

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

Parecer
Este exemplar corresponde a redação final da
tese defendida por Terezinha de Jesus Garcia
Salva e aprovada pela Comissão Julgadora
em 07.08.90.
Campinas, 07 de agosto de 1990.

J. Moraes

α -AMILASE DE BACILLUS SUBTILIS ATCC 601B:
PRODUÇÃO E PROPRIEDADES DA ENZIMA NÃO
PURIFICADA

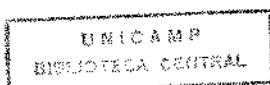
Terezinha de Jesus Garcia Salva

Orientador

Profa. Iracema de Oliveira Moraes †

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Uni-
versidade Estadual de Campinas, para a obtenção do título de
Doutor em Engenharia de Alimentos.

CAMPINAS - 1990

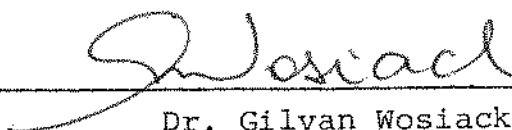


BANCA EXAMINADORA



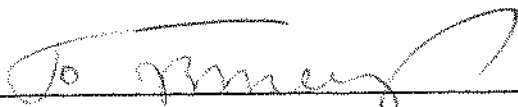
Dra. Iracema de Oliveira Moraes
(Orientadora)

Dr. Carlos Osamu Hokka
(Membro)

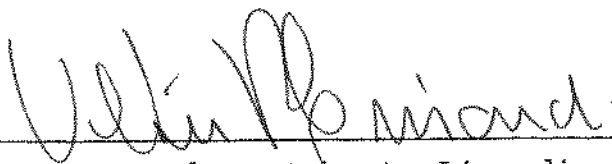


Dr. Gilvan Wosiack
(Membro)

Dr. Ranulfo Monte Alegre
(Membro)



Dr. Tobias José Barreto de Menezes
(Membro)



Dr. Valter Roberto Linardi
(Membro)



Dr. Yong Kun Park
(Membro)

Dedico esse trabalho com
humildade a meus pais, ao
Marco e aos meus grandes
amores José e Livia.

AGRADECIMENTOS

- À Profa. Dra. Iracema de Oliveira Moraes pela orientação desse trabalho, pelo carinho e compreensão demonstrados.
- À diretoria do Instituto de Tecnologia de Alimentos pelas facilidades concedidas para a execução desse trabalho.
- À diretoria da Faculdade de Engenharia de Alimentos pela oportunidade de desenvolver esse trabalho.
- À Bel, ao Chico e à Fátima pela amizade e colaboração no início do trabalho experimental.
- Aos amigos Fernanda, Forster, Eni, Geraldo, Alexandre e Gasparetto pelo apoio nos momentos difíceis.
- Aos amigos do laboratório da Seção de Fermentações Industriais Dr. Papini, Maria José, Sr. Jura que sempre dispostos me ajudaram enormemente.
- Às amigas Regina, Elzinha e Maggi pela convivência agradável e pelo grande apoio.
- Aos bibliotecários Antonio, Creusa e Antonieta pela gentileza e auxílios prestados na aquisição de revistas e livros.
- Às secretárias da pós-graduação Telma e Cristiane pela dedicação.
- A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP pelo auxílio concedido.

- Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, pelo auxílio concedido.
- À Associação Brasileira das Indústrias de Alimentação, pelas cópias xerográficas.

ÍNDICE

	PÁGINA
RESUMO.....	xvi
SUMMARY.....	xviii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1. Biossíntese da α -amilase.....	4
2.2. Características físicas e químicas das α -amilases.....	14
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
3.1. Microrganismo.....	21
3.2. Semente ou pré-fermentação.....	21
3.3. Produção da enzima.....	22
3.3.a Efeito da concentração e da fonte de carbono sobre a produção de α -amilase.....	22
3.3.b Efeito da concentração inicial de peptona sobre a produção de α -amilase.....	24
3.3.c Efeito da concentração inicial de extrato de levedura sobre a produção de α -amilase.....	24
3.3.d Efeito da temperatura de incubação sobre a produção de α -amilase.....	25
3.3.e Efeito do pH inicial do meio de cultura sobre a produção de α -amilase.....	25
3.3.f Perfil da síntese de α -amilase.....	26
3.4. Concentração celular.....	26
3.5. Concentração de esporos.....	27
3.6. Concentração de glicose.....	27
3.7. Atividade enzimática.....	27
3.7.a Atividade dextrinizante.....	27
3.7.b Atividade sacarificante.....	28

	PÁGINA
3.8. Propriedades da α -amilase bruta.....	29
3.8.a Estabilidade térmica.....	30
3.8.b Efeito da temperatura sobre a atividade da α -amilase.....	32
3.8.c Efeito do pH sobre a atividade enzimática.....	32
3.8.d Caráter α ou β amilolítico da enzima.....	32
3.8.e Ação hidrolítica da α -amilase sobre o amido...	33
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
4.1. Efeito da concentração e da fonte de carbono sobre a síntese de α -amilase por <i>Bacillus</i> <i>subtilis</i> ATCC 601B.....	35
4.1.a Efeito da concentração de glicose.....	35
4.1.b Efeito da concentração de amido solúvel.....	48
4.1.c Efeito da concentração de dextrina.....	57
4.1.d Efeito da concentração de lactose.....	64
4.2. Perfil da síntese de α -amilase por <i>Bacillus</i> <i>subtilis</i> ATCC 601B.....	74
4.3. Efeito da concentração de peptona sobre a síntese de α -amilase.....	77
4.4. Efeito da concentração inicial de extrato de levedura sobre a síntese de α -amilase.....	81
4.5. Efeito da temperatura de incubação sobre a síntese de α -amilase.....	90
4.6. Efeito do pH inicial do meio de cultura sobre produção de α -amilase.....	94
4.7. Estabilidade térmica da α -amilase bruta.....	102
4.8. Efeito da temperatura sobre a atividade da α -amilase bruta.....	107
4.9. Efeito do pH sobre a atividade da α -amilase bruta.....	107

	PÁGINA
4.10. Caráter α ou β amilolítico da enzima.....	110
4.11. Ação hidrolítica da α -amilase sobre amido.....	110
5. CONCLUSÕES.....	114
6. BIBLIOGRAFIA.....	118

ÍNDICE DE QUADROS

	PÁGINA
QUADRO I. Algumas propriedades de α -amilases produzidas por bactérias do gênero <i>Bacillus</i>	20
QUADRO II. Efeito da concentração inicial de glicose no meio de cultura sobre a produtividade de α -amilase produzida por <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 601B.....	44
QUADRO III. Efeito da concentração inicial de amido solúvel no meio de cultura sobre a produtividade de α -amilase produzida por <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 601B.....	54
QUADRO IV. Efeito da concentração inicial de dextrina no meio de cultura sobre a produtividade de α -amilase produzida por <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 601B.....	62
QUADRO V. Efeito da concentração inicial de lactose no meio de cultura sobre a produtividade de α -amilase produzida por <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 601B.....	67

ÍNDICE DE FIGURAS

	PÁGINA
FIGURA 1. Variação do pH, da concentração celular e da concentração enzimática com o tempo de fermentação em meio de cultura básico <u>con</u> tendo glicose 0,05g/l, peptona 10,0g/l e extrato de levedura 5,0g/l.....	36
FIGURA 2. Variação do pH, da concentração celular e da concentração enzimática com o tempo de fermentação em meio de cultura básico <u>con</u> tendo glicose 0,1g/l, peptona 10,0g/l e extrato de levedura 5,0g/l.....	36
FIGURA 3. Variação do pH, da concentração celular e da concentração enzimática com o tempo de fermentação em meio de cultura básico <u>con</u> tendo glicose 0,2g/l, peptona 10,0g/l e extrato de levedura 5,0g/l.....	37
FIGURA 4. Variação do pH, da concentração celular e da concentração enzimática com o tempo de fermentação em meio de cultura básico <u>con</u> tendo glicose 0,5g/l, peptona 10,0g/l e extrato de levedura 5,0g/l.....	37
FIGURA 5. Variação do pH, da concentração celular e da concentração enzimática com o tempo de fermentação em meio de cultura básico <u>con</u> tendo glicose 0,75g/l, peptona 10,0g/l e extrato de levedura 5,0g/l.....	38
FIGURA 6. Variação do pH, da concentração celular e da concentração enzimática com o tempo de fermentação em meio de cultura básico <u>con</u> tendo glicose 1,0g/l, peptona 10,0g/l e extrato de levedura 5,0g/l.....	38

FIGURA 7.	Variação do pH, da concentração celular e da concentração enzimática com o tempo de fermentação em meio de cultura básico <u>con</u> tendo glicose 10,0g/l, peptona 10,0g/l e extrato de levedura 5,0g/l.....	39
FIGURA 8.	Variação do pH, da concentração celular e da concentração enzimática com o tempo de fermentação em meio de cultura básico <u>con</u> tendo glicose 20,0g/l, peptona 10,0g/l e extrato de levedura 5,0g/l.....	39
FIGURA 9.	Variação do pH, da concentração celular e da concentração enzimática com o tempo de fermentação em meio de cultura básico <u>con</u> tendo glicose 30,0g/l, peptona 10,0g/l e extrato de levedura 5,0g/l.....	40
FIGURA 10.	Variação do pH, da concentração celular e da concentração enzimática com o tempo de fermentação em meio de cultura básico <u>con</u> tendo glicose 40,0g/l, peptona 10,0g/l e extrato de levedura 5,0g/l.....	40
FIGURA 11.	Variação do pH, da concentração celular e da concentração enzimática com o tempo de fermentação em meio de cultura básico <u>con</u> tendo glicose 50,0g/l, peptona 10,0g/l e extrato de levedura 5,0g/l.....	41
FIGURA 12.	Variação da concentração enzimática máxi <u>ma</u> em função da concentração celular máxi <u>ma</u> atingida em meios de cultura com dife <u>re</u> ntes concentrações iniciais de glicose...	46
FIGURA 13.	Variação da concentração enzimática máxi <u>ma</u> em função da concentração celular máxi <u>ma</u> atingida em diferentes meios de cultu <u>ra</u> com diferentes concentrações iniciais de glicose.....	46

FIGURA 14.	Variação do pH, da concentração celular e da concentração enzimática com o tempo de fermentação em meio de cultura básico con <u>tendo</u> amido solúvel 0,5g/l, peptona 10,0g/l e extrato de levedura 5,0g/l.....	49
FIGURA 15.	Variação do pH, da concentração celular e da concentração enzimática com o tempo de fermentação em meio de cultura básico con <u>tendo</u> amido solúvel 1,0g/l, peptona 10,0g/l e extrato de levedura 5,0g/l.....	49
FIGURA 16.	Variação do pH, da concentração celular e da concentração enzimática com o tempo de fermentação em meio de cultura básico con <u>tendo</u> amido solúvel 1,5g/l, peptona 10,0g/l e extrato de levedura 5,0g/l.....	50
FIGURA 17.	Variação do pH, da concentração celular e da concentração enzimática com o tempo de fermentação em meio de cultura básico con <u>tendo</u> amido solúvel 2,0g/l, peptona 10,0g/l e extrato de levedura 5,0g/l.....	50
FIGURA 18.	Variação do pH, da concentração celular e da concentração enzimática com o tempo de fermentação em meio de cultura básico con <u>tendo</u> amido solúvel 5,0g/l, peptona 10,0g/l e extrato de levedura 5,0g/l.....	51
FIGURA 19.	Variação do pH, da concentração celular e da concentração enzimática com o tempo de fermentação em meio de cultura básico con <u>tendo</u> amido solúvel 10,0g/l, peptona 10,0g/l e extrato de levedura 5,0g/l.....	51
FIGURA 20.	Variação do pH, da concentração celular e da concentração enzimática com o tempo de fermentação em meio de cultura básico con <u>tendo</u> amido solúvel 20,0g/l, peptona 10,0g/l e extrato de levedura 5,0g/l.....	52

FIGURA 21.	Variação do pH, da concentração celular e da concentração enzimática com o tempo de fermentação em meio de cultura básico con- tendo amido solúvel 30,0g/l, peptona 10,0g/l e extrato de levedura 5,0g/l.....	52
FIGURA 22.	Variação da concentração enzimática máxi- ma com a concentração celular máxima atin- gida em meios de cultura com diferentes concentrações de amido solúvel.....	56
FIGURA 23.	Variação do pH, da concentração celular e da concentração enzimática com o tempo de fermentação em meio de cultura básico con- tendo dextrina 1,0g/l, peptona 10,0g/l e extrato de levedura 5,0g/l.....	58
FIGURA 24.	Variação do pH, da concentração celular e da concentração enzimática com o tempo de fermentação em meio de cultura básico con- tendo dextrina 1,5g/l, peptona 10,0g/l e extrato de levedura 5,0g/l.....	58
FIGURA 25.	Variação do pH, da concentração celular e da concentração enzimática com o tempo de fermentação em meio de cultura básico con- tendo dextrina 2,0g/l, peptona 10,0g/l e extrato de levedura 5,0g/l.....	59
FIGURA 26.	Variação do pH, da concentração celular e da concentração enzimática com o tempo de fermentação em meio de cultura básico con- tendo dextrina 4,0g/l, peptona 10,0g/l e extrato de levedura 5,0g/l.....	59
FIGURA 27.	Variação do pH, da concentração celular e da concentração enzimática com o tempo de fermentação em meio de cultura básico con- tendo dextrina 10,0g/l, peptona 10,0g/l e extrato de levedura 5,0g/l.....	60

