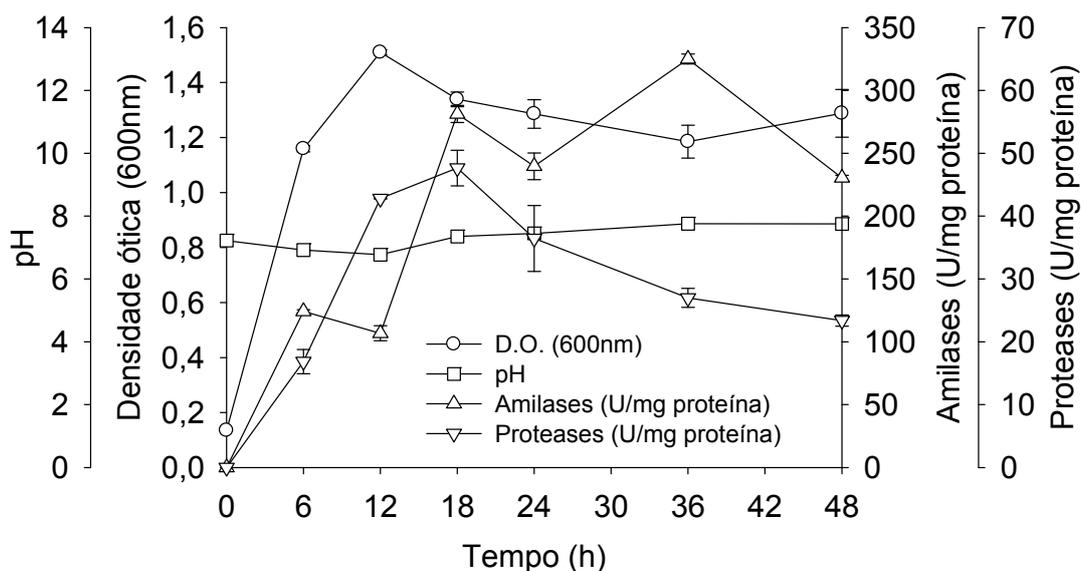


Figura 1 - Densidade ótica, pH do meio e atividade da α -amilase e proteases secretadas pelo *Bacillus* sp. SMIA-2 em meio de cultivo contendo amido solúvel (0,25%). As barras representam o desvio padrão. A ausência de barras indica que o erro foi menor que o símbolo.

O crescimento logarítmico do microrganismo foi notado até 12 horas de incubação da cultura. *Bacillus* sp. SMIA-2 foi capaz de secretar α -amilase durante esta fase. No entanto, a maior síntese desta enzima ocorreu ao fim da fase logarítmica e atingiu seu máximo com 36 horas de fermentação (325 U/mg de proteína). Estes dados sugerem que uma indução efetiva desta enzima não ocorre até que a fase estacionária seja alcançada e corroboram com os achados por Asgher et al., 2007 e Konsoula e Liakopoulou-Kyriakides, 2007.

A atividade das proteases, em 12 horas de fermentação, era de 42 U/mg de proteína. Atingiu seu máximo (47 U/mg proteína) em 18 horas e, a partir daí, decresceu. Sendo assim, a produção de enzimas proteolíticas está ligada a uma cultura metabolicamente ativa. Gupta et al. (2002) relataram que espécies de *Bacillus* produzem proteases extracelulares durante o final da fase logarítmica e início da fase estacionária.

Notou-se uma queda dos valores de pH da cultura de 7,22 para 6,77 nas primeiras 12 horas de cultivo, mas a partir das 18 horas de fermentação este valor elevou-se novamente e permaneceu constante até 48 horas. Esta oscilação pode refletir quais reagentes são consumidos durante o processo fermentativo. Quando íons amônio são captados, o meio torna-se ácido e quando o nitrogênio orgânico

é consumido, o meio alcaliniza (Moon e Parulekar, 1993). Além disso, estas mudanças, além de afetarem a estabilidade dos produtos do meio (Gupta et al., 2003), fornecem informações acerca do início e término da indução da síntese de proteases, já que a secreção da mesma está diretamente relacionada à concentração de nitrogênio disponível no meio (Kumar e Takagi, 2003).

Esta oscilação nos valores de pH da cultura foi observada em experimentos mostrados adiante.

A suplementação do meio de cultivo com proteínas do soro de queijo (PSQ), fonte de nitrogênio, incrementou a produção das hidrolases em estudo (Figura 2) em relação aos dados discutidos anteriormente.

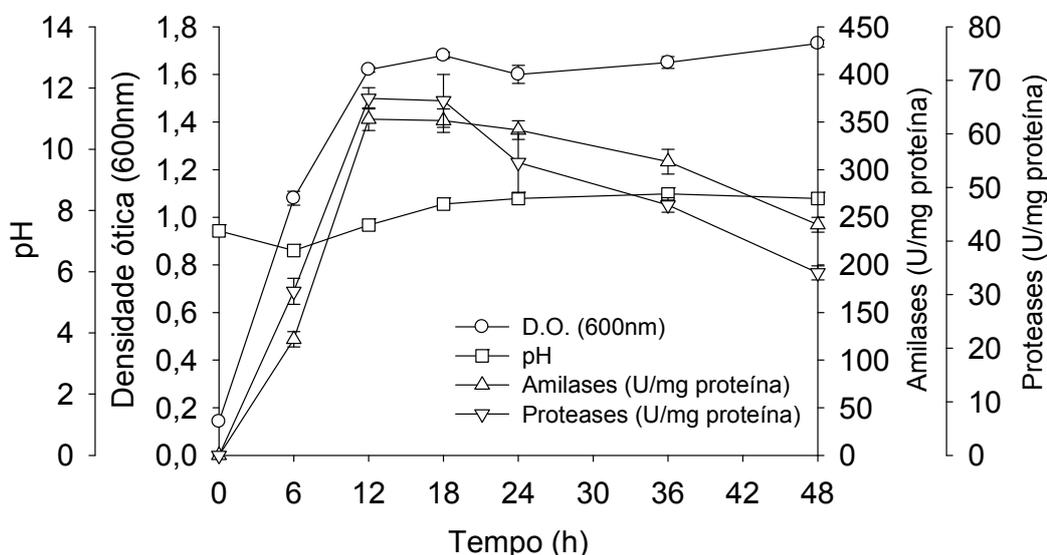


Figura 2 - Densidade ótica, pH do meio e atividade da α -amilase e proteases secretadas pelo *Bacillus* sp. SMIA-2 em meio de cultivo contendo amido solúvel (0,25%) e proteínas do soro de queijo (0,1%). As barras representam o desvio padrão. A ausência de barras indica que o erro foi menor que o símbolo.

Entre 12 e 24 horas de fermentação, a atividade máxima da α -amilase (352 U/mg proteína) e das proteases (66 U/mg proteína) foi alcançada. A obtenção de duas enzimas em um único passo fermentativo significa simplificar o controle da produção simultânea.

A PSQ provê peptídeos e aminoácidos assimiláveis pela cultura em crescimento, o que acaba induzindo uma maior síntese de α -amilase e proteases. Este fato é suportado por alguns estudos encontrados na literatura que reportam

o aumento na atividade destas enzimas quando a concentração de nitrogênio na cultura é aumentada (Uguru et al., 1997; Romero et al., 2001).

A adição de água de maceração de milho (AMM) (0,3%) ao meio de crescimento suplementado com PSQ aumentou a atividade de ambas as enzimas. A AMM é fonte de vários nutrientes e íons metálicos e tem sido utilizada substituindo extratos, como os de carne e levedura (Liggett e Koffler, 1948), por exemplo, no meio de cultivo por outros pesquisadores na produção de enzimas hidrolíticas (Singh et al., 1994; Nusrah e Rahman, 2002; Tari et al., 2006; Konsoula e Liakopoulou-Kiriakides, 2007). A co-utilização de PSQ, AMM e amido solúvel é, portanto, atrativa quando se visa a produção de α -amilase e proteases. Nestas condições, as mais altas atividades destas enzimas foram encontradas transcorridas 18 horas de fermentação, onde as atividades da α -amilase e das proteases atingiram níveis de 401 e 78 U/mg de proteína, respectivamente, como pode ser observado na Figura 3.

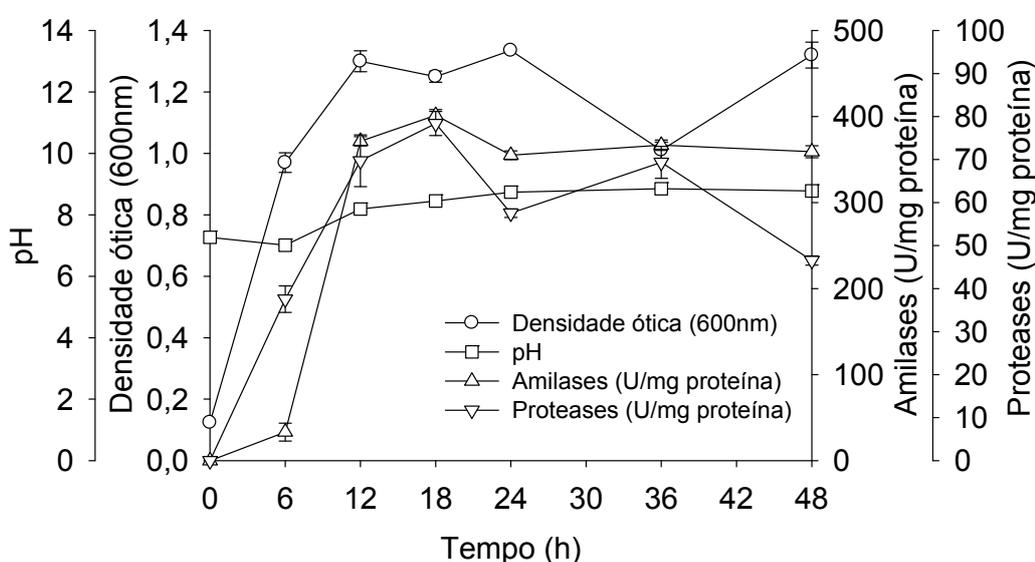


Figura 3 - Densidade ótica, pH do meio e atividade da α -amilase e proteases secretadas pelo *Bacillus* sp. SMIA-2 em meio de cultivo contendo amido solúvel (0,25%), proteínas do soro de queijo (0,1%) e água de maceração de milho (0,3%). As barras representam o desvio padrão. A ausência de barras indica que o erro foi menor que o símbolo.

3.2. Caracterização parcial de α -amilase e proteases secretadas pelo *Bacillus* sp. SMIA-2

A atividade da α -amilase incubada a 90°C durante 10 minutos foi maior em pH 9. Em pH 6 e 10, a atividade da enzima foi reduzida cerca de 60 e 17%, respectivamente, em relação à máxima (Figura 4). O pH que propiciou a maior atividade das proteases também foi 9 e cerca de 69 e 34% da atividade proteolítica encontrada em pH 9 foi retida nos pHs 9,5 e 10 (Figura 5).

As enzimas foram bastante estáveis quando incubadas em pH 6 a 9 durante 2 horas em temperatura ambiente, respectivamente.

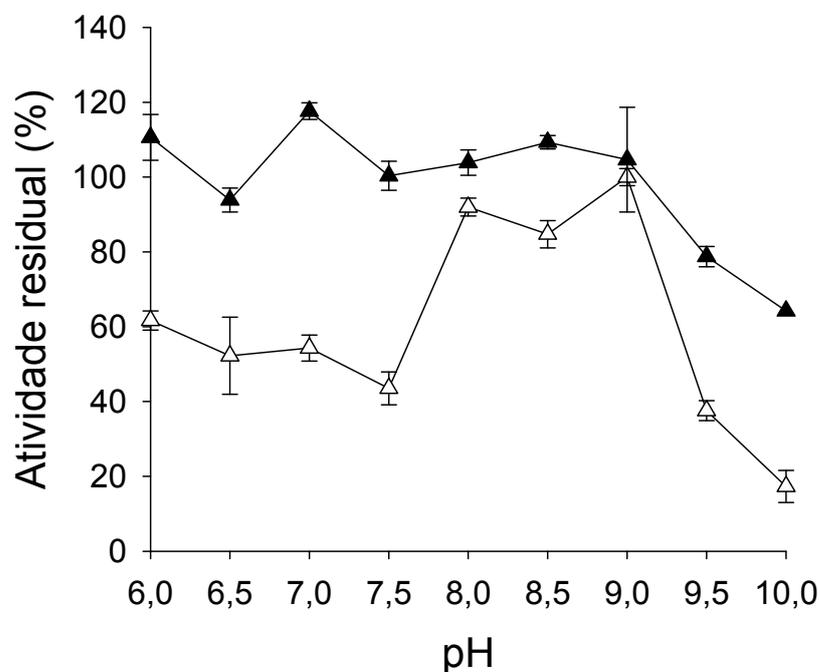


Figura 4 - Efeito do pH na atividade (Δ) e estabilidade (\blacktriangle) da α -amilase secretada pelo *Bacillus* sp. SMIA-2 crescido a 50°C durante 18 horas (100% de atividade = 308 U/mg de proteína). As barras representam o desvio padrão. A ausência de barras indica que o erro foi menor que o símbolo.

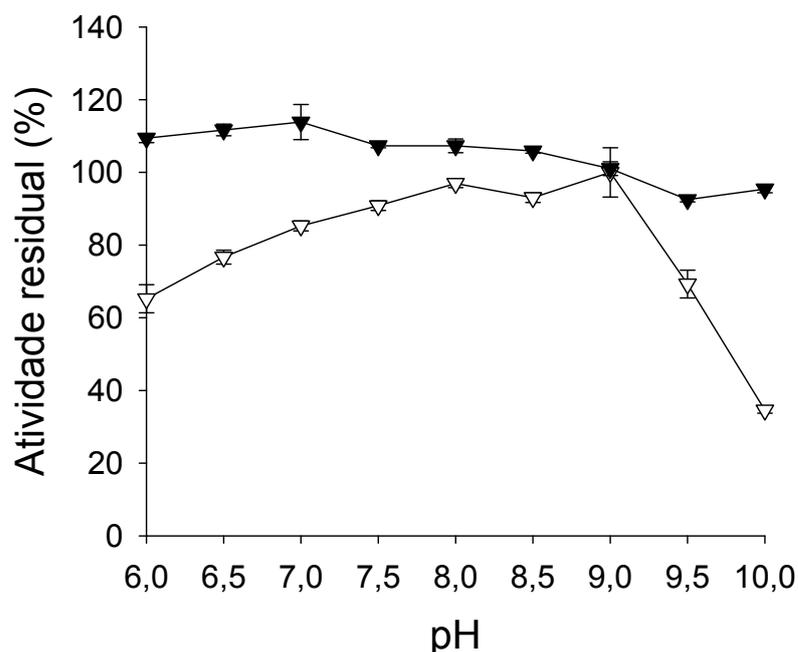


Figura 5 - Efeito do pH na atividade (v) e estabilidade (▼) das proteases secretadas pelo *Bacillus* sp. SMIA-2 crescido a 50°C durante 18 horas (100% de atividade = 79 U/mg de proteína). As barras representam o desvio padrão. A ausência de barras indica que o erro foi menor que o símbolo.

Amilase de *Bacillus* sp. apresentou atividade ótima em pH 7 (Teodoro e Martins, 2000) enquanto a produzida por *Bacillus* sp. PN5 mostrou-se ativa e estável em pH 10. Cerca de 80 e 60% da atividade amilolítica ainda foi notada quando esta enzima foi incubada em tampão com pH 10 por 1 e 6 horas, respectivamente (Saxena et al., 2007). Já Sajedi et al. (2005) concluíram que o pH ótimo da α -amilase secretada por *Bacillus* sp. KR-8104 estava entre 4 e 6.

Proteases secretadas por *Bacillus pantotheneticus* em meio de cultivo contendo melaço foi mais ativa em pH 8,4 e estável em valores entre 7 e 11 (Shikha et al., 2007). A levedura *Aureobasidium pullulans*, em meio de cultivo contendo amido como fonte de carbono, produziu proteases mais ativas em pH 9 (Chi et al., 2007), assim como o microrganismo do presente estudo.

A boa atividade e estabilidade de ambas as enzimas em altos valores de pH torna possível a aplicação das mesmas na indústria de detergentes, por exemplo, já que os mesmos costumam apresentar pH alcalino (em torno de 9-12) (Sellami-Kamoun et al., 2006).

A influência da temperatura na atividade da α -amilase e proteases secretadas por *Bacillus* sp. SMIA-2 também foi averiguada.

As temperaturas que evidenciaram a atividade da α -amilase e proteases foram 90°C e 70°C, respectivamente, as quais são maiores ou similares às temperaturas ótimas encontradas para outras amilases (Burhan et al., 2003; Carvalho et al, 2008) e proteases (Genckal e Tari, 2006; Silva et al, 2007) de cepas de *Bacillus* sp.

Além da temperatura ótima, a termoestabilidade destas enzimas foi analisada medindo-se a atividade residual da amilase a 90°C e das proteases a 70°C após incubação das enzimas, sem o substrato, durante 1 hora em temperaturas entre 40 e 100°C (Figuras 6 e 7).

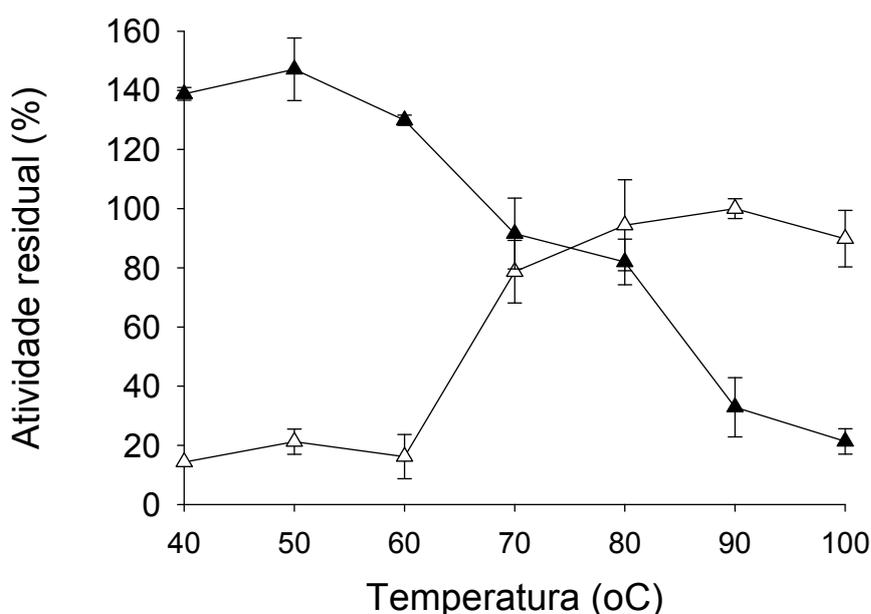


Figura 6 - Efeito da temperatura na atividade (Δ) e estabilidade (\blacktriangle) da α -amilase secretada por *Bacillus* sp. SMIA-2 crescido a 50°C durante 18 horas (100% de atividade = 227 U/mg de proteína). As barras representam o desvio padrão. A ausência de barras indica que o erro foi menor que o símbolo.

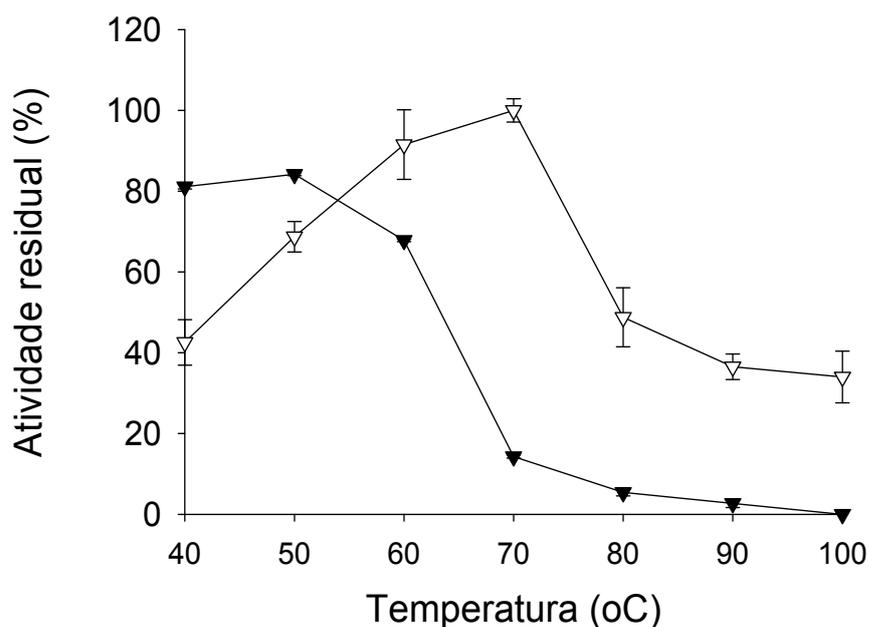


Figura 7 - Efeito da temperatura na atividade (v) e estabilidade (▼) das proteases secretadas por *Bacillus* sp. SMIA-2 crescido a 50°C durante 18 horas (100% de atividade = 76 U/mg de proteína). As barras representam o desvio padrão. A ausência de barras indica que o erro foi menor que o símbolo.

A α -amilase apresentou uma boa estabilidade entre 40 e 70°C. A 70°C apenas 10% da atividade original foi perdida. No entanto, por volta de 90% da atividade das proteases foi perdida sob as mesmas condições.

Amilase de *Bacillus* sp. PN5 teve sua atividade evidenciada a 90°C. Após 6 horas de incubação nesta mesma temperatura, a enzima ainda exibia 90% de atividade (Saxena et al., 2007). Entre 37 e 45°C foram as temperaturas que as proteases de *Bacillus subtilis* se mostraram mais ativas. No entanto, quando incubadas a 60°C durante 15, 30, 45, 90 e 120 minutos, cerca de 67, 47, 37, 28 e 24% da atividade enzimática ainda foi encontrada, respectivamente (Mukherjee et al., 2008).

Enzimas termotolerantes são aplicadas em variados setores industriais por prevenirem a contaminação microbiana por mesófilos, tornarem os reagentes mais solúveis facilitando a difusão dos mesmos e permitirem que concentrações mais altas destes compostos sejam utilizadas (Van den Burg, 2003, Haki e Rakshit, 2003).

4. CONCLUSÕES

Bacillus sp. SMIA-2 cresceu e secretou α -amilase e proteases quando cultivado em meio contendo amido solúvel (0,25%) como fonte de carbono. A maior atividade da α -amilase (325 U/mg de proteína) foi encontrada durante a fase estacionária de crescimento (36 horas), enquanto as proteases foram induzidas (47U/mg de proteína) entre o fim da fase logarítmica e início da fase estacionária do microrganismo (18 horas). Houve queda do pH do meio de cultivo nas primeiras 12 horas de incubação.

A suplementação do meio de cultivo com proteínas do soro de queijo (0,1%) e água de maceração de milho (0,3%), não apenas incrementou a atividade de ambas as enzimas (401 U/mg de proteína para amilases e 78 U/mg de proteína para proteases) como tornou possível a produção concomitante das mesmas, o que facilita o controle do processo.

O pH e temperatura ótimos da α -amilase foi 9 e 90°C, enquanto a das proteases, 9 e 70°C. Ambas as enzimas foram estáveis em um amplo espectro de valores de pH.

Quanto à termoestabilidade, a α -amilase foi estável entre 40 e 70°C, enquanto as proteases perderam cerca de 90% de atividade sob as mesmas condições.