FIGURA 28.	Variação do pH, da concentração celular e da concentração enzimática com o tempo de fermentação em meio de cultura básico <u>con</u> tendo dextrina 20,0g/l, peptona 10,0g/l e extrato de levedura 5,0g/l.....	60
FIGURA 29.	Variação do pH, da concentração celular e da concentração enzimática com o tempo de fermentação em meio de cultura básico <u>con</u> tendo dextrina 30,0g/l, peptona 10,0g/l e extrato de levedura 5,0g/l.....	61
FIGURA 30.	Variação da concentração enzimática máxi <u>ma</u> em função da concentração celular máxi <u>ma</u> atingida em meio de cultura com dife <u>ren</u> tes concentrações de dextrina.....	61
FIGURA 31.	Variação do pH, da concentração celular e da concentração enzimática com o tempo de fermentação em meio de cultura básico <u>con</u> tendo lactose 5,0g/l, peptona 10,0g/l e extrato de levedura 5,0g/l.....	65
FIGURA 32.	Variação do pH, da concentração <u>cel</u> ular e da concentração enzimática em meio de cul <u>tu</u> ra básico contendo lactose 10,0g/l, pep <u>tona</u> 10,0g/l e extrato de levedura 5,0g/l....	65
FIGURA 33.	Variação do pH, da concentração <u>cel</u> ular e da concentração enzimática com o tempo de fermentação em meio de cultura básico <u>con</u> tendo lactose 20,0g/l, peptona 10,0g/l e extrato de levedura 5,0g/l.....	66
FIGURA 34.	Variação do pH, da concentração celular e da concentração enzimática com o tempo de fermentação em meio de cultura básico <u>con</u> tendo lactose 30,0g/l, peptona 10,0g/l e extrato de levedura 5,0g/l.....	66

- FIGURA 35. Variação da concentração enzimática máxima em função da concentração celular máxima atingida em meios de cultura com dife-
rentes concentrações de lactose..... 68
- FIGURA 36. Variação da concentração enzimática máxima em função da concentração inicial dos
diferentes carboidratos empregados no meio
de cultura básico contendo peptona 10g/l
e extrato de levedura 5,0g/l..... 70
- FIGURA 37. Variação da atividade enzimática especí-
fica global em função da concentração iní-
cial dos diferentes carboidratos emprega-
dos no meio de cultura básico contendo pep-
tona 10g/l e extrato de levedura 5,0g/l.... 71
- FIGURA 38. Variação da produtividade global em fun-
ção da concentração inicial dos diferen-
tes carboidratos empregados no meio de
cultura básico contendo peptona 10g/l e
extrato de levedura 5,0g/l..... 72
- FIGURA 39. Perfil da síntese de α -amilase. Fermenta-
ção realizada em meio de cultura básico
contendo glicose 10,0g/l, peptona 10,0g/l
e extrato de levedura 5,0g/l..... 76
- FIGURA 40. Variação do pH, da concentração celular e
da concentração enzimática com o tempo de
fermentação em meio de cultura básico isen-
to de peptona, contendo dextrina 4,0g/l e
extrato de levedura 5,0g/l..... 78
- FIGURA 41. Variação do pH, da concentração celular e
da concentração enzimática com o tempo de
fermentação em meio de cultura básico con-
tendo peptona 2,5g/l, dextrina 4,0g/l e
extrato de levedura 5,0g/l..... 78

FIGURA 42.	Variação do pH, da concentração celular e da concentração enzimática com o tempo de fermentação em meio de cultura básico <u>con</u> tendo peptona 5,0g/l, dextrina 4,0g/l e extrato de levedura 5,0g/l.....	79
FIGURA 43.	Variação do pH, da concentração celular e da concentração enzimática com o tempo de fermentação em meio de cultura básico <u>con</u> tendo peptona 10,0g/l, dextrina 4,0g/l e extrato de levedura 5,0g/l.....	79
FIGURA 44.	Variação do pH, da concentração celular e da concentração enzimática com o tempo de fermentação em meio de cultura básico <u>con</u> tendo peptona 12,5g/l, dextrina 4,0g/l e extrato de levedura 5,0g/l.....	80
FIGURA 45.	Variação da concentração enzimática máx <u>i</u> ma em função da concentração inicial de peptona no meio de cultura.....	80
FIGURA 46.	Variação da concentração enzimática máx <u>i</u> ma em função da concentração celular máxima atingida em meios de cultura com diferentes concentrações iniciais de pep <u>tona</u>	82
FIGURA 47.	Variação da produtividade global em funç <u>ão</u> da concentração inicial de peptona no meio de cultura.....	82
FIGURA 48.	Variação da atividade enzimática especí <u>fi</u> ca global com a concentração inicial de peptona.....	83
FIGURA 49.	Variação do pH, da concentração celular e da concentração enzimática com o tempo de fermentação em meio de cultura básico <u>con</u> tendo dextrina 4,0g/l, peptona 10,0g/l e isento de extrato de levedura.....	85

FIGURA 50.	Variação do pH, da concentração celular e da concentração enzimática com o tempo de fermentação em meio de cultura básico con <u>tendo</u> dextrina 4,0g/l, peptona 10,0g/l e extrato de levedura 2,5g/l.....	85
FIGURA 51.	Variação do pH, da concentração celular e da concentração enzimática com o tempo de fermentação em meio de cultura básico con <u>tendo</u> extrato de levedura 5,0g/l, dextri <u>na</u> 4,0g/l e peptona 10,0g/l.....	86
FIGURA 52.	Variação do pH, da concentração celular e da concentração enzimática com o tempo de fermentação em meio de cultura básico com extrato de levedura 10,0g/l, dextrina 4,0g/l e peptona 10g/l.....	86
FIGURA 53.	Variação da concentração enzimática máxi <u>ma</u> em função da concentração inicial de extrato de levedura no meio de cultura.....	87
FIGURA 54.	Variação da concentração enzimática máxi <u>ma</u> em função da concentração celular máxi <u>ma</u> atingida em meios de cultura com dife <u>rentes</u> concentrações iniciais de extrato de levedura.....	87
FIGURA 55.	Variação da atividade enzimática específi <u>ca</u> global em função da concentração ini <u>cial</u> de extrato de levedura no meio de cultura.....	89
FIGURA 56.	Variação da produtividade enzimática glo <u>bal</u> em função da concentração inicial de extrato de levedura no meio de cultura.....	89

FIGURA 57.	Variação do pH, da concentração celular e da concentração enzimática com o tempo de fermentação a 30°C. Fermentação realizada em meio de cultura básico contendo dextrina 4,0g/l, peptona 10,0g/l e extrato de levedura 5,0g/l.....	91
FIGURA 58.	Variação do pH, da concentração celular e da concentração enzimática com o tempo de fermentação a 33°C. Fermentação realizada em meio de cultura básico contendo dextrina 4,0g/l, peptona 10,0g/l e extrato de levedura 5,0g/l.....	91
FIGURA 59.	Variação do pH, da concentração celular e da concentração enzimática com o tempo de fermentação a 37°C. Fermentação realizada em meio de cultura básico contendo dextrina 4,0g/l, peptona 10,0g/l e extrato de levedura 5,0g/l.....	92
FIGURA 60.	Variação do pH, da concentração celular e da concentração enzimática com o tempo de fermentação a 40°C. Fermentação realizada em meio de cultura básico contendo dextrina 4,0g/l, peptona 10,0g/l e extrato de levedura 5,0g/l.....	92
FIGURA 61.	Variação da concentração enzimática máxima em função da temperatura de incubação...	93
FIGURA 62.	Variação da atividade enzimática específica global em função da temperatura de incubação	93
FIGURA 63.	Variação da produtividade global em função da temperatura de incubação.....	95

- FIGURA 64. Variação do pH, da concentração celular e da concentração enzimática com o tempo de fermentação em meio de cultura básico contendo dextrina 4,0g/l, peptona 10,0g/l e extrato de levedura 5,0g/l com pH ajusta-do a 6,0 antes da esterilização..... 97
- FIGURA 65. Variação do pH, da concentração celular e da concentração enzimática com o tempo de fermentação em meio de cultura básico contendo dextrina 4,0g/l, peptona 10,0g/l e extrato de levedura 5,0g/l com pH ajusta-do a 6,5 antes da esterilização..... 97
- FIGURA 66. Variação do pH, da concentração celular e da concentração enzimática com o tempo de fermentação em meio de cultura básico contendo dextrina 4g/l, peptona 10,0g/l e extrato de levedura 5,0g/l com pH ajusta-do a 7,0 antes da esterilização..... 98
- FIGURA 67. Variação do pH, da concentração celular e da concentração enzimática com o tempo de fermentação em meio de cultura básico contendo dextrina 4,0g/l, peptona 10,0g/l e extrato de levedura 5,0g/l com pH ajusta-do a 8,0 antes da esterilização..... 98
- FIGURA 68. Variação do pH, da concentração celular e da concentração enzimática com o tempo de fermentação em meio de cultura básico contendo dextrina 4,0g/l, peptona 10,0g/l e extrato de levedura 5,0g/l com pH ajusta-do a 8,5 antes da esterilização..... 99
- FIGURA 69. Variação do pH, da concentração celular e da concentração enzimática com o tempo de fermentação em meio de cultura básico contendo dextrina 4,0g/l, peptona 10,0g/l e extrato de levedura 5,0g/l com pH ajusta-do a 9,0 antes da esterilização..... 99

PÁGINA

FIGURA 70.	Variação da concentração enzimática máxima em função do pH inicial do meio de cultura.....	100
FIGURA 71.	Variação da atividade enzimática específica global em função do pH inicial do meio de cultura.....	100
FIGURA 72.	Variação da produtividade global em função do pH inicial do meio de cultura.....	101
FIGURA 73.	Estabilidade térmica da α -amilase.....	103
FIGURA 74.	Estabilidade térmica da α -amilase.....	104
FIGURA 75.	Efeito da temperatura sobre a atividade da α -amilase.....	108
FIGURA 76.	Efeito do pH sobre a atividade da α -amilase.....	109
FIGURA 77.	Rotação ótica da solução de amido e do hidrolisado de amido pela α -amilase antes e depois da adição de alcali.....	111
FIGURA 78.	Análise cromatográfica dos produtos de hidrólise do amido pela α -amilase de <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 601B.....	112

RESUMO

Foram estudados os efeitos de diferentes concentrações de glicose, amido solúvel, dextrina, lactose, peptona e extrato de levedura sobre a síntese de α -amilase por *Bacillus subtilis* ATCC 601B por processo em batelada, em meio de cultura básico composto de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KCl , K_2HPO_4 e CaCl_2 . Foram estudados os efeitos do pH inicial do meio de cultura e da temperatura de incubação sobre a produção da enzima, e o perfil da síntese enzimática apenas no meio de cultura contendo glicose como fonte de carbono.

Os resultados foram discutidos relacionando o crescimento microbiano com a síntese da enzima. Foi observado que a maior produção de α -amilase ocorreu nos meios de cultura contendo glicose a 0,1g/l e 30,0g/l ou dextrina a 10,0g/l. As atividades enzimáticas específicas globais ($E_{\text{max}}/X_{\text{max}}$) mostraram que esses resultados se devem a um maior estímulo do crescimento celular em meio de cultura contendo glicose e a um maior estímulo da síntese enzimática em meio de cultura contendo dextrina.

Os quatro carboidratos inicialmente adicionados ao meio de cultura causaram inibição catabólica da síntese da enzima. O aumento das atividades enzimáticas específicas globais, observadas em determinadas faixas de concentração inicial dos açúcares, indicam que durante o processo fermentativo há estímulo da síntese de α -amilase devido à formação de metabólitos ou de produtos de degradação do carboidrato. Para a faixa de concentração compreendida entre 1,0g/l e 20,0g/l o estímulo da síntese enzimática foi mais acentuada em meio de cultura contendo dextrina, seguida de amido solúvel, lactose e glicose.

Os resultados obtidos para a produtividade global em 72 horas de fermentação também revelaram que a dextrina é a fonte de carbono mais adequada para a produção de α -amilase.

Foi observado que as concentrações de peptona e de extrato de levedura mais adequadas para a produção de α -amilase são 10,0g/l e 5,0g/l respectivamente. Os resultados obtidos para as atividades enzimáticas específicas globais mostraram, no entanto, que a peptona afeta basicamente o desenvolvimento microbiano enquanto que o extrato de levedura afeta diretamente a síntese da enzima.

Das condições estudadas, a maior produção de enzima é obtida quando o pH inicial do meio de cultura é ajustado a 7,0 e a temperatura de incubação é 37°C. Nessas condições foram obtidas as maiores atividades enzimáticas específicas globais e produtividades globais.

O perfil da síntese da α -amilase revelou que houve produção da enzima mesmo na fase logarítmica de crescimento, ocorrendo, porém, com maior intensidade na fase estacionária e de lise celular.

Estudos complementares mostraram que a enzima é uma α -amilase com pH ótimo ao redor de 6,4 em solução tampão ácido cítrico - fosfato de sódio, e com temperatura ótima ao redor de 50°C. Além disso, foi observado que ela mantém 100% da sua atividade inicial em solução não dialisada após 25 horas de aquecimento a 37°C. A enzima se mostrou pouco estável a 80°C, tendo sido totalmente inativada após 10 minutos de aquecimento a essa temperatura. O cálcio e o amido estabilizaram a enzima acentuadamente e a sua ação hidrolítica sobre o amido produz polímeros de glicose com duas ou mais unidades do açúcar.

SUMMARY

It was studied the effect of concentrations of glucose, soluble starch, dextrin, lactose, peptone and yeast extract in a basic medium containing $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KCl , K_2HPO_4 and CaCl_2 on the α -amylase production by *Bacillus subtilis* ATCC 601B in batch process. The effect of medium pH and of the incubation temperature were also studied. It was investigated the profile of enzyme synthesis in a medium containing glucose as carbon source.

The cell growth and α -amylase synthesis relationship were analysed. It was shown that higher enzyme production was attained when glucose 0,1g/l and 30,0g/l or dextrin 10,0g/l were used as carbon source. The overall specific enzyme activity ($E_{\text{max}}/X_{\text{max}}$) showed that while the medium containing glucose stimulates the microbial growth, the medium containing dextrin stimulates the enzyme synthesis mainly.

All four carbohydrates used in the medium caused catabolite repression of the enzyme synthesis. The overall specific enzyme activities in some carbohydrate concentrations showed that there was an estimation of the enzyme synthesis during the fermentative process due to metabolites or degradation products formation. In the range of 1,0g/l to 20,0g/l of carbohydrate concentrations this estimation was higher in dextrin containing medium followed by soluble starch, lactose and glucose.

The overall productivity in 72 hours of fermentation also revealed that dextrin is the best carbon source for α -amylase production by the microbial strain.