5. REFERÊNCIAS

- Ashger, M., Asad, M.J., Rahman, S.U., Legge, R.L. (2007). A thermostable α -amylase from a moderately thermophilic *Bacillus subtilis* strain for starch processing. *Journal of Food Engineering*, 79:950-955.
- Burhan, A., Nisa, U., Gokhan, C., Omer, C., Ashabil, A., Osman, G. (2003). Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkaliphilic *Bacillus* sp. isolate ANT-6. *Process Biochemistry*, 38:1397-403.
- Carvalho, R.V., Corrêa, T.L.R., Silva, J.C.M., Mansur, L.R.C.O., Martins, M.L.L.(2008). Properties of an amylase from thermophilic *Bacillus* sp. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39:102-107.

- Chi, Z., Ma, C., Wang, P., Li, H.F. (2007). Optimization of medium and cultivation conditions for alkaline protease production by the marine yeast *Aureobasidium pullulans*. *Bioresource Technology*, 98:534-538.
- Genckal, H., Tari, C. (2006). Alkaline protease production from alkalophilic *Bacillus* sp. Isolated from natural habitats. *Enzyme and Microbial Technology*, 39:703-710.
- Ghorbel, B., Sellami-Kamoun, A., Nasri, M. (2002). Stability studies of protease from *Bacillus cereus* BG1. *Enzyme and Microbial Technology*, 32:513-518.
- González-Siso, M.I. (1996). The biotechnological utilization of cheese whey: A review. *Bioresource Technology*, 57:1-11.
- Gupta, R.; Beg, Q.K.; Lorenz, P. (2002). Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59:15-32.
- Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V.K., Chauhan, B. (2003). Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. *Process Biochemistry*, 38:1599-1616.
- Haki, G.D., Rakshit, S.K. (2003). Developments in industrially important thermostable enzymes: A review. *Bioresource Technology*, 89:17-34.
- Janssen, P.H., Peek, K., Morgan, H.W. (1994). Effect of culture conditions on the production of a extracellular proteinase by *Thermus* sp. Rt41A. *Applied Microbiology Biotechnology*. 41:400-406.
- Johnvesly, B., Naik, G.R. (2001). Studies on production of thermostable alkaline protease from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus* sp. JB-99 in a chemically defined medium. *Process Biochemistry*, 37:139-144.
- Joo, H.S., Chang, C.S. (2005). Production of protease from a new alkalophilic *Bacillus* sp. I-312 grow on soybean meal: optimization and some properties. *Process Biochemistry*, 40:1263-1270.
- Kandra, L. (2003). α -amylases of medical and industrial importance. *Journal of Molecular Structure*, 666-667:487-498.
- Konsoula, Z., Liakopoulou-Kiriakides, M. (2007). Co-production of α -amylase and β -galactosidase by *Bacillus subtilis* in complex organic substrates. *Bioresource Technology*, 98:150-157.
- Kumar, C.G., Takagi, H. (1999). Microbial alkaline proteases : From a bioindustrial viewpoint. *Biotechnology Advances*, 17:561-594.
- Liao, H., Mc Kenzie, T., Hageman, R. (1986). Isolation of a thermostable enzyme variant by cloning and selection in a thermophile. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83:576-580.

- Liggett, R.W., Koffler, H. (1948). Corn steep liquor in microbiology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 12:297-311.
- Merheb, C.W., Cabral, H., Gomes, E., Da-Silva, R.(2007). Partial characterization of protease from a thermophilic fungus, *Thermoascus aurantiacus*, and its hydrolytic activity on bovine casein. *Food Chemistry*, 104:127-131.
- Miller, G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Analytical Chemistry*, 3:426-428.
- Moon, S.H., Parulekar, S.J. (1991). A parametric study of protease production in batch and fed-batch culture of *Bacillus firmus*. *Biotechnology and Bioengineering*, 37:467-483.
- Mukherjee, A.K., Adhikari, H., Rai, S.K. (2008). Production of alkaline protease by *Bacillus subtilis* under solid-state fermentation (SSF) condition using *Imperata cylindrica* grass and potato peel as a low-cost medium: Characterization and application of enzyme in detergent formulations. *Biochemical and Engineering Journal*, 39:353-361.
- Nguyen, Q.D. (2002). Rezessy-Szabo, J.M., Claeysens, M., Stals, I., Hoschke, A. Purification and characterization of amylolytic enzymes from thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* strain ATCC 34626. *Enzyme and Microbial Technology*, 31:345-352.
- Nusrah, A., Rahman, S.R. (2002). Comparative studies on the production of extracellular α -amylase by three mesophilic *Bacillus* isolates. *Bangladesh Journal of Microbiology*, 24:129-132.
- Oliveira, A. N., Oliveira, L. A., Andrade, J.S., Júnior, A.F.C. (2006). Enzimas hidrolíticas extracelulares de isolados de rizóbia nativos da Amazônia Central, Amazonas, Brasil. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 26:853-860.
- Peterson, G. L. (1977). A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. *Analytical Biochemistry*, 83:346-356.
- Romero, F.J., Garcia, L.A., Salas, J.A., Dias, M., Quiros, L.M. (2001). Production, purification and partial characterization of two extracellular proteases from *Serratia marcescens* grown in whey. *Process Biochemistry*, 36:507-515.
- Sajedi, R.H., Naderi-Manesh, H., Khajeh, K., Ahmadvand, R., Ranjbar, B., Asoodeh, A. Moradian, F. (2005) A Ca-independent α -amylase that is active and stable at low pH from the *Bacillus* sp. KR-8104. *Enzyme and Microbial Technology*, 36:666-671.
- Saxena, R.K., Dutt, K., Agarwal, L., Nayyar, P. (2007). A highly thermostable and alkaline amylase from *Bacillus* sp. PN5. *Bioresource Technology*, 98:260-265.
- Schallmeyer, M., Singh, A., Ward, O.P. (2004). Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Canadian Journal Microbiology*, 50:1-17.

- Sellami-Kamoun, A., Haddar, A., Ali, N. E-H., Ghorbel-Frikha, B., Kanoun, S., Nasri, M. (2006). Stability of thermostable alkaline protease from *Bacillus licheniformis* RP1 in commercial solid laundry detergent formulations. *Microbiological Research*, 163:299-306.
- Shikha, Sharan, A., Darmwal, N.S. (2007). Improved production of alkaline from a mutant of alkalophilic *Bacillus pantotheneticus* using molasses as a substrate. *Bioresource Technology*, 98:881-885.
- Silva, C.R., Delatorre, A.B., Martins, M.L.L. (2007). Effect of the culture conditions on the production of an extracellular protease by a thermophilic *Bacillus* sp. and some properties of the enzymatic activity. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38:253-258.
- Singh, A., Ghosh, V.K., Ghosh, P. (1994). Production of thermostable acid protease by *Aspergillus niger*. *Letters in Applied Microbiology*, 18:177-180.
- Souza, A. N. Martins, M.L.L. (2001). Isolation, properties and kinetics of growth of a thermophilic *Bacillus*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 32:271-275.
- Tari, C.; Genckal, H.; Tokatli, F. (2006). Optimization of a growth using a statistical approach for the production of an alkaline protease from a newly isolated *Bacillus* sp. L21. *Process Biochemistry*. 41:659-665.
- Teodoro, C.E.S., Martins, M.L.L. (2000). Culture conditions for the production of thermostable amylase by *Bacillus* sp. *Brazilian Journal of Microbiology*, 31: 298-302.
- Uguru, G.C., Akinyanju, J.A., Sani, A. (1997). The use of yam peel for growth of locally isolated *Aspergillus niger* and amylase production. *Enzyme and Microbial Technology*, 21:48-51.
- Van Den Burg, B. (2003). Extremophiles as a source for novel enzymes. *Current Opinion in Microbiology*, 6:213–218.
- Van der Maarel, M.J.E.C., Van der Veen, B., Uitdehaag, J.C.M., Leemhuis, H., Dijkhuizen, L. (2002). Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. *Journal of Biotechnology*, 94:137-155.

**OTIMIZAÇÃO DO MEIO DE CULTIVO PARA A PRODUÇÃO SIMULTÂNEA DE
 α -AMILASE E PROTEASES PELO *Bacillus* sp. SMIA-2 E APLICAÇÃO
DESTAS ENZIMAS EM FORMULAÇÕES DE DETERGENTE**

Thamy Livia Ribeiro Corrêa e Meire Lelis Leal Martins*

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

RESUMO

O crescimento e a produção de α -amilase e proteases pelo *Bacillus* sp. SMIA-2 em várias condições de cultivo foi estudada. A maior atividade destas enzimas foi obtida em meio contendo amido solúvel, 0,25%, proteínas do soro de queijo, 0,1%, e água de maceração de milho, 0,1%. O incremento da concentração de íons cálcio até 2 mM aumentou a atividade da α -amilase. No entanto, a secreção das proteases foi cálcio-independente. O pH inicial e a temperatura de incubação do meio de cultivo que propiciaram uma maior indução destas enzimas foi 7,5 e 42°C, confirmando a natureza termofílica do microrganismo em estudo. Ambas as enzimas foram mais compatíveis com a formulação do detergente da marca Campeiro®. Enquanto a estabilidade da α -amilase incubada durante 120 minutos a 50°C com este detergente aumentou até o tempo de 90 minutos, as proteases perderam cerca de 50% da atividade original

sob as mesmas condições. A eficácia da solução “detergente-enzimas” na remoção de sujidades foi comprovada através do teste de lavagem.

Palavras-chave: α -amilase, proteases, *Bacillus* sp. SMIA-2, detergentes.

**OPTIMIZATION OF A CULTURE MEDIUM FOR SIMULTANEOUS
PRODUCTION OF α -AMYLASE AND PROTEASE BY THERMOPHILIC *Bacillus*
sp. SMIA-2 AND APPLICATION OF THESE ENZYMES IN DETERGENT
FORMULATIONS**

Thamy Livia Ribeiro Corrêa e Meire Lelis Leal Martins*

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

ABSTRACT

The growth and production of α -amylase and protease by *Bacillus* sp. SMIA-2 in several culture conditions was studied. High activities of these enzymes were reached when the microorganism was cultivated in a medium culture containing soluble starch, 0.25%, whey protein concentrate, 0.1%, and corn steep liquor, 0.1%. The increase in the calcium concentration until 2 mM improved the α -amylase activity. However, the production of protease was calcium-independent. The optimum medium initial pH and incubation temperature for growth and enzymes production was 7.5 and 42°C, confirming the thermophilic nature of the microorganism studied. Both enzymes were more compatible with Campeiro® detergent. While the stability of incubated α -amylase increased along 90 minutes with this detergent, the proteases lost around 50% of its original activity in the same conditions. The efficiency of the solution “detergent-enzymes” on removal of stains was proved through the washing test.

Key-words: α -amylase, protease, *Bacillus* sp. SMIA-2, detergents.

1. INTRODUÇÃO

Amilases e proteases passíveis de aplicação industrial são produzidas principalmente por bactérias do gênero *Bacillus* sp. (Schallmeyer et al., 2004). Dentre as principais consumidoras destas enzimas, devem ser ressaltadas as indústrias de detergentes, alimentos, papel e celulose, têxtil e outras (Kirk et al., 2002). O mercado mundial de enzimas movimenta cerca de 2,3 bilhões de dólares anuais (Mussato et al., 2007) e as enzimas proteolíticas, principalmente as alcalinas, correspondem a 60% deste montante (Banerjee et al. 1999), sendo que 40% são de fontes microbianas (Gupta et al., 2002a) e 35% respondem pelas proteases que são aplicadas na indústria de detergentes (Hadj-Ali et al., 2007). As amilases vêm logo em seguida dominando 30% deste mercado (Van der Maarel et al., 2002).

As fontes de carbono e nitrogênio do meio de cultivo são as que mais encarecem a produção de enzimas em escala industrial (Gupta et al., 2002b). Sendo assim, o estudo de novas alternativas a fim de tornar este custo mais acessível é válido. Vários trabalhos encontrados na literatura reportam a utilização de resíduos agroindustriais, fontes de moléculas de alto valor biológico, na produção de enzimas (Alexandrino et al., 2007, Pelizer et al., 2007, Silva et al., 2007) com resultados satisfatórios.

Muito se tem estudado sobre a influência do meio de cultivo na produção de α -amilase ou proteases. No entanto, artigos sobre a produção simultânea destas enzimas são escassos. Sendo assim, este trabalho objetivou otimizar um meio de cultivo contendo resíduos da agroindústria para a produção de α -amilase e proteases por *Bacillus* sp. SMIA-2 e testar a compatibilidade destas enzimas com marcas comerciais de detergente.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Microrganismo e condições de cultivo

O microrganismo empregado neste estudo foi a bactéria termofílica *Bacillus* sp. SMIA-2, isolada por Souza e Martins (2001), a partir de amostras do solo do município de Campos dos Goytacazes, RJ.

O meio de cultivo contendo aproximadamente (g.L⁻¹ de água destilada): KCl, 0,3; MgSO₄, 0,5; K₂HPO₄, 0,87; CaCl₂, 0,29; Peptona, 1,0 e traços de metais (CaCl₂, 2,2x10⁻³; ZnO, 2,5x10⁻³; FeCl₃.6H₂O, 2,7x10⁻²; MnCl₂.4H₂O, 1,0x10⁻²; CuCl₂.2H₂O, 8,5x10⁻⁴; CoCl₂.6H₂O, 2,4x10⁻³, NiCl₃.6H₂O, 2,5x10⁻⁴, H₃BO₃, 3,0x10⁻⁴; Na₂MoO₄, 1,0x10⁻³) foi utilizado para a produção de α-amilase e proteases. O pH do meio foi ajustado para 7,5 com NaOH 1 M e o mesmo foi esterilizado por autoclavagem a 121^oC por 15 minutos. Os meios de cultivo adicionados de amido solúvel, proteínas do soro de queijo e água de maceração de milho obedeceram ao mesmo procedimento de esterilização adotado acima.

O meio de crescimento (25 mL em frascos Erlenmeyer de 250 mL) foi inoculado com 0,3-0,5 mL do pré-inóculo e incubado a 50^oC em *shaker* rotatório TECNAL TE-420 operando a 150 rpm.

2.2. Medida do crescimento e pH

Após 24 horas de fermentação, o crescimento do microrganismo foi determinado pela turbidez do meio, medindo-se a densidade ótica a 600 nm em espectrofotômetro SHIMADZU UV-mini 1240.

Dados sobre o pH da cultura também foram obtidos utilizando-se pHmetro da marca WTW pH 330.

2.3. Ensaio enzimático

O sobrenadante, livre de células, obtido por centrifugação do caldo fermentativo em centrífuga modelo Hermle-Z 382 (1020g durante/15 minutos/4^oC) foi utilizado para determinação da atividade enzimática.

2.3.1. Determinação da atividade da α -amilase

A atividade da α -amilase foi estimada em triplicata incubando-se 0,5 mL do sobrenadante com 0,5 mL da solução de amido solúvel (0,5%, p/v) preparada em tampão Tris-HCl 0,05 M (pH 8,5) e 0,2 mL do mesmo tampão a 90°C durante 10 minutos. Então, a reação foi paralisada pela adição de 1,0 mL de ácido 3,5 - dinitrossalicílico (DNS) (Miller, 1959), fervida durante 10 minutos e resfriada por 5 minutos e adicionada de 4,8 mL de água destilada. O mesmo procedimento foi realizado com o controle, exceto que o DNS foi adicionado antes do sobrenadante à solução de amido e 0,2 mL de tampão Tris-HCl 0,05 M (pH 8,5).

O teor de açúcares redutores liberados foi determinado em espectrofotômetro a 540 nm. Uma unidade de atividade da α -amilase foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1,0 μ mol de açúcares redutores por minuto em Tampão Tris-HCl 0,05 M (pH 8,5) em solução de 0,5% de amido solúvel como substrato a 90°C.

2.3.2. Determinação da atividade das proteases

A atividade das proteases foi medida segundo metodologia proposta por Janssen et al, 1994. A mistura de reação contendo 0,5 mL do sobrenadante e 1,0 mL do substrato azocaseína (0,2%, p/v) dissolvido em tampão Tris-HCl 0,2M (pH 8,5) foi incubada a 70°C durante 10 minutos. A reação foi paralisada pela adição de 0,5 mL de ácido tricloacético (TCA) (15%, p/v) e então, centrifugada a 11340 g por 5 min. O sobrenadante (2 mL) foi neutralizado com 0,5 mL de NaOH 1 M e a coloração desenvolvida foi medida em espectrofotômetro a 420 nm. Paralelamente, foi feito um tubo controle que continha todos os reagentes do ensaio, exceto o TCA, que foi adicionado antes do extrato enzimático. Uma unidade da enzima foi definida como a quantidade da enzima requerida para produzir um aumento na absorbância a 420 nm igual a 0,1 em 60 minutos.

A determinação da proteína foi realizada segundo Lowry, conforme modificações propostas por Peterson, 1977.

2.4. Efeito das condições da cultura sobre a produção simultânea de α -amilase e proteases

Diferentes concentrações de amido solúvel (0,05; 0,15 e 0,25%) e proteínas do soro de queijo (PSQ) (0,01; 0,05 e 0,1%) foram testadas conjuntamente. Definidas as concentrações de amido solúvel e PSQ que proporcionaram maior atividade de ambas as enzimas, o meio de cultivo foi suplementado com água de maceração de milho (0,05; 0,1; 0,3 e 0,6%). O efeito da concentração do CaCl_2 no meio foi estudada acrescentando 0,5, 1,0, 2,0 e 5,0 mM deste cátion ao meio de cultivo. A influência do pH inicial do meio de cultivo foi testada entre 7 e 9,5 com intervalos de 0,5 unidades. O pH foi ajustado utilizando Na_2CO_3 1% (m/v). Finalmente, as temperaturas de incubação do meio de cultivo (42; 50 e 60°C) também foram avaliadas.

2.5. Compatibilidade e estabilidade da α -amilase e proteases com detergentes comerciais

Para este experimento foram utilizados detergentes das marcas Ariel[®], Biz[®], Cheer[®], Tide[®], Campeiro[®] e Omo[®]. Os mesmos foram diluídos em água destilada na concentração de 7 mg/mL para simular condições de lavagem (Banerjee et al., 1999). Após aquecimento a 100°C durante 15 minutos para desnaturar quaisquer enzimas porventura presentes na formulação do detergente, o sobrenadante foi adicionado a esta solução na proporção de 1:1. As atividades residuais (%) de ambas as enzimas foram obtidas segundo metodologias descritas no item 2.3. Um controle contendo apenas enzima e água destilada foi utilizado.

Determinada a marca de detergente que proporcionou melhores níveis de atividade de α -amilase e proteases, as enzimas foram incubadas em uma solução do mesmo a 50°C durante 120 minutos. As atividades residuais (%) de ambas as enzimas foram obtidas segundo metodologias descritas no item 2.3. Um controle, contendo apenas o sobrenadante e água destilada foi utilizado.

2.6. Teste de lavagem

A fim de provar a eficácia da solução detergente-enzimas na remoção de sujidades, pedaços (5x5cm) de tecido de algodão foram manchados com gema de ovo (rico em proteínas) e molho de tomate (rico em amido) e submetidos aos seguintes tratamentos em diferentes frascos erlenmeyer (Banerjee et al., 1999; Abidi et al., 2008):

1. 100 mL de água destilada;
2. 100 mL de água + 1 mL de detergente;
3. 100 mL de água destilada + 1 mL de detergente + 2 mL do extrato bruto das enzimas
4. 100 mL de água destilada + 1 mL de detergente + 5 mL do extrato bruto das enzimas.

Os frascos com os tratamentos descritos acima foram incubados a 50°C durante 15 minutos. Após a incubação, as peças foram lavadas com água destilada e secas. O exame visual revelou o efeito das enzimas na remoção das manchas. Peças manchadas com gema de ovo e molho de tomate não tratadas foram utilizadas como controle.

2.7. Delineamento experimental

Os experimentos foram conduzidos em triplicata e os resultados avaliados pela análise de variância (ANOVA) utilizando o programa SAS. O efeito dos tratamentos foi comparado pelo teste de Tukey.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Efeito das condições da cultura para a produção simultânea de α -amilase e proteases pelo *Bacillus* sp. SMIA-2

Bacillus sp. SMIA-2 cresceu e secretou α -amilase e proteases simultaneamente em todas as concentrações de amido solúvel e PSQ testadas (Tabela 1). Entretanto, as concentrações de 0,25% de amido e 0,1% de proteínas

do soro de queijo foram as que proporcionaram maiores níveis de atividade tanto da α -amilase quanto das proteases. De fato, meios de cultivo contendo amido solúvel em sua formulação têm sido reportados para a obtenção de α -amilase e proteases por meio de processos fermentativos (Hernández et al., 2006; Tanyildizi et al., 2007; Chi et al., 2007).

Tabela 1 - Efeito de diferentes concentrações de amido solúvel e proteínas do soro de queijo na atividade da α -amilase e proteases produzidas por *Bacillus* sp. SMIA-2 crescido durante 24 horas a 50°C.

AS/PSQ (%)	D.O. (600nm)	pH	α -amilase (U/mg proteína)	Proteases (U/mg proteína)
0,05/0,01	0,512 \pm 0,098 ^g	8,19 \pm 0,015 ^d	219,237 ^c	9 \pm 0,541 ⁱ
0,05/0,05	0,610 \pm 0,035 ^f	8,38 \pm 0,012 ^b	190,902 ^d	15,039 \pm 0,266 ^h
0,05/0,1	0,879 \pm 0,183 ^e	8,54 \pm 0,01 ^a	235,035 ^b	28,1 \pm 1,389 ^g
0,15/0,01	1,018 \pm 0,029 ^e	8,01 \pm 0,006 ^f	126,275 \pm 3,457 ⁱ	49,528 \pm 3,583 ^f
0,15/0,05	1,512 \pm 0,01 ^{bc}	8,2 \pm 0,036 ^d	173,329 \pm 5,032 ^e	64,299 \pm 3,647 ^d
0,15/0,1	1,25 \pm 0,005 ^d	8,29 \pm 0,017 ^c	161,336 ^g	81,114 \pm 1,647 ^c
0,25/0,01	1,754 ^a	7,69 \pm 0,006 ^g	164,669 ^f	91,023 \pm 0,841 ^b
0,25/0,05	1,679 \pm 0,026 ^{ab}	8,11 \pm 0,015 ^e	138,805 ^h	59,25 \pm 2,841 ^e
0,25/0,1	1,421 \pm 0,092 ^{ad}	8,39 \pm 0,015 ^b	374,495 \pm 6,105 ^a	103,837 \pm 2,864 ^a

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, em 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey. \pm significa desvio padrão.

O amido, por ser uma fonte de carbono não prontamente assimilável, ao contrário da molécula de glicose, por exemplo, induz a secreção de carbohidrases pelo microrganismo que tornam possível a sua assimilação e utilização para o incremento da massa celular. Por outro lado, meios de cultivo ricos em proteínas como aquelas contidas no soro de queijo possuem indutores que levam a produção de proteases. Por isso, grandes quantidades desta enzima podem ser produzidas utilizando o soro de queijo, um resíduo da indústria de laticínios (Romero et al., 2001).

Assim, a utilização de PSQ juntamente com o amido, além de contribuir com a redução da descarga de poluentes no meio-ambiente, favorece também a redução do custo do meio de cultivo utilizado para a produção de α -amilase e proteases, o que é interessante tendo em vista que a obtenção de mais de uma enzima em um mesmo processo fermentativo representa, em escala industrial, economia de energia, reagentes e tempo.

Estudos conduzidos por Carvalho et al. (2008) com *Bacillus* sp. SMIA-2 apontaram que a maior atividade da α -amilase foi alcançada quando as

concentrações de amido solúvel e de PSQ utilizadas no meio de cultivo foram de 0,25% e 0,1%, respectivamente. Além disso, a produção de proteases por esta mesma cepa foi maior quando 0,1% de PSQ foi adicionada ao meio que continha maltose como fonte de carbono (Silva et al., 2007).