It was found that the best peptone and yeast extract concentrations for enzyme production are 10,0g/l and 5,0g/l,

respectively. The overall specific enzyme activities showed, however, that peptone affects the microbial growth, while yeast extract affects the enzyme synthesis directly.

Among the conditions studied, the best one for α -amylase production were medium pH 7,0 and incubation temperature 37°C. At that conditions it were obtained higher overall specific enzyme activity and overall productivity.

The profile of enzyme synthesis showed that the enzyme is synthesised yet in the logarithmic growth phase, but more intensively during stationary phase and with cell lysis.

Further studies showed that the enzyme was an α -amylase with optimal pH around 6,4 and optimal temperature around 50°C in citric acid - sodium phosphate buffer. It was observed that 100% of initial enzyme activity was maintained, in non-dialysed solution, after 25 hours at 37°C. The enzyme stability was lower at 80°C. At this temperature the enzyme lost completely its activity after 10 minutes. Calcium and starch stabilized the enzyme and the hydrolyses of starch produces glucose polymers with two or more units.

1. INTRODUÇÃO

As α -amilases (α -1,4-glucan 4-glucanohidrolases, E.C. 3.2.1.1.) são endoenzimas produzidas por bactérias, fungos, leveduras, animais e vegetais, que têm ampla aplicação nas indústrias têxteis, de alimentos, de papel e de couro, entre outras. Nas indústrias de alimentos destacam-se por seu emprego na panificação, na produção de xarope de glicose, de xarope de chocolate, de alimentos infantis e de sucos de frutas.

Consideradas enzimas termorresistentes, o que possibilita a sua utilização em processos realizados a temperaturas elevadas, as α -amilases bacterianas são produzidas pela maioria dos microrganismos do gênero *Bacillus*. Há citação na literatura de que mais de 60% das linhagens de *Bacillus* listadas na 8.^a edição do "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (1975)" são produtoras de α -amilase (47). *Bacillus subtilis*, *Bacillus macerans*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus stearothermophilus* e *Bacillus*

subtilis var. *natto*, dentre outras, são linhagens produtoras da enzima.

Conquanto seja uma enzima bastante estudada em muitos aspectos, ainda permanecem obscuros os mecanismos de controle da síntese e de secreção das α -amilases bacterianas. Alguns pesquisadores sugerem que a síntese da enzima é regulada por um processo de repressão catabólica. A repressão catabólica, segundo eles, explicaria o fato de a síntese da enzima ocorrer principalmente após o final da fase exponencial de crescimento, já no início da fase estacionária. Outros pesquisadores tentam explicar este mesmo fenômeno sugerindo que a síntese de α -amilase é controlada por uma competição a nível de transcrição. Todavia, parece haver consenso entre eles de que o mecanismo envolvido na síntese das α -amilases é o da síntese de novo de proteína.

Apesar de existir um bom número de trabalhos sobre a produção e propriedades de α -amilases bacterianas, as informações apresentadas na maioria dos casos dificilmente podem ser generalizadas para diferentes linhagens. Essa generalização é difícil principalmente porque os diferentes microrganismos podem se comportar de maneira diferente frente a uma mesma condição de incubação, podendo produzir, ainda, enzimas com propriedades diversas.

Neste trabalho serão pesquisados os efeitos de alguns fatores sobre a produção de α -amilase por uma linhagem de *Bacillus subtilis* disponível na coleção de culturas do laboratório de Fermentações Industriais do Instituto de Tecnologia de Alimentos. Os estudos de produção da enzima em diferentes meios de cultura e condições de cultivo serão realizados com o objetivo de se estabelecerem as melhores condições para a realiza-

ção do processo fermentativo, tentando explicar um possível mecanismo regulador da síntese enzimática. Procurar-se-á também determinar algumas propriedades da α -amilase bruta obtida, como seus valores ótimos de pH e de temperatura, resistência térmica, modo de ação sobre o amido e comportamento frente ao EDTA (sal dissódico do ácido etilenodiaminotetracético), visando a sua utilização mais adequada.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A grande maioria dos trabalhos publicados sobre a produção de α -amilase bacteriana se refere a processos fermentativos em batelada (8, 12, 25, 30, 58). Encontram-se também na literatura trabalhos sobre a produção da enzima por processo de fermentação contínua (3, 17, 21) e/ou com células imobilizadas (31, 54).

A revisão bibliográfica que se apresenta neste trabalho é relativa à produção e propriedades das α -amilases produzidas por microrganismos do gênero *Bacillus* por processos em batelada realizados em frascos agitados ou fermentador.

2.1. Biossíntese da α -amilase

a - Efeito da composição do meio de cultura sobre a produção de α -amilase

De um modo geral carboidratos contendo ligações gli-

cosídicas α -1,4 são considerados boas fontes de carbono para a produção de α -amilase por microrganismos do gênero *Bacillus* (8, 9, 18, 51, 58). Considera-se possível, porém, que os verdadeiros indutores da síntese da enzima não sejam os polissacarídeos adicionados ao meio de cultura e sim algum produto de sua degradação produzido e consumido durante a fermentação (58).

Segundo FUKUMOTO *et alii* (20) a produção de α -amilase por *Bacillus amyloliquefaciens* é grandemente influenciada pelo tipo e concentração da fonte de carbono. Considerada uma linhagem sensível à glicose, esses microrganismos produziram quantidades máximas da enzima quando cultivados em meio de cultura com concentrações reduzidas (da ordem de 0,01-0,02%) de glicose ou com concentração igual a 0,5% de lactose. Houve produção da enzima também em meio de cultura contendo 2,5% de açúcares como galactose, amido solúvel ou maltose. Num comportamento diferente ao normalmente observado, para essa linhagem de *Bacillus amyloliquefaciens* o amido solúvel se mostrou a fonte de carbono menos apropriada para a produção de α -amilase.

Glicose, frutose, galactose, sacarose, glicerol, acetato e amido solúvel ou insolúvel impediram a produção de α -amilase, sem inibir o crescimento, de *Bacillus stearothermophilus*, quando usados em concentrações de 1% no meio de cultura. O microrganismo, no entanto, cresceu e produziu α -amilase em meio de cultura contendo lactato e maltose naquela mesma concentração (23).

CHANDRA *et alii* (9) fizeram um estudo das condições nutricionais sobre a produção de α -amilase por *Bacillus licheniformis* CUMC-305. Esses pesquisadores observaram que são boas fontes de carbono para a produção da enzima a dextrina, o

glicogênio, a inulina, o amido solúvel, galactose e glicose. Foi observado também que a quantidade de enzima produzida é grandemente influenciada pela concentração de glicose no meio de cultura. Uma concentração do açúcar igual a 0,5% inibe quase que totalmente a síntese de α -amilase pela linhagem. Por outro lado, uma concentração igual a 0,05% do açúcar permite uma produção de enzima próxima à obtida pelo uso da dextrina a 0,1% como fonte de carbono.

Bacillus subtilis KYA 741 cresce e produz α -amilase em meios de cultura contendo amido solúvel, xilose e maltose. Em bora o microrganismo se desenvolva bem, ele não produz a enzima em meio de cultura contendo 1% de glicose. A produção de α -amilase pelo microrganismo naquelas três fontes de carbono foi maior em meio de cultura contendo amido solúvel e menor em meio de cultura contendo maltose (58).

Glicogênio, amido solúvel, maltose, maltotriose e maltotetraose influem também na produção de α -amilase por *Bacillus acidocaldarius*. A quantidade de enzima produzida pela linhagem variou linearmente com a concentração do carboidrato, tendo sido observada a seguinte ordem: produção de α -amilase em meio de cultura contendo glicogênio > contendo amido solúvel e malto-se > contendo maltotetraose > contendo maltotriose (8).

SAITO *et alii* (51) consideraram a celobiose, a malto se, a melibiose, os oligossacarídeos com até 7 unidades de açú-car, o glicogênio, o amido e a dextrina, carboidratos indutores da síntese de α -amilase por *Bacillus licheniformis*. Esses car-boidratos aumentam em mais de 15 vezes a quantidade de enzima produzida em meio de cultura ao qual não foram adicionados. Em-bora o amido tenha induzido a síntese de α -amilase esses pesqui

sadores observaram que a sua adição simultânea à adição de glicose inibe completamente a formação da enzima.

ALAM *et alii* (1) observaram que elevadas concentrações de glicose inibem a síntese de α -amilase por *Bacillus amyloliquefaciens*. A produtividade enzimática foi reduzida em cerca de 50% quando a concentração inicial do açúcar no meio de cultura passou de 0,2% e a 2,0%.

ROYCHOUDHURY *et alii* (49) trabalhando com uma linhagem de *Bacillus amyloliquefaciens*, inoculada em meio de cultura contendo glicose ou maltose como fonte de carbono, verificaram um aumento da quantidade máxima de enzima produzida com o aumento da concentração inicial do açúcar. Esse aumento da concentração enzimática máxima, no entanto, não refletia num aumento da atividade enzimática específica global (expressa como E_{max}/X_{max}), que diminuía com o aumento da concentração inicial de glicose. De qualquer modo, a maltose se mostrou uma fonte de carbono mais adequada do que a glicose para a síntese de α -amilase por aquela linhagem.

YOO *et alii* (70) verificaram que embora a quantidade de enzima produzida por *Bacillus amyloliquefaciens* fosse maior em meio de cultura contendo maltose a 1% do que em meio de cultura contendo glicose na mesma concentração, a atividade enzimática específica (E_{max}/X_{max}) era praticamente a mesma para as duas fontes de carbono.

A produção de α -amilase por uma linhagem de *Bacillus subtilis* estudada por COLEMAN *et alii* (12) se mostrou maior em meio de cultura contendo maltose como fonte de carbono do que em meio de cultura contendo amido solúvel. Em meio de cultura contendo glicose à concentração inicial de 1% a quantidade de

enzima produzida foi inferior à observada em meio de cultura contendo amido, porém foi superior à observada com o emprego de glicerol como fonte de carbono.

Mutantes de uma mesma linhagem de microrganismos podem se comportar de maneira diferente frente a uma mesma fonte de carbono (10, 41). CHENG *et alii* (10) observaram, por exemplo, que uma das linhagens mutantes de *Bacillus caldolyticus* DSM 405 tem a produção de α -amilase induzida por maltose e glicogênio e reprimida por glicose. Outro mutante da mesma linhagem, no entanto, tem a produção de α -amilase fortemente induzida por glicose e parcialmente inibida pela maltose. Da mesma forma, mutantes de *Bacillus subtilis* 168, que é uma linhagem bastante sensível à glicose, adquirem uma resistência à repressão catabólita causada pelo açúcar (41).

PFUELLER *et alii* (46) observaram que a produção de α -amilase por *Bacillus stearothermophilus* em meio de cultura contendo maltose como fonte de carbono era ligeiramente superior à observada em meio de cultura contendo amido solúvel.

A presença de biotina, de ácido pantotênico ou de tiamina no meio de cultura aumenta a produção de α -amilase por *Bacillus licheniformis* CUMC 305. A adição de piridoxina, riboflavina, ácido fólico e ácido ascórbico tem pouco ou nenhum efeito sobre a produção da enzima pela linhagem (9).

Aminoácidos como a arginina, o ácido aspártico, a cisteína, a alamina, a fenilalamina, a isoleucina e a serina, estimulam a síntese de α -amilase por *Bacillus licheniformis* CUMC 305, quando são a única fonte de nitrogênio do meio de cultura. A produção da enzima é ainda maior quando os aminoácidos são substituídos por uma fonte complexa de nitrogênio como a peptona

(9). Valina, arginina e metionina são aminoácidos que aumentam também a produção de α -amilase por *Bacillus stearothermophilus* (46).

CHANDRA *et alii* (9) experimentaram substituir os aminoácidos ou peptona do meio de cultura por fontes inorgânicas de nitrogênio como sulfato, nitrato ou cloreto de amônio, tiurêia ou nitrato de sódio. Esses pesquisadores verificaram que essa substituição implicava em um reduzido crescimento microbiano e em uma baixa produção de α -amilase por *Bacillus licheniformis* CUMC 305.

BAJPAI *et alii* (5) estudaram o efeito de diferentes fontes orgânicas de nitrogênio sobre produção de α -amilase por *Bacillus licheniformis* TCRDC-B 13. Entre a peptona, o extrato de levedura, o extrato de carne e a água de maceração de milho, a melhor fonte de nitrogênio para a produção da enzima por essa linhagem de microrganismo foi a peptona.

ALAM *et alii* (1) estudaram o efeito da concentração inicial de extrato de levedura no meio de cultura sobre a produção de α -amilase por *Bacillus amyloliquefaciens*. Nesse trabalho observaram que concentrações do componente superiores a 5,0g/l implicavam na repressão total da síntese da enzima quando o pH do caldo de cultura não era controlado.

O íon Cd^{+2} , na concentração de 2mg/l, inibe completamente o crescimento de *Bacillus licheniformis* CUMC 305, enquanto os íons Ag^{+} , Hg^{+2} , Pb^{+2} , Se^{+4} , W^{+6} e Zn^{+2} têm efeito inibidor apenas sobre a produção de α -amilase (9). Íons como Ca^{+2} (46), Mg^{+2} (9, 46), NH_4^{+} (46), Fe^{+3} (9), Mn^{+2} (9) e Cu^{+2} (9, 46), em concentrações ótimas que dependem do íon considerado, aumentam a produção de α -amilase por *Bacillus licheniformis* CUMC 305 (9) e *Bacillus stearothermophilus* (46).

Os tensoativos Tween 80, Triton X100 e Dodecil sulfato de sódio (SDS) adicionados ao meio de cultura no início da fermentação alteram a produção de α -amilase por *Bacillus licheniformis* CUMC 305 (9) e/ou facilitam o desprendimento da enzima da superfície celular (8).

b - Efeito das condições de cultivo sobre a produção de α -amilase

A despeito da importância do estudo do efeito das condições físicas do processo fermentativo, como pH do meio de cultura, temperatura, aeração e agitação de incubação, para a produção de α -amilase, BUONOCORE *et alii* (8) consideram que um estudo sistemático do efeito isolado de cada um daqueles fatores é quase impossível por serem totalmente interdependentes.

CHANDRA *et alii* (9), num estudo sobre o efeito da temperatura de incubação e do pH inicial do caldo de cultura sobre a produção de α -amilase, observaram que embora o *Bacillus licheniformis* CUMC 305 se desenvolvesse bem a 30°C não havia produção da enzima a essa temperatura. O microrganismo sintetizava a enzima numa faixa de temperatura compreendida entre 35°C e 50°C, com um ótimo a 48°C, mas crescia pouco e não a produzia a 55°C. Do mesmo modo, a linhagem não se desenvolvia quando o pH inicial do meio de cultura era igual a 4,0, mas crescia e produzia a α -amilase na faixa de pH compreendida entre 5,0 e 10,0, com pH inicial ótimo igual a 6,5.

Uma linhagem de *Bacillus licheniformis* isolada por BAJPAI *et alii* (5) apresentou temperatura ótima de incubação para a produção de α -amilase igual a 35°C. Para essa cultura o pH ótimo do meio para a produção da enzima esteve na faixa de 6,0 a 9,0.

Apesar de não terem realizado um estudo sistemático do efeito da temperatura de incubação sobre a produção de α -amylase, SAITO *et alii* (51) verificaram que a linhagem de *Bacillus licheniformis* por eles estudada produzia α -amilase apenas a temperaturas ao redor de 50°C e nunca abaixo de 45°C.

c - O mecanismo da síntese de α -amilase

A capacidade de um microrganismo sintetizar α -amilase em meio de cultura onde a única fonte de carbono é a glicose, revela que para a linhagem a enzima é constitutiva. Nos casos onde a síntese da enzima é estimulada por carboidratos com ligações glicosídicas α -1,4 ela é considerada indutiva (51).

De acordo com SAITO *et alii* (51) e KINOSHITA *et alii* (30) as diferenças observadas quanto ao caráter indutivo ou constitutivo das α -amilases bacterianas são devidas, em parte, à diversidade das linhagens empregadas e às diferenças existentes nos meios de cultura e/ou nas condições experimentais. Esses pesquisadores consideram também que em parte elas se devem ao fato de a síntese da enzima ser controlada por um mecanismo de regulação complicado, que difere ligeiramente em cada linhagem. Ademais, PRIEST (47) e WELKER *et alii* (64) consideram que alguns pesquisadores obtiveram resultados divergentes por empregarem linhagens de microrganismos com classificação sistemática incorreta.

As α -amilases do gênero *Bacillus* podem ser indutivas ou constitutivas (47). Mesmo sendo produzida mais intensamente em meios de cultura contendo amido solúvel e maltose do que em meio de cultura contendo glicose e glicerol como fontes de carbono, COLEMAN *et alii* (12) consideraram que a síntese da maio-

ria das α -amilases de *Bacillus subtilis* não é regulada por processo de indução. Isso porque esses pesquisadores observaram que a produção da enzima na fase pós logarítmica de crescimento era exatamente igual para todas as fontes de carbono estudadas. Outros pesquisadores consideram, do mesmo modo, que a inducibilidade da α -amilase não pode ser definida apenas a partir da observação do efeito estimulante de uma ou outra fonte de carbono numa determinada etapa do crescimento (21, 51).

Há evidências de que a síntese de α -amilase seja controlada por indução pelo substrato e por repressão catabólita (27). A repressão catabólita segundo PRIEST (47) e SAITO *et alii* (51), manifesta-se a nível de transcrição sobre a síntese da enzima indutiva ou constitutiva na presença de glicose ou outra fonte de carbono rapidamente metabolizável. De experimentos onde a adição de 8 - azaguanina a meios de cultura contendo glicose inibia severamente a produção de α -amilase mas acelerava a síntese de ácidos nucleicos, FUKUMOTO *et alii* (20) sugeriram que a síntese de α -amilase por *Bacillus amyloliquefaciens* ocorre apenas quando há baixo metabolismo de ácido nucleico e da fonte de carbono. COLEMAN *et alii* (12) e GRUENINGER *et alii* (23) observaram também uma relação inversa entre o tempo de duplicação de *Bacillus subtilis* (12) e *Bacillus stearothermophilus* (23) e a velocidade de produção de α -amilase. Assim, quanto mais rápida era a metabolização do açúcar menor era a quantidade de enzima produzida pelas linhagens.

Uma análise dos trabalhos publicados sobre a fase de crescimento microbiano e a conseqüente síntese da α -amilase pelo gênero *Bacillus*, revela que há dois tipos de comportamento dependendo do microrganismo e das condições do experimento: a) a formação de enzima é lenta durante a fase logarítmica de cres-

cimento, seguida de um aumento da velocidade de síntese na medida em que a velocidade de crescimento diminui e atinge a fase estacionária (8, 12, 13, 20, 23, 25, 41, 58, 66, 68, 69) e b) alta síntese da enzima acompanhando o crescimento microbiano e diminuição da velocidade de síntese à medida que a cultura entra na fase estacionária (4, 10, 15, 17, 46, 64).

Há várias hipóteses para explicar porque o aparecimento da α -amilase ocorre em alguns casos apenas após o final da fase exponencial de crescimento. Uma delas, proposta por COLEMAN *et alii* (14), diz que a formação da enzima é mais intensa nessa fase do crescimento devido a uma competição pelo conjunto de nucleotídeos e pela enzima RNA polimerase envolvidos na síntese de mRNA. Segundo essa teoria, na fase logarítmica de crescimento a transcrição do mRNA para a síntese de α -amilase é bloqueada pela intensa transcrição do mRNA necessário para a síntese de material celular. Cessado o crescimento microbiano estariam disponíveis maiores quantidades de RNA polimerase e de nucleotídeos para serem usados na síntese de mRNA para a exoenzima, havendo então uma maior secreção de α -amilase. Trabalhos recentes de NICHOLSON *et alii* (42) confirmam que a repressão da síntese de α -amilase é consequência da inabilidade da RNA polimerase iniciar a transcrição quando as células crescem em meio em glicose.

Trabalhos realizados com *Bacillus subtilis* KA 63 (30) e *Bacillus subtilis* Marburg (53) sugerem uma outra hipótese: a de que o mRNA envolvido na síntese de α -amilase é extremamente estável, o que possibilitaria a formação da enzima mesmo após ter cessado o crescimento microbiano. Nesse caso, o mRNA específico para a formação de α -amilase seria acumulado durante o crescimento microbiano, onde a biossíntese é mais intensa, po-

rém, cessado o crescimento a sua quantidade diminuiria muito lentamente havendo uma continuidade da síntese da enzima. Embora a existência de um mRNA de longa vida para a síntese de α -amilase seja citada na revisão relativamente recente de INGLE *et alii* (27), GLENN *et alii* (22) negam essa hipótese.

COLEMAN *et alii* (12) e KINOSHITA *et alii* (30) observaram que os antibióticos cloranfenicol e puromicina inibem a síntese de proteína e de α -amilase por *Bacillus subtilis*. SAITO e YAMAMOTO (51) observaram também que a rifampicina e a tetraciclina, que inibem a síntese de ácidos nucleicos e de proteína, inibem também a síntese de α -amilase por *Bacillus amyloliquefaciens*. Esses trabalhos sugerem que a síntese de α -amilase envolvem a síntese de novo de proteínas (12, 30, 51). A síntese de novo da proteína enzimática ocorreria mesmo na fase onde o crescimento celular é nulo (11, 63), negando a hipótese de que o aparecimento da enzima na fase estacionária se deveria a uma ativação da enzima pré-formada como sugeriu COLEMAN (13).

Segundo NAGATA *et alii* (39), como a α -amilase é sintetizada no interior da célula e excretada para o meio de cultura, a sua produção é regulada em pelo menos duas etapas; na transcrição do mRNA específico para a α -amilase e no transporte da α -amilase além da parede celular.

2.2. Características físicas e químicas das α -amilases

a - Estrutura molecular

As α -amilases bacterianas produzidas por microrganismos do gênero *Bacillus* têm peso molecular variando entre 22.500 e 80.000 dependendo da linhagem produtora (Quadro 1). Uma linhagem microbiana pode produzir mais de uma α -amilase com pesos mo

leculares diferentes mas com a mesma ação catalítica (24). HAYASHI *et alii* (24) trabalhando com *Bacillus* sp. H - 167 obtiveram três α -amilases com pesos moleculares e pontos isoelétricos diferentes mas com ações catalíticas, valores ótimos de pH, temperaturas ótimas e estabilidades térmicas iguais (18).

Todas as α -amilases bacterianas possuem cálcio ligado à molécula e a força de ligação entre o íon e a proteína depende da origem da enzima (61). Algumas α -amilases de *Bacillus subtilis* (61) e de *Bacillus stearothermophilus* (34, 43) contêm pelo menos 1 átomo grama de cálcio por mol de enzima.

Algumas α -amilases de *Bacillus subtilis* além de cálcio também contêm zinco, que, provavelmente, efetua a ligação entre duas moléculas da enzima para formar um dímero (61). Ao contrário do cálcio que é comum a todas as α -amilases, MOSELY *et alii* (38) observaram que a enzima produzida por *Bacillus subtilis* B 3411 não contêm zinco na molécula.

JUNGLE *et alii* (28) não detectaram grupos sulfidril nem ligações dissulfídicas nas moléculas de α -amilase produzida por *Bacillus subtilis*. Posteriormente, TODA *et alii* (59) verificaram que a α -amilase amiloliquidificante produzida por *Bacillus subtilis* contem resíduos de cisteína que podem ser desmascarados por EDTA (sal dissódico do ácido etilenodiaminotetracético).

b - Ação catalítica

As α -amilases hidrolisam ligações glicosídicas α -1,4 do interior das moléculas de polímeros de glicose como amido, glicogênio e seus produtos de degradação. Os produtos de degradação do amido submetido à ação de α -amilase contêm invariavelmente dextrina com diferentes graus de polimerização, uma vez

que a enzima é incapaz de hidrolisar ligações glicosídicas α -1,6. Além das dextrinas outros açúcares como glicose, maltose, maltotriose, maltotetraose e oligossacarídeos maiores são formados no processo hidrolítico. O produto de hidrólise do amido varia não apenas com a duração do processo hidrolítico mas também com a origem da enzima (2, 8, 24, 36, 53, 67).

As α -amilases de *Bacillus subtilis* podem ser divididas em sacarificantes e liquidificantes segundo o seu modo de ação sobre a molécula de amido. As α -amilases sacarificantes produzem açúcar redutor numa quantidade duas vezes superior à quantidade produzida pelas liquidificantes (34, 60). Além disso nenhum produto de hidrólise das α -amilases sacarificantes é atacado pelas α -amilases liquidificantes (60). De acordo com experimentos realizados por OKADA *et alii* (45) as α -amilases liquidificantes não atuam sobre oligossacarídeos com um número de unidades de glicose inferior a seis. Outras características do modo de ação das α -amilases contribuem para a sua divisão em duas classes. MANNING *et alii* (34) e MEDDA *et alii* (36) se baseiam na redução da viscosidade para a classificação da enzima. Segundo esses pesquisadores as α -amilases liquidificantes reduzem a viscosidade do amido muito mais rapidamente do que as sacarificantes. As α -amilases liquidificantes não agem sobre as ciclo-dextrinas enquanto as sacarificantes agem sobre a β dextrina cíclica abrindo o anel e liberando sete unidades de glicose (38). A velocidade de perda da capacidade do amido complexar o iodo é um outro parâmetro que tem sido empregado por alguns pesquisadores para incluir a enzima no grupo das α -amilases sacarificantes ou liquidificantes. Nesse sentido as α -amilases liquidificantes fazem também com que o amido perca a coloração sob adição de iodo muito mais rapidamente do que as sacarificantes (34, 36).

Além dos parâmetros citados as enzimas amiloliquificantes não possuem resíduos de cisteína ou cistina na molécula (59) e dão reação cruzada com o antissoro de α -amilase de *Bacillus amyloliquefaciens* mas não com o antissoro de α -amilase sacarificante.

As α -amilases sacarificantes são tipicamente produzidas por *Bacillus subtilis* var. *amylosacchariticus* e as α -amilases liquidificantes por *Bacillus amyloliquefaciens* (47).

c - Estabilidade e ativação

A concentração do substrato (8, 23, 46), a concentração da enzima (8), a concentração de Ca^{+2} , de uréia ou EDTA (29, 43) no meio de reação são fatores que afetam a estabilidade térmica das α -amilases e o perfil da curva de estabilidade em diferentes valores de pH (29).

O cálcio é essencial para a ação catalítica das α -amilases bacterianas (61) e na sua presença, a enzima é mais resistente a valores extremos de pH e temperatura, ao tratamento com uréia ou à ação de algumas proteases (43, 56).

O EDTA adicionado à solução de α -amilase tem a capacidade de complexar os íons Ca^{+2} da molécula tornando a enzima menos resistente ao tratamento térmico (43). OGASAHARA *et alii* (43) observaram que a α -amilase termotolerante produzida por *Bacillus stearothermophilus* tornava-se completamente inativa após dezoito minutos de aquecimento a 60°C na presença de 0,005M de EDTA, ao passo que na ausência do quelante a enzima mantinha 100% da sua atividade após 3 horas de incubação àquela mesma temperatura.

TODA *et alii* (59) observaram que as α -amilases liqui

lificantes de *Bacillus* são mais sensíveis ao tratamento com o EDTA a 50°C e pH 8,0 do que as α -amilases sacarificantes. Enquanto a enzima liquidificante perde totalmente a sua atividade após 30 minutos de aquecimento, a sacarificante mantém cerca de 10% da sua atividade inicial após 2 horas de tratamento nas mesmas condições.

As α -amilases de *Bacillus* apresentam termosensibilidade bastante variável. A enzima purificada produzida por *Bacillus licheniformis* mantém 100% da sua atividade original quando mantida por 15 minutos a temperaturas inferiores a 60°C (53), enquanto a bruta produzida por *Bacillus stearothermophilus* retém 50% da sua atividade catalítica após 2 horas de incubação a 95°C, ou 100% na presença de amido após 3 horas de incubação na mesma temperatura (23).