O enriquecimento do meio de cultivo com água de maceração de milho (AMM), um subproduto resultante do processamento dos grãos de milho, aumentou a atividade da α -amilase e das proteases. De acordo com os resultados mostrados na Tabela 2, uma ascensão do crescimento do microrganismo e da atividade das enzimas foi observada à medida que se aumentou a concentração deste resíduo até 0,1%. Subseqüentes aumentos na concentração da AMM reduziram os valores da densidade ótica da cultura e da atividade das enzimas.

Tabela 2 - Efeito de diferentes concentrações de água de maceração de milho na atividade da α -amilase e proteases produzidas pelo *Bacillus* sp. SMIA-2 crescido durante 24 horas a 50°C.

AMM (%)	D.O. (600nm)	pH	α -amilase (U/mg proteína)	Proteases (U/mg Proteína)
0	1,329 ^b	8,67 \pm 0,01 ^b	348,316 \pm 4,949 ^d	79,299 \pm 1,657 ^c
0,05	1,28 \pm 0,042 ^b	8,65 \pm 0,01 ^b	437,068 \pm 5,574 ^b	93,043 \pm 0,087 ^b
0,1	1,464 \pm 0,018 ^a	8,69 \pm 0,03 ^b	518,510 \pm 1,878 ^a	113,236 \pm 10,945 ^a
0,3	1,257 \pm 0,065 ^b	8,9 \pm 0,075 ^a	377,854 \pm 1,861 ^c	102,323 \pm 3,896 ^{ab}
0,6	0,991 \pm 0,011 ^c	9 \pm 0,006 ^a	204,521 \pm 4,845 ^e	50,183 \pm 1,535 ^d

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, em 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey. \pm significa desvio padrão.

Por ser um rejeito agroindustrial, a utilização da AMM em processos biotecnológicos que dão origem a produtos de interesse comercial, torna-se muito interessante. Ela pode ser utilizada como suplemento substituindo fontes de nitrogênio de alto custo como os extratos de carne e levedura (Liggett e Koffler, 1948) no meio de cultivo. Nusrah e Rahman (2002) utilizaram a AMM para a produção de α -amilase extracelular a partir de três cepas de *Bacillus*. Konsoula e Liakopoulou-Kiriakides (2007) relataram que a combinação de farinha de milho com AMM aumentou a atividade da α -amilase e da β -galactosidase secretadas por *Bacillus subtilis* em 1,5 e 3 vezes, respectivamente, quando comparado às atividades obtidas quando o microrganismo foi cultivado em meio contendo apenas farinha de milho. A AMM também proporcionou aumento na atividade de

proteases de *Bacillus* sp. L21 (Tari et al., 2006) e de *Streptomyces* sp. 594 (Azeredo et al., 2006).

O efeito da concentração do CaCl_2 no meio de cultura sobre a produção das enzimas também foi investigado. Foi observado que a atividade da α -amilase aumentou com o incremento da concentração deste íon até 2 mM. Entretanto, a síntese de enzimas proteolíticas foi completamente independente do CaCl_2 , já que não foram encontradas diferenças significativas nos níveis de atividade, quando o microrganismo foi cultivado na ausência ou presença do mesmo (Tabela 3). Em relação ao crescimento, a concentração de 2 mM apresentou uma redução na densidade óptica da cultura mesmo promovendo altos níveis de atividade da α -amilase.

Tabela 3 - Efeito de diferentes concentrações de CaCl_2 na atividade da α -amilase e proteases produzidas por *Bacillus* sp. SMIA-2 crescido durante 24 horas a 50°C.

CaCl_2 (mM)	D.O. (600nm)	pH	Amilases (U/mg proteína)	Proteases (U/mg Proteína)
0	1,61 ± 0,022 ^a	8,57 ± 0,04 ^{ab}	159,393 ± 1,308 ^d	90,123 ± 1,283 ^a
0,5	1,601 ± 0,009 ^a	8,66 ± 0,02 ^a	299,721 ± 7,219 ^c	90,585 ± 3,209 ^a
1,0	1,622 ± 0,011 ^a	8,59 ± 0,05 ^a	372,136 ± 3,989 ^b	88,681 ± 5,881 ^a
2,0	1,515 ± 0,008 ^b	8,46 ± 0,04 ^{bc}	442,37 ± 5,583 ^a	95,871 ± 4,378 ^a
5,0	0,893 ± 0,008 ^c	8,37 ± 0,07 ^c	383,01 ± 1,003 ^b	91,565 ± 8,681 ^a

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, em 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey. ± significa desvio padrão.

A adição de 10 mM de cálcio ao meio de cultivo propiciou um maior crescimento e atividade da α -amilase de *Bacillus subtilis* quando comparado com o meio sem este íon (Ashger et al., 2007). Já a atividade da α -amilase secretada por *Bacillus thermooleovorans* mostrou-se completamente independente da disponibilidade de cálcio no meio (Malhotra et al., 2000).

Além disso, proteases secretadas por *Bacillus cereus* BG1 cultivado em meio com 2 mM de CaCl_2 aumentaram suas atividades em 500% quando comparadas com o meio controle, que não continha CaCl_2 (Ghorbel et al., 2002). Proteases de *Bacillus cereus* MCM B-326 requereram cálcio para serem induzidas (Nilegaonkar et al., 2007). Nascimento et al. (2007) constataram que a adição 2 mM não melhorou a atividade das proteases de *Bacillus* sp. SMIA-2. No entanto, houve uma melhoria na termoestabilidade destas enzimas.

O crescimento e a atividade de α -amilase e proteases de *Bacillus* sp SMIA-2 cultivado em meio contendo 0,25% de amido solúvel, 0,1% de PSQ, 0,1% de AMM e 2 mM de CaCl_2 a diferentes valores de pH inicial são mostrados na Tabela 4. O microrganismo foi capaz de crescer e produzir hidrolases neste meio com valores de pH variando entre 7 e 9,5. Não foram encontradas diferenças significativas nas atividades da α -amilase e proteases entre os valores de pH 7 e 8. Além disso, foi observado que para todos os meios de cultivo, houve elevação dos valores de pH para acima de 8,0 após 24 horas de fermentação.

Tabela 4 - Efeito do pH do meio de cultivo na atividade da α -amilase e proteases produzidas por *Bacillus* sp. SMIA-2 crescido durante 24 horas a 50°C.

pH	D.O. (600nm)	pH	α -amilase (U/mg proteína)	Proteases (U/mg proteína)
7	1,2 \pm 0,023 ^{ab}	8,64 \pm 0,025 ^e	411,469 \pm 16,484 ^a	107,679 \pm 5,25 ^a
7,5	1,219 \pm 0,004 ^a	8,99 \pm 0,006 ^d	429,06 \pm 2,301 ^a	102,103 \pm 1,517 ^a
8	1,154 ^{ab}	9,08 ^c	416,414 \pm 11,649 ^a	105,148 \pm 0,689 ^a
8,5	1,151 \pm 0,052 ^b	9,18 \pm 0,025 ^b	372,795 \pm 9,829 ^b	82,585 \pm 2,878 ^b
9	1,012 ^c	9,19 ^b	321,55 \pm 8,515 ^c	80,198 \pm 0,229 ^b
9,5	1,08 \pm 0,02 ^c	9,25 \pm 0,015 ^a	338,271 \pm 4,45 ^c	78,546 \pm 1,29 ^b

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, em 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey. \pm significa desvio padrão.

A maioria das espécies de *Bacillus* empregadas na produção de α -amilase é cultivada em meio com pH inicial ao redor de 6 - 7 (Gupta et al., 2003). No caso das proteases, esse valor se encontra ao redor de 7,5 (Kumar e Takagi, 1999). No entanto, são encontradas cepas capazes de uma boa secreção enzimática em pH ao redor de 9,0, o que revela a natureza alcalofílica do microrganismo em questão (Patel et al., 2005).

Bacillus sp. SMIA-2 quando crescido em meio de cultivo contendo maltose, soro de queijo e água de maceração de milho apresentou atividade máxima de proteases em pH inicial igual a 7,5 (Silva et al., 2007) e quando o meio de cultivo continha amido e soro de queijo, o mesmo apresentou maior atividade de α -amilase em pH 8 - 8,5 (Carvalho et al., 2008).

Quando a cultura foi incubada a 42 e 50°C, não foram observadas diferenças significativas no crescimento do microrganismo. No entanto, a 60°C, *Bacillus* sp. SMIA-2 teve seu crescimento inibido. A melhor temperatura de incubação para a síntese de α -amilase e proteases foi 42°C (Tabela 5).

Tabela 5 - Efeito da temperatura de incubação do meio de cultivo na atividade da α -amilase e proteases produzidas por *Bacillus* sp. SMIA-2 crescido durante 24 horas a 50°C.

Temperatura (°C)	D.O. (600nm)	pH	α -amilase (U/mg proteína)	Proteases (U/mg proteína)
42	1,431 \pm 0,012 ^a	8,77 \pm 0,032 ^a	357,762 \pm 3,846 ^a	110,655 \pm 0,6 ^a
50	1,37 \pm 0,015 ^a	8,86 \pm 0,006 ^a	310,842 \pm 5,163 ^b	101,647 \pm 4,211 ^b
60	0,458 \pm 0,015 ^b	6,44 \pm 0,105 ^b	44,616 \pm 6,079 ^c	5,748 \pm 1,163 ^b

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, em 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey. \pm significa desvio padrão.

Bacillus sp. PN-5, quando cultivado em temperaturas entre 30 e 70°C, foi capaz de secretar α -amilase com atividade satisfatória a 60°C (Saxena et al., 2007). A partir daí, houve um declínio nos valores da atividade da mesma. Uma espécie de *Bacillus* mostrou máxima atividade de proteases a 40°C (Mehrotra et al., 1999) e *Bacillus* sp. JB-99 cresceu em um amplo espectro de temperaturas de incubação (30 a 65°C), sendo a atividade máxima da protease encontrada a 55°C, (Johnvesly e Naik, 2001).

3.2. Compatibilidade e estabilidade de α -amilase e proteases com detergentes comerciais

A compatibilidade e a estabilidade da α -amilase e das proteases com os detergentes comerciais Ariel[®], Biz[®], Cheer[®], Tide[®], Campeiro[®] e Omo[®] foram investigadas. Tanto a α -amilase quanto as proteases foram compatíveis com todos os detergentes testados. A atividade da α -amilase foi estimulada quando incubada na presença do detergente Campeiro[®]. A atividade da mesma aumentou cerca de 24%, ao passo que a atividade das proteases reduziu em torno de 27% quando comparadas ao controle adotado como 100% (Figura 1).

Vários estudos sobre a aplicação de enzimas, principalmente proteases, em fórmulas de detergente estão disponíveis na literatura (Banerjee et al., 1999, Banik e Prakash, 2004, Abidi et al., 2008; Mukherjee et al., 2008 e Mukherjee et al., 2009). O que torna possível a aplicação de enzimas hidrolíticas em formulações de detergente é a sua compatibilidade e estabilidade com os constituintes dos mesmos (Mittidieri et al., 2006).

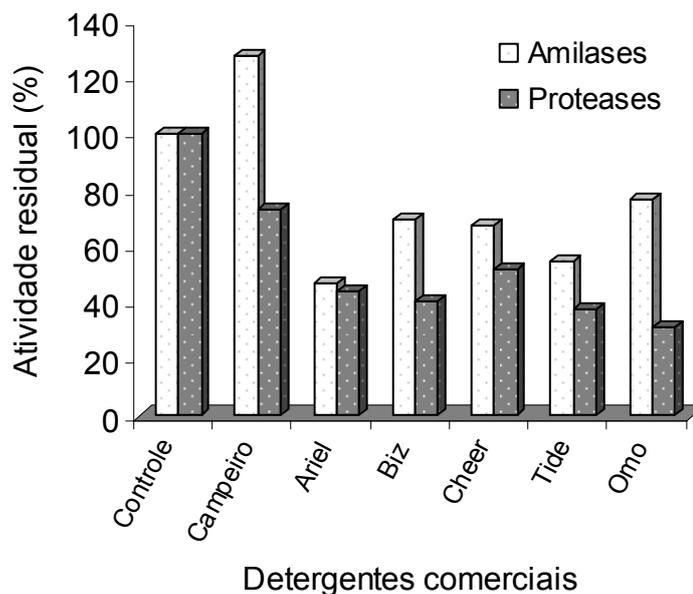


Figura 1 - Compatibilidade da α -amilase e proteases secretadas por *Bacillus* sp. SMIA-2 com fórmulas comerciais de detergente.