MEDDA *et alii* (36) compararam as estabilidades térmicas de α -amilases alcalinas termoestáveis purificadas produzidas por *Bacillus licheniformis* e por *Bacillus coagulans*. Esses pesquisadores notaram que a enzima de *Bacillus licheniformis* tinha 80% da sua atividade enzimática inicial destruída quando submetida por 1 hora a 90°C e pH 7,0. A enzima produzida por *Bacillus coagulans* mantinha apenas 15% da sua atividade inicial quando submetida por 1 hora a 80°C e pH 7,0.

A α -amilase de *Bacillus subtilis* (Ref. JFK) mantém 80% da sua atividade inicial após 6 dias de incubação a 37°C. Mas a potência da enzima foi reduzida a cerca de 60% da original após 1 dia de incubação a 60°C (29).

OGASAHARA *et alii* (43) compararam as resistências térmicas das α -amilases produzidas por *Bacillus subtilis* e por *Bacillus stearothermophilus*. Esses pesquisadores observaram que

a enzima de *Bacillus subtilis* perde 60% da sua atividade inicial após ser submetida por 30 minutos a 60°C, enquanto a outra se mantém totalmente ativa quando submetida ao mesmo tratamento.

A temperatura e o pH ótimos de atividade das α -amilases bacterianas também variam com a linhagem que produzem a enzima. Embora as bactérias alcalofílicas e acidofílicas sempre produzam α -amilases alcalinas e ácidas, respectivamente, nem sempre microrganismos termófilos produzem α -amilases com elevada resistência térmica, muito embora haja uma tendência para esse comportamento (27).

As α -amilases produzidas por linhagens selvagens do gênero *Bacillus* podem ter atividade enzimática máxima a valores de pH tão baixos como 3,5 (8) e tão elevados quanto 10,6 (24, 26).

A temperatura ótima das α -amilases de *Bacillus* variam numa faixa relativamente estreita compreendida entre 50°C e 90°C. O Quadro I mostra dados de temperatura e pH ótimos de algumas α -amilases produzidas por bactérias do gênero *Bacillus* apresentados por vários autores.

Vários pesquisadores têm estudado o efeito de íons metálicos e reagentes sobre a atividade de α -amilases bacterianas. HORIKOSHI (26) trabalhando com *Bacillus subtilis* No. A-40,2, verificou que a α -amilase produzida pela linhagem era completamente inibida quando incubada com lauril sulfato de sódio ou uréia a pH 10 por 30 minutos a 30°C.

HAYASHI *et alii* (24) observaram que os íons Hg^{+2} e Zn^{+2} inibiam completamente as três α -amilases produzidas por *Bacillus* sp H-167 (HI-1, HI-2 e HII) após 20 minutos de aquecimento a 40°C a pH 9.0. Esses pesquisadores observaram também que os íons Na^{+} , Ca^{+2} e Mg^{+2} estimulavam as α -amilases produzidas pelo microrganismo.

QUADRO I. Algumas propriedades de α -amilases produzidas por bactérias do gênero *Bacillus*.

MICROORGANISMO	PESO MOLECULAR	pH ÓTIMO	TEMPERATURA ÓTIMA (°C)	REFERÊNCIA
<u>Bacillus stearothermophilus</u> 503-4	-	4,6-5,1	55-70°	Manning (34)
<u>Bacillus stearothermophilus</u>	48.000	5,0-6,0	65-75	Ogasahara et alii (43)
<u>Bacillus stearothermophilus</u>	53.000	5,4-6,0	-	Pfueller et alii (46)
<u>Bacillus cheniformis</u> CUMC 305	28.000	9,5	91	Medda et alii (36) Krishnan e Chandra (32)
<u>Bacillus licheniformis</u>	22.500	5,0-8,0	76	Saito (50)
<u>Bacillus coagulans</u> CUMC 512	-	7,5-8,5	85°	Medda et alii (36)
<u>Bacillus subtilis</u> (Ref. JFX)	-	5,8	63	Kennedy et alii (29)
<u>Bacillus subtilis</u> 168 (Marburg)	53.000	5,5	-	Kennedy et alii (29)
<u>Bacillus subtilis</u> W2	-	6,3	65	Welker et alii (64)
<u>Bacillus amyloliquefaciens</u>	-	5,9	65	Welker et alii (64)
<u>Bacillus acidocaldarius</u> agnaro 101	68.000	3,5	75°	Buonocore et alii (8)
<u>Bacillus</u> sp - H 167	73.000	10,5	60	Hayashi et alii (24)
HI-2	59.000	10,5	60	
H-II	80.000	10,5	60	
<u>Bacillus</u> N9 A-40-2	70.000	10-10,5	55	Horikoshi (26)

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. *Microorganismo*

O microorganismo utilizado neste trabalho foi *Bacillus subtilis* ATCC 601B da Coleção de Culturas da Seção de Fermentações Industriais do Instituto de Tecnologia de Alimentos. Todos os experimentos foram realizados com culturas com 72 horas de incubação a 30°C em tubo inclinado de ágar nutriente. As culturas-estoque foram mantidas por repiques trimestrais em tubo inclinado de ágar nutriente imersas em óleo mineral e conservadas sob refrigeração.

3.2. *Semente ou pré-fermentação*

As sementes foram obtidas a partir da inoculação do microorganismo nos mesmos meios de cultura a serem empregados pa

ra as fermentações. Com mililitros dos meios de cultura colocados em erlenmeyers de 500ml foram inoculados com uma alçada de microrganismo. A incubação para obtenção das sementes foi feita a 200 rpm e a 37°C durante 18 horas.

3.3. Produção da enzima

O meio de cultura básico empregado para a produção da enzima tinha a seguinte composição para 1000ml de água destilada:

$(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$	2,5g
$\text{Mg SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5g
KCl.....	0,5g
K_2HPO_4	1,0g
CaCl_2	418mg

3.3.a. Efeito da concentração e da fonte de carbono sobre a produção de α -amilase

Para esse estudo foi empregado o meio de cultura básico acrescido de peptona da marca Difco 10,0g/l, extrato de levedura da marca Difco 5,0g/l e da fonte de carbono em diversas concentrações. O pH do meio de cultura foi ajustado a 7,0 com KOH 5M ou HCl 5N antes da esterilização a 121°C por 15 minutos.

A enzima foi produzida em erlenmeyers de 1000ml contendo 400ml do meio de cultura semeadas com um volume de inóculo suficiente para que a absorbância inicial do caldo de cultura fosse igual a 0,1. A incubação foi feita em agitador rotatório

a 200 rpm e 37°C. As amostras foram coletadas de um mesmo erlenmeyer durante 72 horas de fermentação. A cada intervalo de tempo foram feitas medidas do pH e da concentração celular do caldo coletado. A determinação da atividade dextrinizante foi feita no sobrenadante do caldo de cultura centrifugado a 13.000 x g a 5°C em centrífuga Damom modelo IEC B-20A por 10 minutos.

3.3.a.1. *Efeito da concentração inicial de glicose sobre a produção de α -amilase*

Os experimentos foram conduzidos em meio de cultura contendo glicose da marca Reagen nas concentrações de 0,05g/l; 0,10g/l; 0,20g/l; 0,50g/l; 0,75g/l; 1,0g/l; 10,0g/l; 20,0g/l; 30,0g/l; 40,0g/l e 50,0g/l.

3.3.a.2. *Efeito da concentração inicial de amido sobre a produção de α -amilase*

Os experimentos foram conduzidos em meio de cultura contendo amido solúvel da marca Ecibra nas concentrações de 0,50g/l; 1,0g/l; 1,5g/l; 5,0g/l; 10,0g/l; 20,0g/l e 30,0g/l.

3.3.a.3. *Efeito da concentração de dextrina sobre a produção de α -amilase*

Os experimentos foram conduzidos em meio de cultura contendo dextrina da marca Merck nas concentrações de 1,0g/l; 1,5g/l; 2,0g/l; 4,0g/l; 10,0g/l; 20,0g/l e 30,0g/l.

3.3.a.4. *Efeito da concentração inicial de lactose sobre a produção de α -amilase*

Os experimentos foram conduzidos em meio de cultura contendo lactose da marca Carlo Erba nas concentrações de 5,0g/l; 10,0g/l; 20,0g/l e 30,0g/l.

3.3.b. *Efeito da concentração inicial de peptona sobre a produção de α -amilase*

Esse estudo foi feito em meio de cultura básico contendo peptona da marca Difco a 2,5g/l; 5,0g/l; 10,0g/l e 12,5g/l, extrato de levedura da marca Difco a 5,0g/l e dextrina da marca Merck a 4,0g/l. Também foram feitos experimentos com o meio de cultura contendo as mesmas quantidades de dextrina e extrato de levedura mas isento de peptona.

O pH do meio de cultura foi ajustado a 7,0 com KOH 5M ou HCl 5N antes da esterilização a 121°C por 15 minutos.

A produção da enzima e o tratamento das amostras coletadas foram conduzidos como descrito no item 3.3.a.

3.3.c. *Efeito da concentração inicial de extrato de levedura sobre a produção de α -amilase*

Os experimentos foram conduzidos em meio de cultura básico contendo peptona da marca Difco a 10,0g/l, dextrina da marca Merck a 4,0g/l e extrato de levedura da marca Difco nas concentrações de 2,5g/l; 5,0g/l; 10,0g/l. Foram feitos também experimentos com o meio de cultura contendo as mesmas concentrações de dextrina e de peptona mas isento de extrato de levedu-

ra. O pH do meio de cultura foi ajustado a 7,0 com KOH 5M ou HCl 5N.

A produção da enzima e o tratamento das amostras coletadas foram feitos nas mesmas condições descritas no item 3.3.a.

3.3.d. *Efeito da temperatura de incubação sobre a produção de α -amílase*

Para esse estudo os experimentos foram conduzidos em meio de cultura básico contendo peptona da marca Difco a 10,0g/l, extrato de levedura da marca Difco a 5,0g/l e dextrina da marca Merck a 4,0g/l. O pH do meio de cultura foi ajustado a 7,0 com KOH 5M, antes da esterilização a 121°C por 15 minutos.

A inoculação do meio de cultura e o tratamento das amostras coletadas foram iguais ao descrito no item 3.3.a. A fermentação, porém, foi conduzida em agitador rotatório a 200 rpm a 30°C; 33°C; 37°C e 40°C.

3.3.e. *Efeito do pH inicial do meio de cultura sobre a produção de α -amílase*

Esse estudo foi feito em meio de cultura básico contendo peptona da marca Difco a 10g/l, extrato de levedura da marca Difco a 5,0g/l e dextrina da marca Merck a 4,0g/l. O pH do meio de cultura foi ajustado a 4,0; 5,0; 6,0; 6,5; 7,0; 8,0; 8,5, 9,0 e 10 em KOH 5M ou HCl 5N antes da esterilização a 121°C por 15 minutos.

A produção da enzima e o tratamento das amostras coletadas foram conduzidos como descrito no item 3.3.a.

3.3.f. Perfil da síntese de α -amilase

Para obter o perfil da síntese de α -amilase no decorrer do processo fermentativo foi utilizado o meio de cultura básico contendo peptona da marca Difco a 10,0g/l, extrato de levedura da marca Difco a 5,0g/l e glicose da marca Reagen a 10,0g/l. O pH do meio de cultura foi ajustado a 7,0 em KOH 5M antes da esterilização a 121°C por 15 minutos.

Quatrocentos mililitros do meio de cultura foram colocados em erlenmeyers de 1000ml e inoculados em 4ml de uma suspensão de células de *Bacillus subtilis* ATCC 601B em água destilada estéril. Dois conjuntos de três erlenmeyers foram inoculados com intervalo de 12 horas. A incubação dos frascos foi feita a 37°C e a 200 rpm em agitador rotatório. O processo fermentativo foi acompanhado através das medidas de crescimento celular, consumo de açúcar, atividade dextrinizante, atividade sacarificante, concentração de esporos e do pH do meio de cultura.

3.4. Concentração celular

A concentração celular foi medida através de medidas de densidade ótica. O caldo de cultura foi centrifugado em centrífuga Damon modelo IEC B-20A durante 10 minutos a 13.000 x g rpm e a 5°C. As células decantadas foram lavadas e ressuspensas em água destilada. As medidas das densidades óticas das suspensões foram feitas a 660nm em espectrofotômetro da marca Bauch & Lomb modelo Spectronic 20. Uma unidade de densidade ótica correspondeu a 0,605lg massa seca/litro de caldo. A relação entre a densidade ótica e a concentração celular foi obtida através de

medidas de densidade ótica e de massa seca do microrganismo desenvolvido no meio de cultura proposto por SHINMYO *et alii* (54).

3.5. Concentração de esporos

A concentração de esporos no caldo de cultura foi medida em câmara de Petroff - Hausser em microscópio de contraste de fase da marca Carl Zeiss.

3.6. Concentração de glicose

A concentração de glicose no caldo de cultura foi medida através da reação do açúcar com o ácido 3,5 dinitrossalicílico conforme a metodologia de Miller (37). A intensidade da cor da solução final foi medida através das leituras de absorbância em espectrofotômetro da marca Bauch & Lomb modelo spectronic 20.

3.7. Atividade enzimática

3.7.a. Atividade dextrinizante

A atividade dextrinizante do caldo de cultura foi determinada pelo método de SMITH *et alii* (55) modificado por MEDDA *et alii* (36). A 0,5ml de uma solução de amido solúvel 1% (v/v) foi adicionado 0,1ml de solução tampão de ácido cítrico - fosfato de sódio 0,1M, pH 6,0 e 0,3ml de água destilada. A mistura foi colocada em banho-maria a 50°C até atingir o equilíbrio térmico.

mico. Adicionou-se então 0,1ml do sobrenadante do caldo de cultura, centrifugado a 13.000 x g por 10 minutos a 5°C em centrífuga Damon modelo IEC B-20A. Após, 5 minutos de incubação a reação enzimática foi interrompida pela adição de 0,5ml de uma solução de HCl 1N. O mesmo procedimento foi seguido para o controle, onde, em lugar de 0,1ml da solução enzimática, foi adicionado à mistura de reação 0,1ml de água destilada. A quantidade de amido hidrolisado foi calculada através da diferença, entre as medidas de absorbância do controle e da amostra, a 620nm, após a adição de 0,1ml de solução de iodo (0,3% I₂ em solução de KI 3%) e 13,4ml de água destilada. As medidas de absorbância foram efetuadas em espectrofotômetro Bauch & Lomb modelo spectronic 20. Uma unidade de atividade dextrinizante (UD) será definida como a potência enzimática que hidrolisa 1mg de amido em 1 minuto a 50°C e a pH 6,0 na presença de 5,0mg do substrato.

$$\frac{\text{Abs controle} - \text{Abs amostra}}{\text{Abs controle}} \times \text{mg amido em solução} = \text{mg de amido hidrolisado} \quad (55)$$

3.7.b. Atividade sacarificante

A atividade sacarificante do meio de cultura foi determinada segundo uma adaptação do método proposto por BERNFELD (6). Este método se baseia na medida do aumento do poder reductor de uma solução de amido ou amilopectina submetida à hidrólise enzimática. A 1ml de solução de amido 1% (preparada em solução tampão de ácido cítrico-fosfato de sódio 0,1M, a pH 6,0) a 50°C, foi adicionado 1ml do sobrenadante do caldo de cultura centrifugado. A centrifugação do caldo de cultura foi efetuada a 13.000 xg por 10 minutos e a 5°C em centrífuga Damon modelo IEB B-20A. A mistura de substrato e enzima foi mantida a 50°C

por 3 minutos. A hidrólise enzimática foi interrompida pela adição de 2ml de reagente do ácido 3,5 dinitrossalicílico. A mistura de reação foi aquecida em água em ebulição, por 5 minutos, e então resfriada em banho de gelo. A medida de absorbância da solução resultante foi efetuada a 550nm em espectrofotômetro Bauch & Lomb modelo spectronic 20, após a adição de 20ml de água destilada. A quantidade de açúcar redutor em solução foi obtida de uma curva de calibração com maltose. Uma unidade de atividade sacarificante será definida como a potência enzimática que causa a liberação de 1mg de maltose em 3 minutos, a 50°C e a pH 6,0.

3.8. Propriedades da α -amilase bruta

Para o estudo de algumas propriedades da α -amilase produzida por *Bacillus subtilis* ATCC 601B usou-se a enzima produzida em meio de cultura básico contendo peptona da marca Difco a 10,0g/l, extrato de levedura da marca Difco a 5,0g/l e dextrina da marca Merck a 4,0g/l. O pH do meio de cultura foi ajustado a 7,0 antes da esterilização com solução de KOH 5M. Quatrocentos mililitros do meio de cultura foram colocados em erlenmeyer de 1000ml e inoculados com 20ml da pré-fermentação. O caldo de cultura foi fermentado durante 72 horas em agitador rotatório a 200 rpm e 37°C. Após as 72 horas de incubação, o caldo de cultura foi centrifugado em centrífuga Damon modelo IEC B-20A a 13.000 x g por 10 minutos e a 5°C. A solução enzimática sobrenadante com pH entre 8,4 e 8,8, dialisado ou não, foi a empregada nos experimentos.

- *Diálise* - Quando o experimento requeria a solução enzimática dialisada, o sobrenadante do caldo de cultura centrifugado foi dialisado durante 64 horas a 5°C contra água destilada.

3.8.a. Estabilidade térmica

- A estabilidade térmica da enzima no caldo de cultura foi determinada incubando-se quantidades de 10ml da solução enzimática não dialisada em banho de água a 37°C, 50°C, 60°C e 80°C. A cada intervalo de tempo duas amostras de 10ml da solução foram retiradas do banho e imediatamente imersas em banho de gelo. Foi determinada então a atividade dextrinizante remanescente na solução enzimática segundo a metodologia descrita no item 3.7.a.

- Foi estudada a estabilidade térmica a 37°C da solução enzimática dialisada. Da mesma maneira, quantidades de 10ml da solução foram incubadas a 37°C em banho de água. A cada intervalo de tempo duas amostras de 10ml foram retiradas do banho aquecido e imersas imediatamente em banho de gelo. A atividade dextrinizante remanescente na solução foi determinada também segundo a metodologia descrita no item 3.7.a.

- O efeito de cálcio, do amido e do EDTA, adicionados à solução enzimática não dialisada sobre a estabilidade térmica da enzima bruta, foi estudado através da medida da atividade dextrinizante remanescente na solução submetida aos seguintes tratamentos:

1. Efeito da presença de amido sobre a estabilidade térmica da enzima

A amostras de 3ml da solução enzimática não dialisada foram adicionados 2ml de uma solução de amido solúvel a 2% (p/v), preparada em solução tampão de ácido cítrico - fosfato de sódio 0,1M, pH 6,0. A mistura foi incubada em banho de água a 50°C. A cada intervalo de tempo duas amostras foram retiradas do banho quente e imediatamente imersas em banho de gelo. As atividades dextrinizantes remanescentes na solução enzimática foram determinadas segundo a metodologia descrita no item 3.7.a.

2. Efeito do íon Ca^{+2} sobre a estabilidade térmica da α -amilase

A amostras da solução enzimática não dialisada foi adicionado CaCl_2 para perfazer uma concentração de 10mM ou 20mM do íon Ca^{+2} , além da inicialmente adicionada ao meio de cultura. As misturas foram incubadas em banho de água a 50°C por determinados intervalos de tempo após os quais foram imediatamente imersas em banho de gelo. A atividade dextrinizante remanescente foi determinada segundo a metodologia descrita no item 3.7.a.

3. Efeito do EDTA sobre a estabilidade térmica da α -amilase

Amostras da solução enzimática não dialisada contendo EDTA (sal dissódico do ácido etilenodiaminotetracético) na concentração de 10mM foram incubadas em banho de água a 50°C. A cada intervalo de tempo duas amostras da mistura foram retiradas do banho aquecido e imersas imediatamente em banho de gelo. A atividade dextrinizante remanescente na solução foi determinada segundo a metodologia descrita no item 3.7.a.

3.8.b. Efeito da temperatura sobre a atividade da α -amilase

O perfil da variação da atividade enzimática com a temperatura de reação foi determinado através das medidas de atividade dextrinizante a pH 6,0 da solução enzimática não dialisada. A metodologia seguida para a determinação da atividade dextrinizante da solução foi a descrita no item 3.7.a. à temperatura de 30°C, 40°C, 50°C, 55°C, 60°C, 65°C, 70°C, 80°C e 90°C.

3.8.c. Efeito do pH sobre a atividade enzimática

O perfil da variação da atividade enzimática com o pH de reação foi determinado através das medidas de atividade dextrinizante da solução enzimática não dialisada. A metodologia empregada para a determinação da atividade dextrinizante da solução foi a descrita no item 3.7.a. a vários valores de pH. Os valores de pH das misturas de reação foram ajustados com 0,1ml das seguintes soluções tampões: 1) solução tampão de $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O} - \text{Na}_2\text{HPO}_4$ 0,1M para pH 3,0; pH 3,4; pH 4,0; pH 4,4; pH 4,6; pH 5,0; pH 5,4; pH 6,0; pH 6,4; pH 6,6; pH 7,0; pH 7,6; 2) solução tampão de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 - \text{NaH}_2\text{PO}_4$ 0,1M para pH 8,0; 3) solução tampão de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 - \text{HCl}$ 0,01M para pH 9,0 e 4) solução tampão de $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O} - \text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \text{Na}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,1M para pH 3,0; pH 4,0; pH 5,0 e pH 6,0.

3.8.d. Caráter α ou β amilolítico da enzima

O caráter α ou β amilolítico da enzima foi determinado através do estudo da variação da rotação ótica causada pelos produtos da hidrólise do amido submetido à ação enzimática. O método empregado foi uma adaptação do método usado por ROBYT *et*

alii (7). O método se baseia no fato de que a adição de alcali a uma solução de açúcares com carbono anomérico na posição α causa uma diminuição da rotação ótica, enquanto que se o carbono estiver na posição β há um aumento da rotação ótica.

A 20ml de uma solução de amido solúvel 2% (p/v) (preparada em solução tampão de ácido cítrico - fosfato de sódio 0,1M pH 6,0) foi adicionado 1ml da solução enzimática dialisada. A solução enzimática empregada tinha uma atividade dextrinizante igual a 37 unidades/ml. A hidrólise do amido foi efetuada durante 2 horas em banho de água a 50°C. Para controle, um branco da reação foi preparado substituindo 1ml da solução enzimática por 1ml de água destilada. Decorrido o tempo de hidrólise o digerido e o branco foram retirados do banho e resfriados à temperatura ambiente. O pH do branco e do digerido não foi alterado durante a incubação, permanecendo igual a 6,0. As rotações óticas dessas duas soluções foram lidas em Polarímetro Acatec modelo PDA 8200 com tubo de 5cm de comprimento e a 589nm. O pH de uma outra amostra digerida foi ajustado a 10,8 com NaOH 50% e NaOH 3M. Da mesma forma, foi medida a rotação ótica dessa solução.

3.8.e. Ação hidrolítica da α -amilase sobre o amido

Os produtos de hidrólise do amido solúvel submetido à ação da enzima foram identificados por cromatografia descendente em papel. Uma solução de amido solúvel da marca Ecibra a 2% (p/v), preparada em solução tampão de ácido cítrico - fosfato de sódio 0,1M a pH 6,0, foi usada como substrato. A 5ml da solução de amido foram adicionados 2ml da solução enzimática dialisada com 37 unidades/ml de atividade dextrinizante. A mis-

tura de reação foi incubada a 37°C durante 24 e 48 horas. Decorridos esses tempos, a reação hidrolítica foi interrompida pela adição de 0,2ml de HCl 6N. Amostras de 15µl dos digeridos foram aplicadas sobre papel Watman nº 1. A eluição foi efetuada durante 40 horas num sistema de solventes composto de n-butanol-piridina-H₂O (6:4:3 v:v) (36). A revelação do cromatograma foi feita com um sistema de reagentes composto de anilina 22,75ml, ácido ftálico 4,15g, n-butanol 120ml, éter etílico 120ml e água destilada 10ml (19).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Efeito da concentração e da fonte de carbono sobre a síntese de α -amilase por Bacillus subtilis ATCC 601B

Para pesquisar como a fonte e a concentração inicial de carbono afetam a produção de α -amilase, foram acompanhados o crescimento microbiano e a produção da enzima no processo fermentativo. As fermentações foram conduzidas em meio de cultura básico contendo peptona da marca Difco 10,0g/l, extrato de levedura da marca Difco 5,0g/l e uma fonte de carbono em várias concentrações segundo os itens 3.3.a.1., 3.3.a.2., 3.3.a.3. e 3.3.a.4. Todos os resultados são médias de 2 experimentos.

4.1.a. Efeito da concentração de glicose

A linhagem Bacillus subtilis ATCC 601B se desenvolve e produz α -amilase em meios de cultura contendo glicose como fonte de carbono segundo o apresentado nas Figuras 1 a 11.

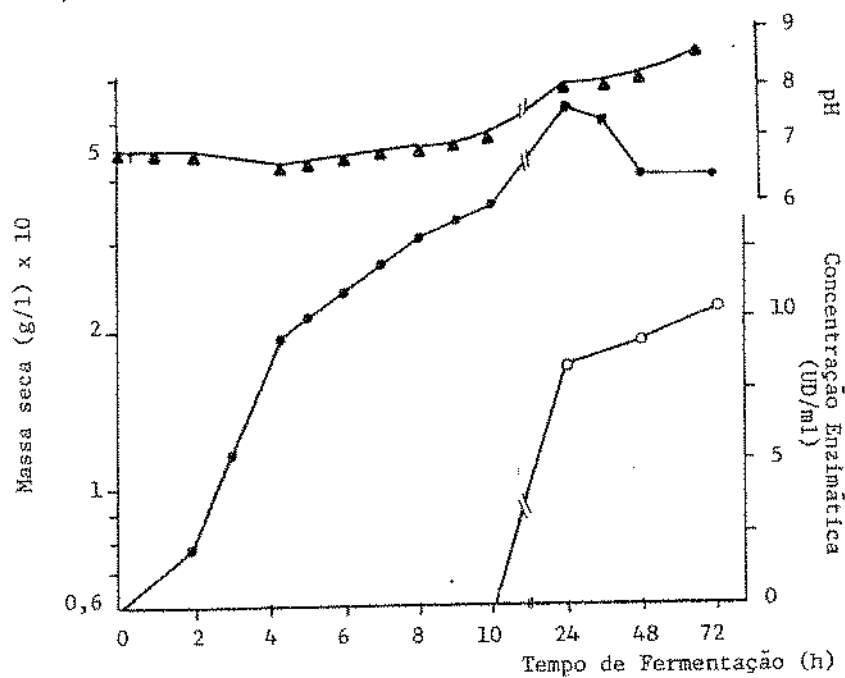


FIGURA 1. Variação do pH (▲), da concentração celular (●) e da concentração enzimática (○) com o tempo de fermentação em meio de cultura básico contendo glicose 0,05g/l, peptona 10,0g/l e extrato de levedura 5,0g/l.