Uma vez que as enzimas apresentaram boa compatibilidade com o detergente Campeiro[®], a estabilidade das mesmas foi estudada na presença deste detergente.

A α -amilase, quando incubada a 50°C durante 120 minutos com o detergente Campeiro[®], mostrou um aumento na sua atividade, cerca de 54%, até o tempo de 90 minutos (Figura 2). De acordo com os resultados relatados por Carvalho et al. (2008), esta mesma enzima quando incubada a 50°C (sem a presença de detergente) foi estável durante 1 hora. Portanto, a presença do detergente na solução do ensaio enzimático contribuiu para o aumento da estabilidade da enzima. Por outro lado, a protease perdeu cerca de 32% de sua eficiência catalítica nos primeiros 15 minutos de incubação. Da mesma forma, de acordo com os resultados relatados por Silva et al. (2007), cerca de 10% da atividade proteolítica foi perdida quando esta enzima foi incubada a 50°C durante 1 hora. Quando a mesma enzima foi incubada a 50°C durante 2 horas, aproximadamente 45% da atividade original foi perdida (Nascimento e Martins, 2004). Portanto, a estabilidade das duas enzimas na presença do detergente Campeiro[®], ou foi aumentada no caso da amilase, ou não alterada no caso da protease, pela presença do mesmo.

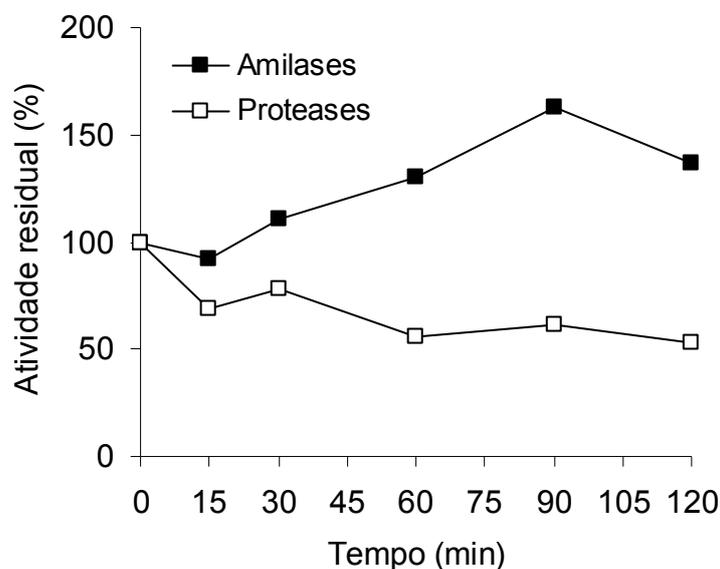


Figura 2 - Estabilidade da α -amilase e proteases de *Bacillus* sp. SMIA-2 incubadas 50°C com detergente Campeiro®.

3.3. Teste de lavagem

A eficiência da solução “detergente-enzimas” na remoção de sujidades ricas em amido, molho de tomate e proteínas, gema de ovo, está mostrada na Figura 3. O efeito pronunciado da α -amilase na remoção da mancha de molho de tomate foi observado principalmente quando uma maior quantidade da mesma (5 mL) foi adicionada à solução de detergente. Além disso, as proteases também mostraram resultados satisfatórios. Sendo assim, ambas as enzimas mostram-se passíveis de aplicação como aditivos em fórmulas de detergente.

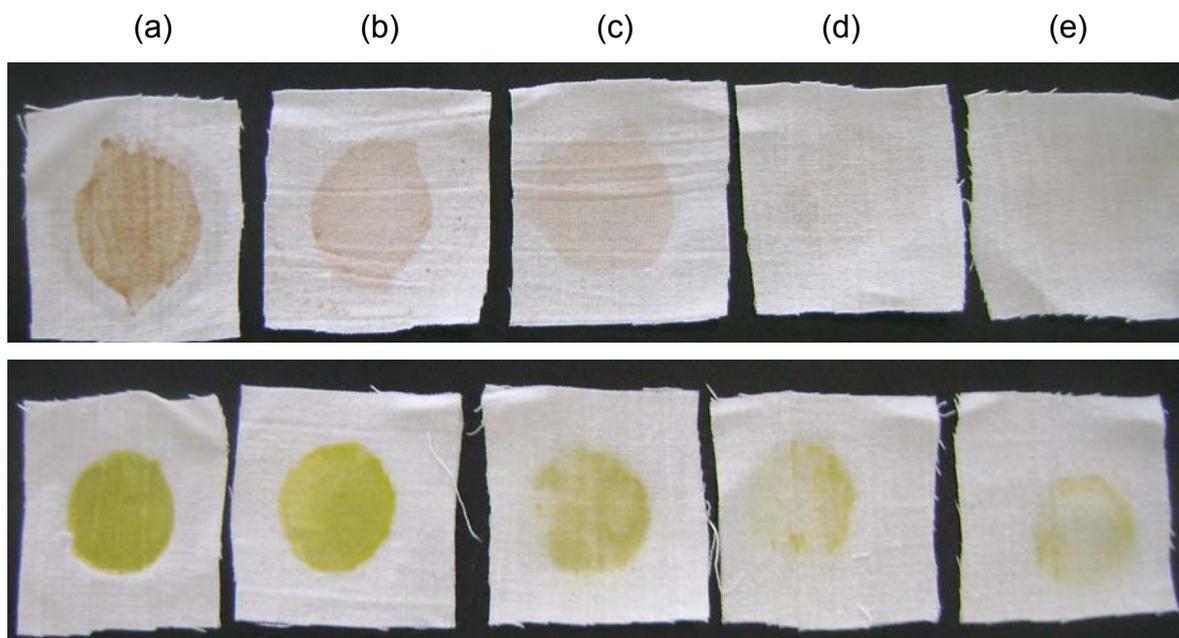


Figura 3 - Efeito da solução “detergente-enzimas” na remoção de manchas de molho de tomate e gema de ovo: (a) controle não tratado; (b) peças incubadas com água destilada; (c) peças incubadas com água destilada e 1mL de detergente; (d) peças incubadas com água destilada, 1mL de detergente e 2mL do extrato enzimático; (e) peças incubadas com água destilada, 1mL de detergente e 5mL do extrato enzimático.

4. CONCLUSÕES

As maiores atividades de α -amilase e proteases produzidas pelo *Bacillus* sp. SMIA-2 foram alcançadas quando o microrganismo foi crescido em meio contendo 0,25% de amido solúvel, 0,1% de proteínas do soro de queijo, 0,1% de água de maceração de milho e 2 mM de CaCl_2 . O pH inicial e a temperatura de incubação que propiciaram as melhores atividades de ambas as enzimas foram 7,5 e 42° C, respectivamente.

As enzimas produzidas nas condições citadas acima foram compatíveis com todas as marcas de detergentes testadas. No entanto, os melhores resultados foram obtidos com o detergente da marca Campeiro[®]. A α -amilase foi estável quando incubada por 120 minutos a 50° C na presença deste detergente, enquanto as proteases perderam mais de 50% da atividade nas mesmas condições.

O teste de lavagem comprovou que a α -amilase e as proteases de *Bacillus* sp. SMIA-2 são passíveis de aplicação na indústria de detergentes, tendo em vista a eficiência das mesmas na remoção de manchas de molho de tomate, rica em amido, e gema de ovo, rica em proteína.

5. REFERÊNCIAS

- Abidi, F., Liman, F., Negib, M.M. (2008). Production of alkaline proteases by *Botrytis cinerea* using economic raw materials: Assay as biodetergent. *Process Biochemistry*, 43:1202-1208.
- Alexandrino, A.M., Faria, H.G., Souza, C.G.M., Peralta, R.M. (2007). Aproveitamento do resíduo de laranja para a produção de enzimas lignocelulolíticas por *Pleurotus ostreatus* (Jack:Fr). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 27:364-368.
- Ashger, M., Asad, M.J., Rahman, S.U., Legge, R.L. (2007). A thermostable α -amylase from a moderately thermophilic *Bacillus subtilis* strain for starch processing. *Journal of Food Engineering*, 79:950-955.
- Azeredo, L.A.I., Lima, M.B. de, Coelho, R.R.R., Freire, D.M.G. (2006). A low-cost fermentation medium for thermophilic protease production by *Streptomyces* sp. 594 using feather meal and corn steep liquor. *Current Microbiology*, 53:535-539.
- Banerjee, U. C., Sani, R.K., Azmi, W., Soni, R. (1999). Thermostable alkaline protease from *Bacillus brevis* and its characterization as a laundry detergent additive. *Process Biochemistry*, 35:213-219.
- Banik, R.M., Prakash, M. (2004). Laundry detergent compatibility of the alkaline protease from *Bacillus cereus*. *Microbiological Research*, 159:135-140.
- Carvalho, R.V.de, Corrêa, T.L.R., Silva, J.C.M., Viana, A.P., Martins, M.L.L. (2008). Otimização das condições de cultivo para a produção de amilases pelo termofílico *Bacillus* sp. e hidrólise de amidos pela ação da enzima. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 28:1-7.
- Chi, Z., Ma, C., Wang, P., Li, H.F. (2007). Optimization of medium and cultivation conditions for alkaline protease production by the marine yeast *Aureobasidium pullulans*. *Bioresouce Technology*, 98:534-538.
- Ghorbel, B., Sellami-Kamoun, A., Nasri, M. (2002). Stability studies of protease from *Bacillus cereus* BG1. *Enzyme and Microbial Technology*, 32:513-518.

- Gupta, R., Beg, Q.K., Lorenz, P. (2002a). Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Applied Microbiology Biotechnology*, 59:15-32.
- Gupta, R., Beg, K.Q., Khan, S., Chauhan, B. (2002b). An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases. *Applied Microbiology Biotechnology*, 60:381-395.
- Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V.K., Chauhan, B. (2003). Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. *Process Biochemistry*, 38:1599-1616.
- Hadj-Ali, N.E., Agrebi, R. Ghorbel-Frikha, B., Sellami-Kamoun, A., Kanoun, S., Nasri, M. (2007). Biochemical and molecular characterization of a detergent stable alkaline serine-protease from a newly isolated *Bacillus licheniformis* NH1. *Enzyme and Microbial Technology*, 40:515-523.
- Hernández, M.S., Rodríguez, M.R., Guerra, N.P., Rosés, R.P. (2006). Amylase production by *Aspergillus niger* in submerged cultivation on two wastes from food industries. *Journal of Food Engineering*, 73:93-100.
- Janssen, P.H., Peek, K., Morgan, H.W. (1994). Effect of culture conditions on the production of an extracellular proteinase by *Thermus* sp. Rt41A. *Applied Microbiology Biotechnology*. 41:400-406.
- Johnvesly, B., Naik, G.R. (2001). Studies on production of thermostable alkaline protease from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus* sp. JB-99 in a chemically defined medium. *Process Biochemistry*, 37:139-144.
- Kirk, O., Borchert, T.V., Fuglsang, C.C. (2002) Industrial enzyme applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 13:345-351.
- Konsoula, Z., Liakopoulou-Kiriakides, M. (2007). Co-production of α -amylase and β -galactosidase by *Bacillus subtilis* in complex organic substrates. *Bioresource Technology*, 98:150-157.
- Kumar, C.G., Takagi, H. (1999). Microbial alkaline proteases : From a bioindustrial viewpoint. *Biotechnology Advances*, 17:561-594.
- Liggett, R.W., Koffler, H. (1948). Corn steep liquor in microbiology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 12:297-311.
- Malhotra, R., Noorwez, S.M., Satyanarayana, T. (2000). Production and partial characterization of thermostable and calcium-independent α -amylase of an extreme thermophile *Bacillus thermooleovorans* NP54. *Letters in Applied Microbiology*, 31:378-384.
- Mehrotra, S., Pandey, P.K., Gaur, R., Darmval, N.S. (1999). The production of alkaline protease by a *Bacillus* species isolate. *Bioresource Technology*, 67: 201-203.