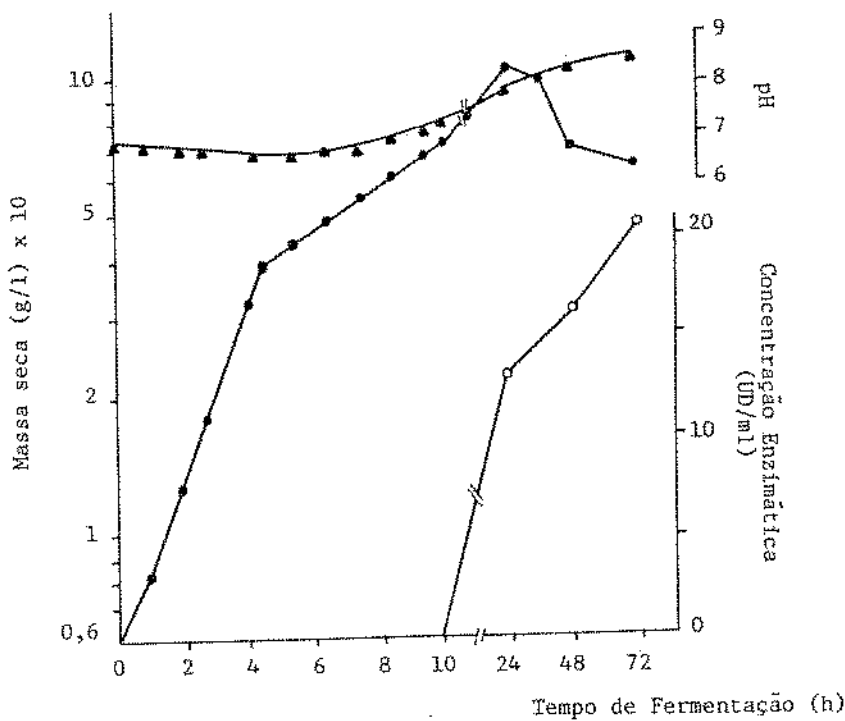


FIGURA 2. Variação do pH (▲), da concentração celular (●) e da concentração enzimática (○) com o tempo de fermentação em meio de cultura básico contendo glicose 0,1g/l, peptona 10,0g/l e extrato de levedura 5,0g/l.

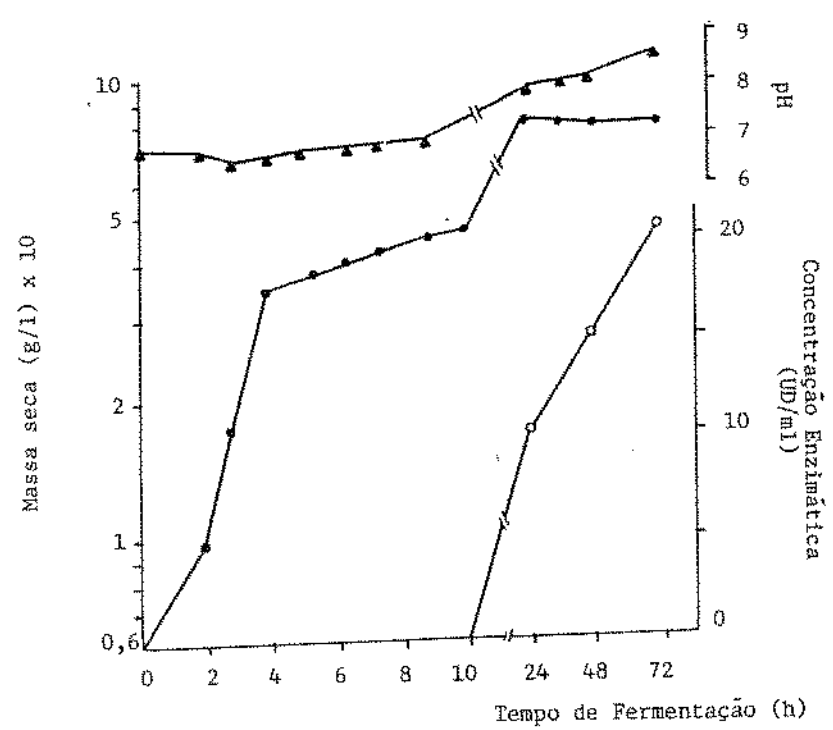


FIGURA 3. Variação do pH (▲), da concentração celular (●) e da concentração enzimática (○) com o tempo de fermentação em meio de cultura básico contendo glicose 0,2g/l, peptona 10,0g/l e extrato de levedura 5,0g/l.

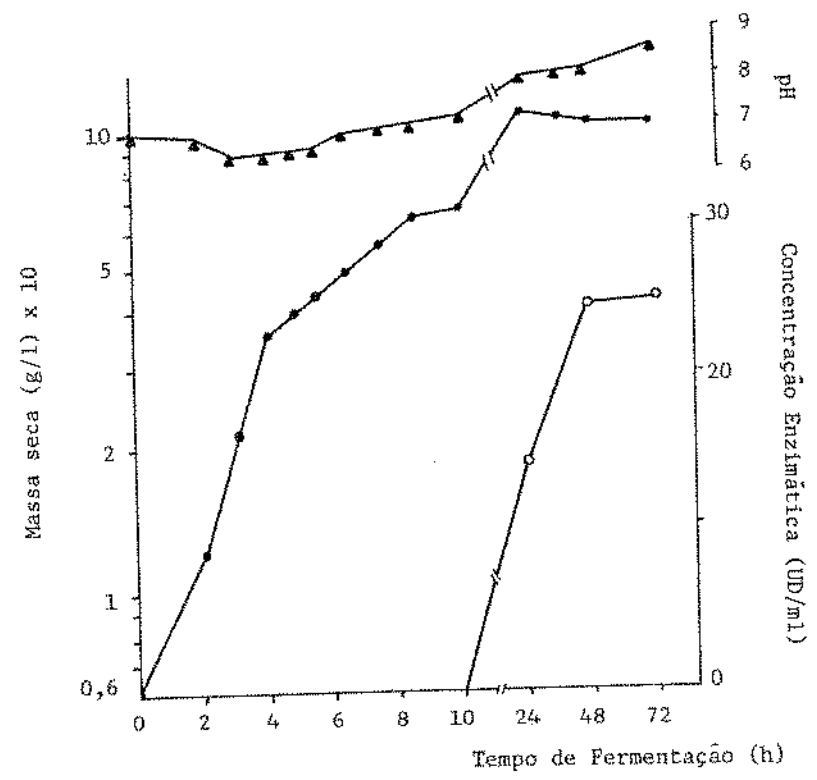


FIGURA 4. Variação do pH (▲), da concentração celular (●) e da concentração enzimática (○) com o tempo de fermentação em meio de cultura básico contendo glicose 0,5g/l, peptona 10,0g/l e extrato de levedura 5,0g/l.

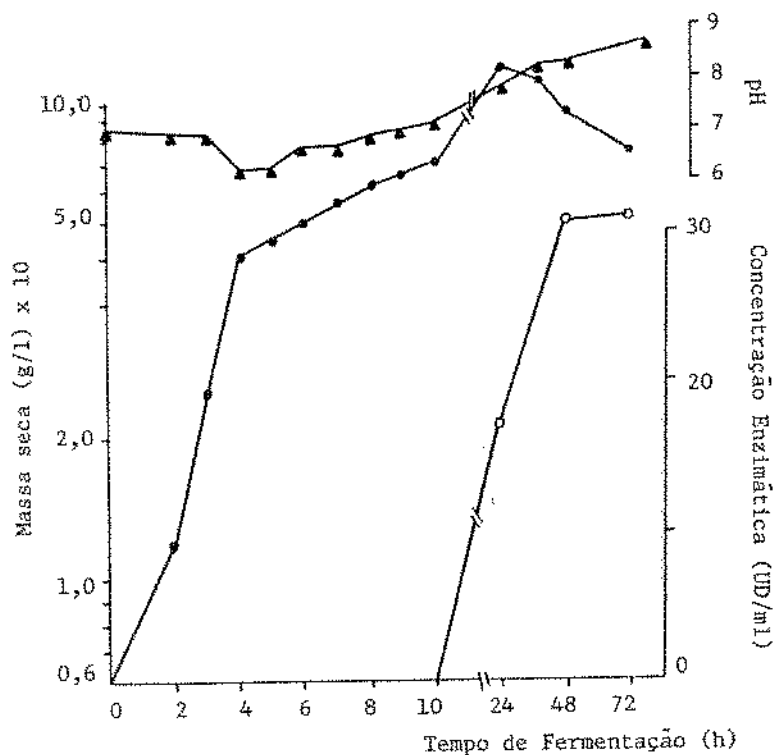


FIGURA 5. Variação do pH (▲), da concentração celular (●) e da concentração enzimática (○) com o tempo de fermentação em meio de cultura básico contendo glicose 0,75g/l, peptona 10,0g/l e extrato de levedura 5,0g/l.

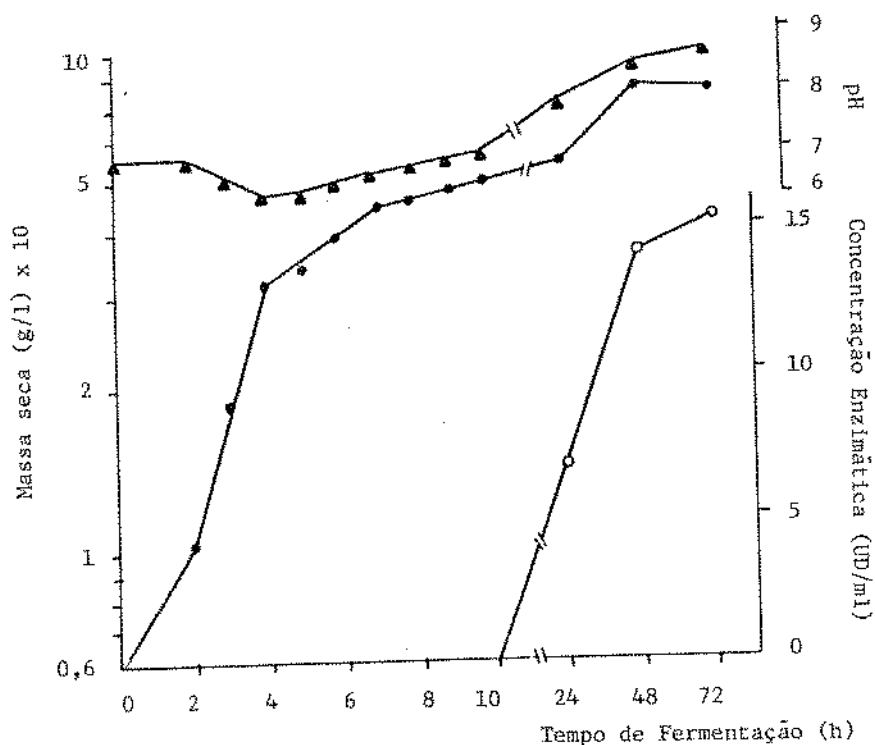


FIGURA 6. Variação do pH (▲), da concentração celular (●) e da concentração enzimática (○) com o tempo de fermentação em meio de cultura básico contendo glicose 1,0g/l, peptona 10,0g/l e extrato de levedura 5,0g/l.

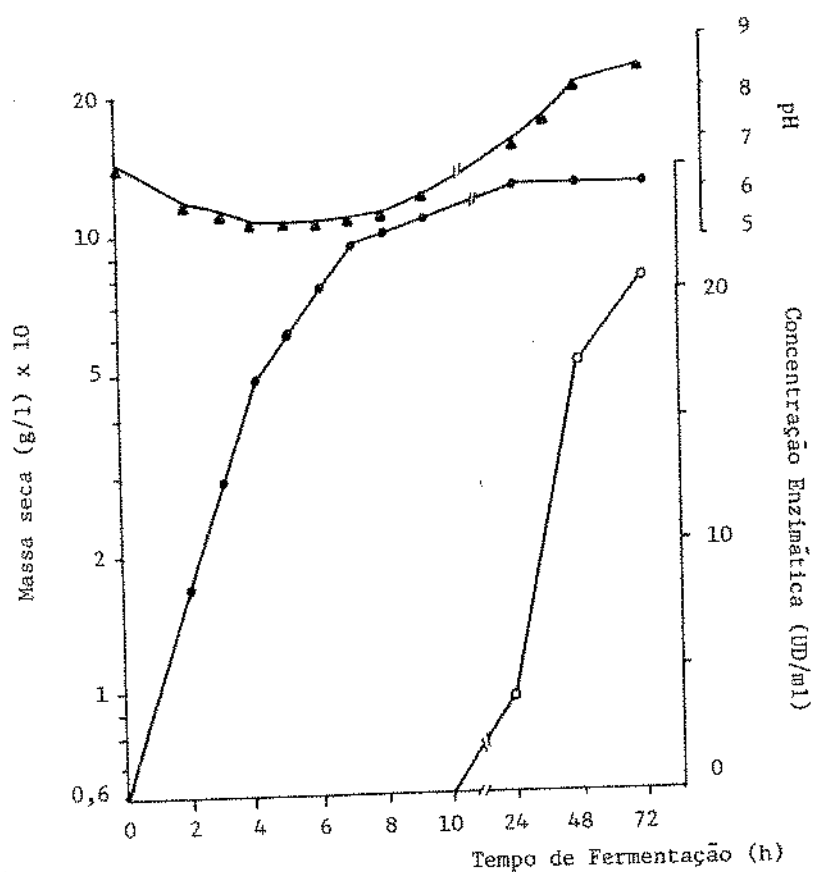


FIGURA 7. Variação do pH (▲), da concentração celular (●) e da concentração enzimática (○) com o tempo de fermentação em meio de cultura básico contendo glicose 10,0g/l, peptona 10,0g/l e extrato de levedura 5,0g/l.

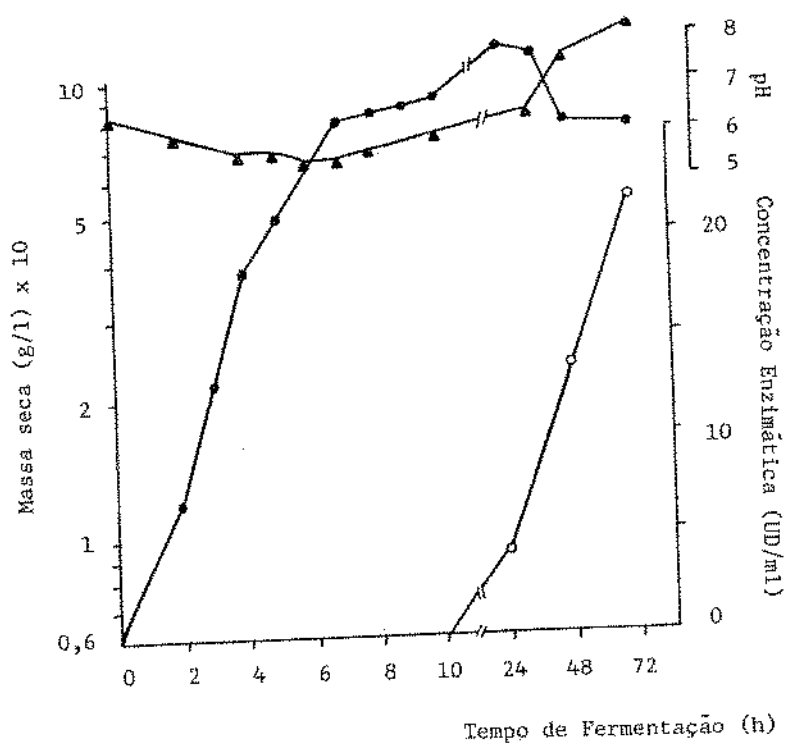


FIGURA 8. Variação do pH (▲), da concentração celular (●) e da concentração enzimática (○) com o tempo de fermentação em meio de cultura básico contendo glicose 20,0g/l, peptona 10,0g/l e extrato de levedura 5,0g/l.