- Merheb, C.W., Cabral, H., Gomes, E., Da-Silva, R. (2007). Partial characterization of protease from a thermophilic fungus, *Thermoascus aurantiacus*, and its hydrolytic activity on bovine casein. *Food Chemistry*, 104:127–131.
- Miller, G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Analytical Chemistry*, 3:426-428.
- Mukherjee, A.K., Adhikari, H., Rai, S.K. (2008). Production of alkaline protease by *Bacillus subtilis* under solid-state fermentation (SSF) condition using *Imperata cylindrica* grass and potato peel as a low-cost medium: Characterization and application of enzyme in detergent formulations. *Biochemical and Engineering Journal*, 39:353-361.
- Mukherjee, A.K., Borah, M., Rai, S.K. (2009). To study the influence of different components of fermentable substrates on induction of extracellular α -amylase synthesis by *Bacillus subtilis* DM-03 in solid state fermentation and exploration of feasibility for inclusion of α -amylase in laundry detergent formulations. *Biochemical Engineering Journal*, 43:149-156.
- Mussato, S.I., Fernandes, M., Milagres, A.M.F. (2007). Enzimas: Poderosa ferramenta na indústria. *Ciência Hoje*, 41:28-33.
- Mittidieri, S., Martinelli, A.H.S., Schrank, A., Vainstein, M.H. (2006). Enzymatic detergent formulation containing amylase from *Aspergillus niger*. A comparative study with commercial detergent formulations. *Bioresource Technology*, 97:1217-1224.
- Nascimento, W. C. A. do, Martins, M. L. L. (2004). Production and properties of an extracellular protease from thermophilic *Bacillus* sp. *Brazilian Journal of Microbiology*, 35:91-96.
- Nascimento, W.C.A. do, Silva, C.R., Carvalho, R.V., Martins, M.L.L. (2007). Otimização de um meio de cultura para a produção de proteases por um *Bacillus* sp. termofílico. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 27:417-421.
- Nilegaonkar, S.S., Zambare, V.P., Kanekar, P.P., Dhakephalkar, S.S., Sarnaik, S.S. (2007). Production and partial characterization of dehairing protease from *Bacillus cereus* MCM B-326. *Bioresource Technology*, 98:1238-1245.
- Nusrah, A., Rahman, S.R. (2002). Comparative studies on the production of extracellular α -amylase by three mesophilic *Bacillus* isolates. *Bangladesh Journal of Microbiology*, 24:129-132.
- Patel, R., Dodia, M., Singh, S.P. (2005). Extracellular alkaline protease from a newly isolated haloalkaliphilic *Bacillus* sp.: Production and optimization. *Process Biochemistry*, 40:3569-3575.
- Pelizer, L.H., Pontieri, M.H., Moraes I. de O. (2007). Utilização de resíduos agroindustriais em processos biotecnológicos com perspectiva de redução do impacto ambiental. *Journal of Technology Management & Innovation*, 2:118-127.

- Peterson, G. L. (1977). A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. *Analytical Biochemistry*, 83:346-356.
- Romero, F.J., Garcia, L.A., Salas, J.A., Dias, M., Quiróz, L.M. (2001). Production, purification and partial characterization of two extracellular proteases from *Serratia macessens* grwin whey. *Process Biochemistry*, 36:507-515.
- Sajedi, R.H., Naderi-Manesh, H., Khajeh, K., Ahmadvand, R., Ranjbar, B., Asoodeh, A. Moradian, F. (2005) A Ca-independent α -amylase that is active and stable at low pH from the *Bacillus* sp. KR-8104. *Enzyme and Microbial Technology*, 36:666-671.
- Saxena, R.K., Dutt, K., Agarwal, L., Nayyar, P. (2007). A highly thermostable and alkaline amylase from *Bacillus* sp. PN-5. *Bioresource Technology*, 98:260-265.
- Schallmeyer, M., Singh, A., Ward, O.P. (2004). Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Canadian Journal Microbiology*, 50:1-17.
- Silva, C.R., Delatorre, A.B., Martins, M.L.L. (2007). Effect of the culture conditions on the production of an extracellular protease by a thermophilic *Bacillus* sp. and some properties of the enzymatic activity. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38:253-258.
- Souza, A. N., Martins, M.L.L. (2001). Isolation, properties and kinetics of growth of a thermophilic *Bacillus*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 32:271-275.
- Tanyildizi, M.S., Özer, D., Elibol, M. (2007). Production of bacterial α -amylase by *B. amyloliquefaciens* under solid substrate fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 37:294-297.
- Tari, C.; Genckal, H.; Tokatli, F. (2006). Optimization of a growth using a statistical approach for the production of an alkaline protease from a newly isolated *Bacillus* sp. L21. *Process Biochemistry*. 41:659-665.
- Van der Maarel, M.J.E.C., Van der Veen, B., Uitdehaag, J.C.M., Leemhuis, H., Dijkhuizen, L. (2002). Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. *Journal of Biotechnology*, 94:137-155.

4. RESUMO E CONCLUSÕES

As amilases e proteases movimentam cerca de 30 e 60% do mercado mundial de enzimas, respectivamente. A obtenção de ambas as enzimas em um mesmo processo fermentativo significa simplificação, economia e rapidez.

Sendo assim, este trabalho objetivou estudar a produção simultânea de α -amilase e proteases pelo *Bacillus* sp. SMIA-2 termofílico, avaliar algumas propriedades bioquímicas destas enzimas e aplicá-las como aditivos em fórmulas comerciais de detergente.

O microrganismo foi capaz de crescer e secretar α -amilase e proteases quando cultivado em meio contendo amido solúvel como fonte de carbono. A suplementação do meio de cultivo com resíduos agroindustriais, fonte de moléculas orgânicas de baixo custo, não apenas incrementou a atividade destas enzimas como tornou possível a síntese concomitante das mesmas.

O pH ótimo da α -amilase foi 9 e a enzima, incubada durante 2 horas em temperatura ambiente, foi estável entre pH 6 e 9. O pH ótimo das enzimas proteolíticas foi 9 e elas foram estáveis em todos os valores de pH testados. A temperatura ótima da α -amilase foi 90°C e ela foi estável entre 40 e 70°C. A temperatura ótima das proteases foi 70°C e elas foram estáveis entre 40 e 50°C.

As concentrações de amido solúvel e proteínas do soro de queijo que propiciaram uma maior indução de α -amilase e proteases foram 0,25% e 0,1%, respectivamente. A adição de 0,1% de água de maceração de milho aumentou a atividade de ambas as enzimas. A α -amilase foi sensível à concentração de cálcio no meio. No entanto, as proteases foram cálcio-independente. Maiores níveis de

atividade foram encontrados quando a cultura foi incubada durante 24 horas em meio de cultivo com pH inicial 7,5 a 42°C.

As enzimas foram compatíveis com todas as fórmulas comerciais de detergentes testadas. A α -amilase foi bastante estável quando incubada a 50°C durante 120 minutos com solução do detergente Campeiro[®], o que não aconteceu com as proteases. A eficiência da solução contendo enzima e detergente na remoção de sujidades foi testada através de um teste de lavagem.

Este trabalho mostrou que é possível incrementar a atividade das hidrolases estudadas através da alteração da composição do meio de cultivo e isto se tornou mais interessante ao se empregar reagentes de baixo custo. O perfil de síntese da α -amilase e das proteases foi bem semelhante, o que simplificou o processo. Além disso, as duas enzimas se mostraram passíveis de aplicação na indústria de detergentes.

5. REFERÊNCIAS

- Aftab, S., Ahmed, S., Saeed, A., Rasool, S. A. (2006). Screening, isolation and characterization of alkaline protease producing bacteria from soil. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 9:2122-2126.
- Aguilar, A. (1996). Extremophile research in the European Union: From fundamental aspects to industrial expectations. *FEMS Microbiology Reviews*, 18:89-92.
- Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walker, P. (2004). *Biologia Molecular da Célula*. 4. ed. Porto Alegre: Ed. Artmed, G. 27p.
- Andrade, C.M.M.C, Pereira Jr, N., Antranikian, G. (1999). Extremely thermophilic microorganisms and their polymer-hydrolytic enzymes. *Revista de Microbiologia*, 30:287-298.
- Anwar, A., Saleemuddin, M. (1998). Alkaline proteases: A review. *Bioresource Technology*, 64:175-183.
- Archana, A., Satyanarayana, T. (1997). Xylanase production by thermophilic *Bacillus licheniformis* A99 in solid-state fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, 21:12-17.
- Associação Brasileira das Indústrias de Milho (ABIMILHO) (2008). Disponível em: <<http://www.abimilho.com.br/riqueza.htm>>. Acesso em 10 de outubro de 2008.
- Atomi, H. (2005). Recent progress towards the application of hyperthermophiles and their enzymes. *Current Opinion in Microbiology*, 9:166-173.
- Azeredo, L.A.I., Lima, M.B. de, Coelho, R.R.R., Freire, D.M.G. (2006). A low-cost fermentation medium for thermophilic protease production by *Streptomyces* sp. 594 using feather meal and corn steep liquor. *Current Microbiology*, 53:535-539.

- Banerjee, U.C., Sani, R.K., Azmi, W., Soni, R. (1999). Thermostable alkaline protease from *Bacillus brevis* and its characterization as a laundry detergent additive. *Process Biochemistry*, 35:213–219.
- Banik, R.M., Prakash, M. (2004). Laundry detergent compatibility of the alkaline proteases from *Bacillus cereus*. *Microbiological Research*, 159:135–140.
- Bollier, M., Vons Genencor, C. (2005). Na vanguarda da biotecnologia branca Disponível em: <http://www.freedom.inf.br/artigos_tecnicos/12072005/biotecnologia_branca.asp>. Acessado dia 03 de junho de 2007.
- Brena, B.M., Pazos, C., Franco-Fraguas, L., Batista-Vieira, F. (1996). Chromatographic methods for amylases. *Journal of Chromatography*, 684: 217-237.
- Bruins, M. E., Janssen, A. E., Boom, R. M. (2001). Thermozyymes and their applications: a review of recent literature and patents. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 90:155-186.
- Buléon, A., Colonna, P., Planchot, V., Ball, S. (1998). Starch granules: structure and biosynthesis. *International Journal of Biological Macromolecules*, 23:85-112.
- Carvalho, R.V.de, Corrêa, T.L.R., Silva, J.C.M., Viana, A.P., Martins, M.L.L. (2008). Otimização das condições de cultivo para a produção de amilases pelo termofílico *Bacillus* sp. e hidrólise de amidos pela ação da enzima. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 28:1-7.
- Chary, S.J., Reddy, S.M. (1985). Starch degrading enzymes of two species of *Fusarium*. *Folia Microbiologica*, 30:452-457.
- Chellappan, S., Jasmin, C., Basheer, S.M., Elyas, K.K., Bhat, S.G., Chandrasekaran, M. (2006). Production, purification and partial characterization of a novel protease from marine *Engyodontium album* BTMFS10 under solid state fermentation. *Process Biochemistry*, 41:956-961.
- Corradini, E., Lotti, C., Medeiros, E.S., Carvalho, A.J.F., Curvelo, A.A.S., Mattoso, L.H.C. (2005). Estudo comparativo de amidos termoplásticos derivados do milho com diferentes teores de amilose. *Polímeros*, 15:268-273.
- Demirjian, D. C., Morís-Varas, F., Cassidy, C.S. (2001). Enzymes from extremophiles. *Current Opinion in Chemical Biology*, 5:144-151.
- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) (2003). Disponível em: <http://www.cpatc.embrapa.br/publicacoes_2005/doc-84.pdf>. Acessado dia 18 de novembro de 2008.
- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) (2007). Disponível em:<<http://www.cnpqgl.embrapa.br/nova/informacoes/estatisticas/producao/tabela0212.php>>. Acessado dia 12 de dezembro de 2008.

- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) (2008). Disponível em: <<http://www.cnpqi.embrapa.br/nova/informacoes/estatisticas/industria/tabela0423.php>>. Acessado dia 18 de novembro de 2008.
- Ferrer, M., Golyshina, O., Beloqui, A., Golyshin, P.N. (2007). Mining enzymes from extreme environments. *Current Opinion in Microbiology*, 10:207-214.
- Fomenkova, N. P., Nevskaya, N. A., Nikulin, A. D., Nikonov, S. V. (1998). Structural aspects of protein thermostability. *Molecular Biology*, 32:265-272.
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) (2008). Disponível em: <<http://revista.fapemig.br/materia.php?id=174>>. Acessado em 18 de novembro de 2008.
- Ghorbel, B., Sellami-Kamoun, A., Nasri, M. (2002). Stability studies of protease from *Bacillus cereus* BG1. *Enzyme and Microbial Technology*, 32:513–518.
- Gomes, E., Guez, M.A.U., Martin, N.; Silva, R. (2007). Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 30: 136-145.
- Gupta, R., Beg, Q.K., Lorenz, P. (2002). Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Applied Microbiology Biotechnology*, 59:15-32.
- Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V.K., Chauhan, B. (2003). Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. *Process Biochemistry*, 38:1599-1616.
- Hadj-Ali, N.E., Agrebi, R. Ghorbel-Frikha, B., Sellami-Kamoun, A., Kanoun, S., Nasri, M. (2007). Biochemical and molecular characterization of a detergent stable alkaline serine-protease from a newly isolated *Bacillus licheniformis* NH1. *Enzyme and Microbial Technology*, 40:515-523.
- Haki, G.D., Rakshit, S.K. (2003). Developments in industrially important thermostable enzymes: A review. *Bioresource Technology*, 89:17-34.
- Hough, D. W., Danson, M. J. (1999). Extremozymes. *Current Opinion in Chemical Biology*, 3:39-46.
- Ikram-ul-Haq, Ashraf, H., Iqbal, J., Qadeer, M.A. (2003). Production of alpha amylase by *Bacillus licheniformis* using an economical medium. *Bioresource Technology*, 87:57-61.
- International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) (2008). Disponível em <<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>>. Acesso em: 18 de maio de 2008.

- Joo, H.S., Chang, C.S. (2005). Production of protease from a new alkalophilic *Bacillus* sp. I-312 grow on soybean meal: optimization and some properties. *Process Biochemistry*, 40:1263-1270.
- Kalisz, H.M. (1988). Microbial proteinases. *Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology*, 36:1-65.
- Kandra, L. (2003). α -amylases of medical and industrial importance. *Journal of Molecular Structure*, 666-667:487-498.
- Kirk, O., Borchert, T.V., Fuglsang, C.C. (2002). Industrial enzyme applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 13:345-351.
- Klingeberg, M., Hashwa, F., Antranikian, G. (1991). Properties of extremely thermostable proteases from anaerobic hyperthermophilic bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 34:715-719.
- Konsoula, Z., Liakopoulou-Kiriakides, M. (2007). Co-production of α -amylase and β -galactosidase by *Bacillus subtilis* in complex organic substrates. *Bioresource Technology*, 98:150-157.
- Kumar, C.G., Takagi, H. (1999). Microbial alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint. *Biotechnology Advances*, 17:561-594.
- Kuriki, T., Imanaka, T. (1999). The concept of the α -amylase family: Structural similarity and common catalytic mechanism. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 5:557-565.
- Lee, D-W., Kim, H-W., Lee, K-W., Kim, B-C., Choe, E-A., Lee, H-S., Kim, D-S., Pyun, Y-R. (2001). Purification and characterization of two thermostable lipases from the gram-positive thermophilic bacterium *Bacillus thermoleovorans* ID-1. *Enzyme and Microbial Technology*, 29:363-371.
- Leopold, I., Fricke, B. (1997). Inhibition, reactivation, and determination of metal ions in Membrane metalloproteases of bacterial origin using high-performance liquid chromatography coupled on-line with inductively coupled plasma mass spectrometry. *Analytical Biochemistry*, 252:277-285.
- Liggett, R.W., Koffler, H. (1948). Corn steep liquor in microbiology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 12: 297-311.
- Lima, U.A., Aquarone, E., Borzani, W., Schmidell, W. (2001). *Biotechnologia Industrial*. 1. ed. São Paulo: Ed. Edgar Buchner LTDA. 406p.
- Mabrouk, S., Hashem, A.M., El-Shayeb, N.M.A. Ismail, A.S., Abdel-Fattah, A.F. (1999). Optimization of alkaline protease productivity by *Bacillus licheniformis* ATCC 21415. *Bioresource Technology*, 69:155-159.
- Mehrotra, S., Pandey, P.K., Gaur, R., Darmwal, N.S. (1999). The production of alkaline alkaline protease by *Bacillus* species isolate. *Bioresource Technology*. 67:201-203.

- MacElroy, R.D. (1974). Some comments on the evolution of extremophiles. *Biosystems*, 6:74-75.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J., Brock, T.D. (1996). *Biology of Microorganisms*: 8. ed. New Jersey: Ed. Prentice Hall, 986p.
- Marchal, L.M., Van de Laar, A.M.J., Goetheer, E., Schimmelpennink, E.B., Bergsma, J., Beeftink, H.H., Tramper, J. (1999). Effect of temperature on saccharide composition obtained after α - amylolysis of starch. *Biotechnology and Bioengineering*, 63:344-355.
- Matos, A.T. (2005). Tratamento de resíduos agroindustriais. Disponível em: <<http://www.ufv.br/dec/simea/apresentações/CursoMatosFEAM2005.pdf>>. Acessado dia 17 de dezembro de 2008.
- Merheb, C.W., Cabral, H., Gomes, E., Da-Silva, R.(2007). Partial characterization of protease from a thermophilic fungus, *Thermoascus aurantiacus*, and its hydrolytic activity on bovine casein. *Food Chemistry*, 104:127–131.
- Mitidieri, S., Martinelli, A.H.S., Camassola, S., Menguer, P.K., Schrank, A., Vainstein, M.H. (2002). Detergentes biológicos biodegradáveis: Avaliação das formulações do mercado. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, 26:56-60.
- Mussato, S.I., Fernandes, M., Milagres, A.M.F. (2007). Enzimas: Poderosa ferramenta na indústria. *Ciência Hoje*, 41:28-33.
- Myers, A.M., Morell, M.K., James, M.G., Ball, S.G. (2000). Recent progress toward understanding biosynthesis of the amylopectin crystal. *Plant Physiology*, 122: 989-997.
- Nigam, P., Singh, D. (1995). Enzyme involved and microbial systems in starch processing. *Enzyme and Microbial Technology*, 32:271-275.
- Nusrah, A., Rahman, S.R. (2002). Comparative studies on the production of extracellular α -amylase by three mesophilic *Bacillus* isolates. *Bangladesh Journal of Microbiology*, 24: 129-132.
- Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) (2005). Disponível em: <<http://www.fao.org.br>>. Acessado dia 12 de dezembro de 2008.
- Oliveira, A. N., Oliveira, L. A., Andrade, J.S., Júnior, A.F.C. (2006). Enzimas hidrolíticas extracelulares de isolados de rizóbia nativos da Amazônia Central, Amazonas, Brasil. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 26:853-860.
- Podar, M., Reysenbach, A-L. (2006). New opportunities revealed by biotechnological explorations of extremophiles. *Current Opinion in Biotechnology*, 17:250-255.

- Prakasham, R.S., Rao, C. S., Sarma, P. N. (2006). Green gram husk - an inexpensive substrate for alkaline protease production by *Bacillus* sp. in solid-state fermentation. *Bioresource Technology*, 97:1449-1454.
- Rao, M. B., Tanksale, A. M., Ghatge, M.S., Deshpande, V.V. (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62:597-635.
- Ray, R.R., Jana, D.C., Nanda, G. (1995). Immobilization of β -amylase from *Bacillus megaterium* B₆ into gelatin film by cross-linking. *Journal of Applied Microbiology*, 79:157-162.
- Reddy, N.S., Nimmagadda, A., Rao, K.R.S.S. (2003). An overview of the microbial α -amylase family. *African Journal of Biotechnology*, 2:645-648.
- Romero, F.J., Garcia, L.A., Salas, J.A., Dias, M., Quiróz, L.M. (2001). Production, purification and partial characterization of two extracellular proteases from *Serratia marcescens* grwin whey. *Process Biochemistry*, 36:507-515.
- Saeki, H., Ozaki, H., Kobayashi, T., Ito, S. (2007). Detergent alkaline proteases: Enzymatic properties, genes, and crystal structures. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 103:501-508.
- Santos, H., Lamosa, P., Costa, M. S. (2001). Extremófilos: microrganismos a prova de agressões ambientais extremas. *Boletim de Microbiologia*, 69:2-10.
- Sarikaya, E., Higasa, T., Adachi, M., Mikami, B. (2000). Comparison of degradation abilities of α - and β -amylases on raw starch granules. *Process Biochemistry*, 35:711-715.
- Schallmeyer, M., Singh, A., Ward, O.P. (2004). Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Canadian Journal Microbiology*, 50:1-17.
- Sellami-Kamoun, A., Haddar, A., Ali, N. E-H., Ghorbel-Frikha, B., Kanoun, S., Nasri, M. (2008). Stability of thermostable alkaline protease from *Bacillus licheniformis* RP1 in commercial solid laundry detergent formulations. *Microbiological Research*, 163:299-306.
- Smithers, G.W., Ballard, F.J., Copeland, A.D., Silva, K.J., Dionysius D.A., Francis, G.L., Goddard, C., Grieve, P.A., Mcintosh, G.H. Mitchell, I.R., Pearce, R. J., Regester, O.G. (1996) Symposium: Advances in dairy foods processing and engineering. *Journal of Dairy Science*, 79:1454-1459.
- Sookkheo, B., Sinchaikul, S., Phutrakul, S., Chen, S.T. (2000). Purification and characterization of the highly thermostable proteases from *Bacillus stearothermophilus* TLS33. *Protein Expression and Purification*, 20:142-151.
- Tanyildizi, M.S., Özer, D., Elibol, M. (2007). Production of bacterial α -amylase by *B. amyloliquefaciens* under solid substrate fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 37:294-297.

- Tehei, M., Zaccai, G. (2005). Adaptation to extreme environments: Macromolecular dynamics in complex systems. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1724:404-410.
- Tolner, B., Poolman, B., Konings, Y.N. (1997). Adaptation of microorganisms and their transport systems to high temperatures. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 3:423-428.
- Universidade Norte do Paraná (UNOPAR) (2005). Disponível em: <http://www.unopar.br/portugues/revista2005/caderno_tecnologia01.htm>. Acessado dia 10 de julho de 2008.
- Vallee, B.L., Stein, E.A., Summerwell, W.N., Fisher, E.H. (1959). Metal content of α -amylases of various origins. *Journal of Biological Chemistry*, 234: 2901-2929.
- Van Den Burg, B. (2003). Extremophiles as a source for novel enzymes. *Current Opinion in Microbiology*, 6: 213–218.
- Van der Maarel, M.J.E.C., Van der Veen, B., Uitdehaag, J.C.M., Leemhuis, H., Dijkhuizen, L. (2002). Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. *Journal of Biotechnology*, 94: 137-155.
- Vermelho, A.B. & Branquinha, M.H. (2005). Proteases de microrganismos. Disponível em: <<http://acd.ufrj.br/proteases/ProteaseApres.htm>>. Acesso dia 15 de janeiro de 2007.
- Vihinen, M., Mantsala, P. (1989). Microbial amyolytic enzymes. *Critical Reviews Biochemistry and Molecular Biology*, 24:329-418.
- Villas-Bôas, S.G., Esposito, E. (2000). Bioconversão do bagaço de maçã. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, 14:38-42.