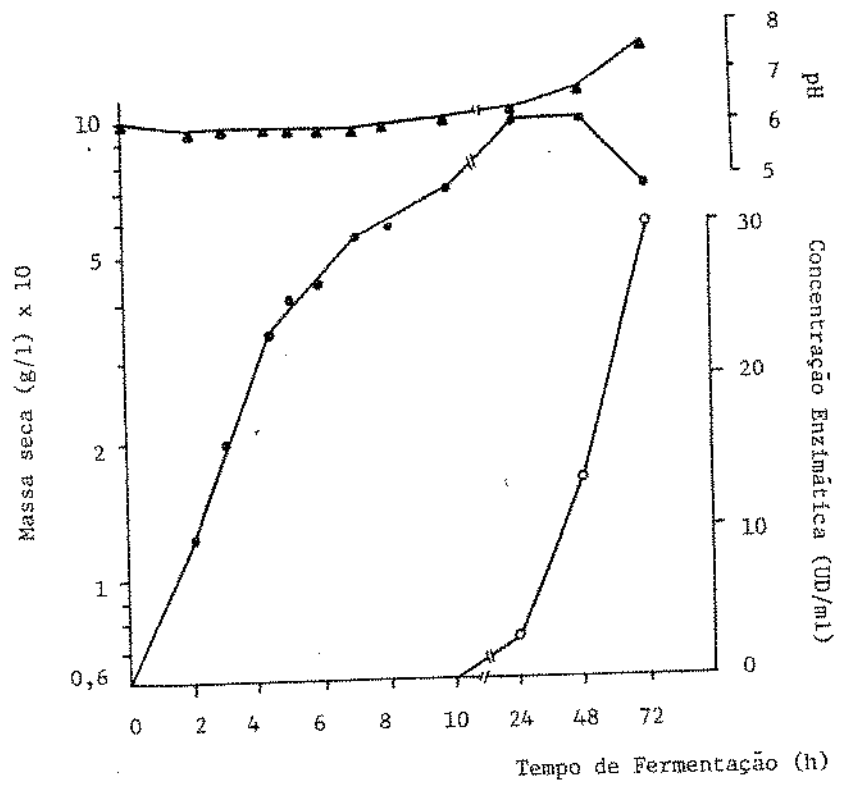


FIGURA 9. Variação do pH (▲), da concentração celular (●) e da concentração enzimática (○) com o tempo de fermentação em meio de cultura básico contendo glicose 30,0g/l, peptona 10,0g/l e extrato de levedura 5,0g/l.

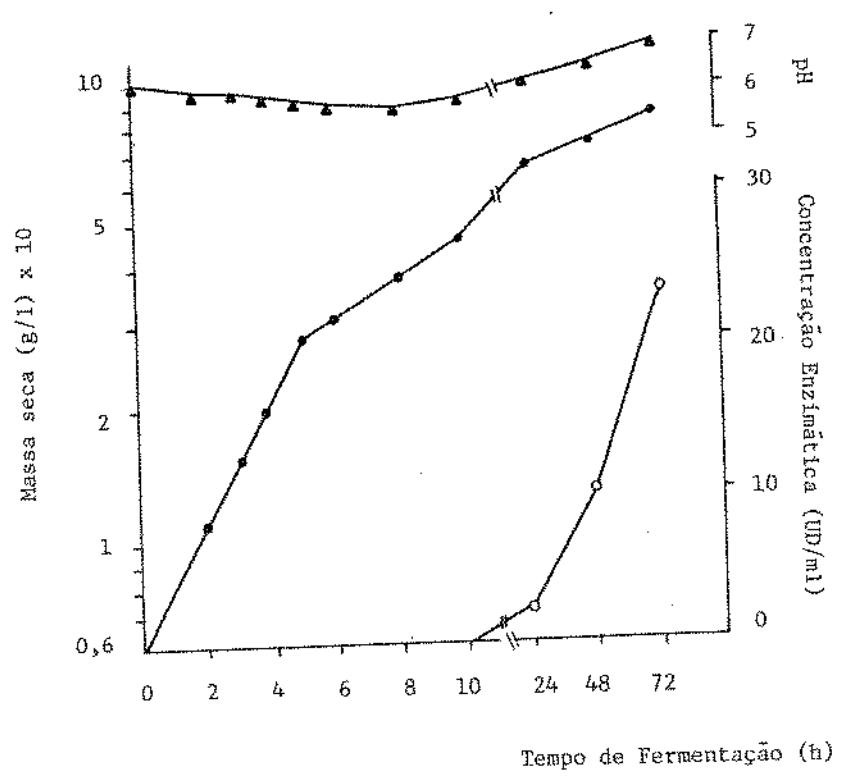


FIGURA 10. Variação do pH (▲), da concentração celular (●) e da concentração enzimática (○) com o tempo de fermentação em meio de cultura básico contendo glicose 40,0g/l, peptona 10,0g/l e extrato de levedura 5,0g/l.

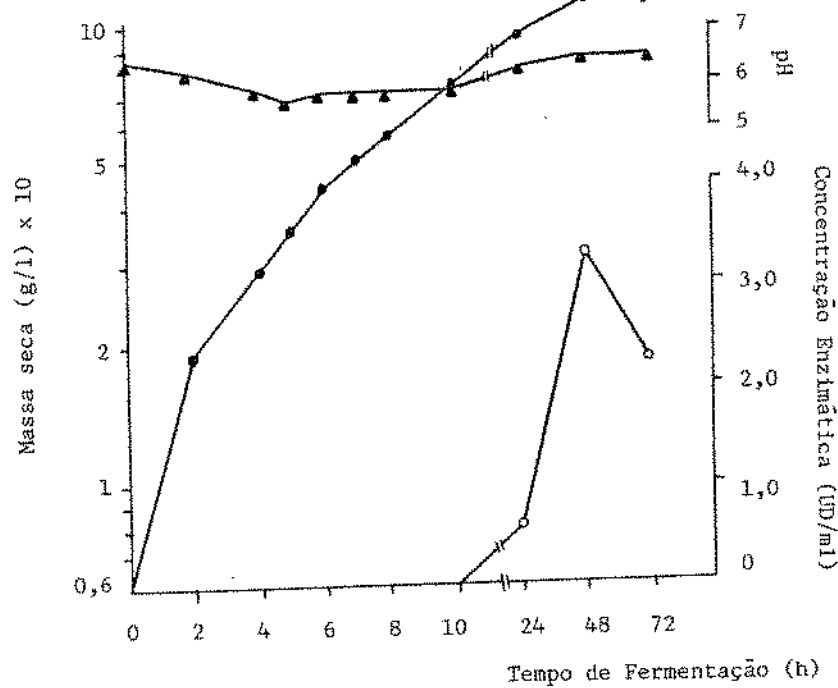


FIGURA 11. Variação do pH (▲-▲), da concentração celular (●-●) e da concentração enzimática (○-○) com o tempo de fermentação em meio de cultura básico contendo glicose 50,0g/l, peptona 10,0g/l e extrato de levedura 5,0g/l.

Observou-se que o crescimento microbiano se dá com mais de uma fase exponencial, com a primeira mudança de inclinação das curvas aparecendo entre 4 e 5 horas de fermentação. Encontram-se na literatura vários trabalhos onde a inclinação da curva que descreve a fase exponencial de crescimento de bactérias cultivadas em batelada muda uma ou mais vezes até atingir a fase estacionária (57, 65). Este comportamento, geralmente chamado de crescimento diáuxico ou triáuxico, tem sido explicado como sendo o resultado do acúmulo ou diminuição de certos fatores que aceleram o crescimento microbiano. Estes fatores podem ser metabólitos, enzimas ou nutrientes que existem no meio de cultura ou dentro da célula. TSAO (57) atribui o crescimento com múltiplas fases exponenciais em meio de cultura contendo glicose e extrato de levedura à presença de certos aminoácidos, peptídeos, vitaminas e ácidos orgânicos neste último componente.

Das concentrações iniciais de glicose estudadas apenas a 50,0g/l (Figura 11) ocorre uma redução da concentração da enzima entre 48 e 72 horas de fermentação, indicando uma inativação enzimática. É possível que essa inativação se deva ao fato de que nesse meio de cultura sejam favorecidas as sínteses de proteases ou metabólitos que degradam ou inativam a enzima. Assim, YOO *et alii* (70) observaram, que a α -amilase de *Bacillus amyloliquefaciens* é inativada pela protease sintetizada paralelamente àquela enzima no processo fermentativo. Por sua vez, ALAM *et alii* (1) verificaram que a α -amilase produzida por *Bacillus amyloliquefaciens* é inibida por propionato, lactato e 2,3 butanediol igualmente sintetizados durante o processo fermentativo. É, porém, menos provável que a inativação da α -amilase sintetizada por *Bacillus subtilis* ATCC 601B, nas condições do experimento, se deva a uma ação proteolítica. Trabalhos de-

envolvidos por STEIN *et alii* (56), ALAM *et alii* (1) e DANCER *et alii* (16) atestam que a α -amilase bruta em meio de cultura contendo cálcio é resistente à proteólise.

A produtividade de α -amilase foi maior nas primeiras 24 horas de fermentação para as concentrações iniciais de glicose compreendidas entre 0,05g/l e 0,75g/l, conforme os resultados apresentados no Quadro II. A partir da concentração inicial igual a 1,0g/l a produção de enzima é retardada. Observou-se uma maior produtividade enzimática entre 24 e 48 horas de fermentação em concentrações iniciais de glicose iguais a 1,0g/l e 10,0g/l e entre 48 e 72 horas para concentrações iniciais do açúcar iguais a 20,0g/l, 30,0g/l e 40,0g/l. Esses resultados mostram no conjunto que a síntese de α -amilase sofre repressão catabólita que se acentua à medida que a concentração inicial do substrato no meio de cultura aumenta. Ademais, analisando os resultados das Figuras 1 a 11 juntamente com os do Quadro II, observa-se que a síntese da enzima ocorre tanto pela redução da concentração celular no meio de cultura. Do mesmo modo, esses resultados sugerem que concentrações iniciais elevadas de glicose no meio de cultura podem ser responsáveis pelo atraso da síntese enzimática.

Vários pesquisadores desenvolveram trabalhos com o objetivo de estudar o efeito inibidor da glicose sobre a síntese de α -amilase. YOO *et alii* (79) fizeram um estudo da produção de α -amilase como função da concentração celular no meio de cultura. Esses pesquisadores observaram que a concentrações iniciais de glicose iguais a 1,0g/l, 4,0g/l e 8,0g/l a taxa específica de produção de enzima $(\frac{1}{x} \cdot \frac{dE}{dt})$ diminui com aumento da concentração inicial de açúcar. Segundo eles, esses resultados indicam uma repressão catabólita da síntese enzimática por

QUADRO TI . Efeito da concentração inicial de glicose no meio de cultura sobre a produtividade de α -amilase produzida por *Bacillus subtilis* ATCC 601B.

CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE (g/l)	PRODUTIVIDADE -P ($\frac{UD}{mg.h}$) *		
	P (0-24)h	P (24-48)h	P (48-72)h
0,05	0,50	0,21	0,09
0,10	0,50	0,12	0,17
0,20	0,51	0,23	0,26
0,50	0,54	0,38	0,02
0,75	0,53	0,42	0,03
1	0,53	0,76	0,05
10	0,12	0,44	0,11
20	0,14	0,46	0,74
30	0,12	0,44	0,68
40	0,14	0,43	0,64
50	0,03	0,10	0

*UD = unidade de atividade dextrinizante

mg = massa celular máxima produzida até 24,48 ou 72 horas de fermentação

Bacillus amyloliquefaciens. ALAM *et alii* (1) analisaram os resultados obtidos em fermentações com concentrações iniciais de glicose compreendidas entre 0,0g/l e 20,0g/l através da produtividade enzimática. Nesse trabalho a produtividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima produzida por unidade de tempo por unidade de massa celular. Da mesma forma, os pesquisadores concluíram que concentrações iniciais crescentes de glicose causavam uma redução da produtividade enzimática para *Bacillus amyloliquefaciens*. A inibição da síntese de α -amilase por glicose foi observada também por FUKUMOTO *et alii* (20), GRUENINGER *et alii* (23), CHANDRA *et alii* (9) e SAITO *et alii* (51).

A quantidade de enzima produzida em 72 horas de fermentação (E_{max}) aumenta linearmente com o aumento da concentração celular máxima observada nesse intervalo de tempo para concentrações iniciais de glicose compreendidas entre 0,05g/l e 1,0g/l (Figura 12). Para a faixa de concentração de glicose compreendida entre 10g/l e 30,0g/l a concentração da enzima, cuja síntese é retardada para concentrações crescentes do açúcar, relaciona-se inversamente com a concentração celular máxima. Pode-se observar pela Figura 13 que, na faixa de concentração de glicose compreendida entre 10,0 e 30,0g/l, um aumento da concentração inicial do açúcar resulta em uma redução da concentração celular máxima mas em um aumento da concentração enzimática máxima. Ambos os conjuntos de resultados sugerem que a síntese de α -amilase por *Bacillus subtilis* ATCC 601B, embora retardada para concentrações iniciais crescentes de glicose, uma vez reduzida a concentração do açúcar repressor é desreprimada, podendo ser até mesmo estimulada quando as concentrações iniciais de glicose são elevadas. Nesse caso uma possível explicação para o

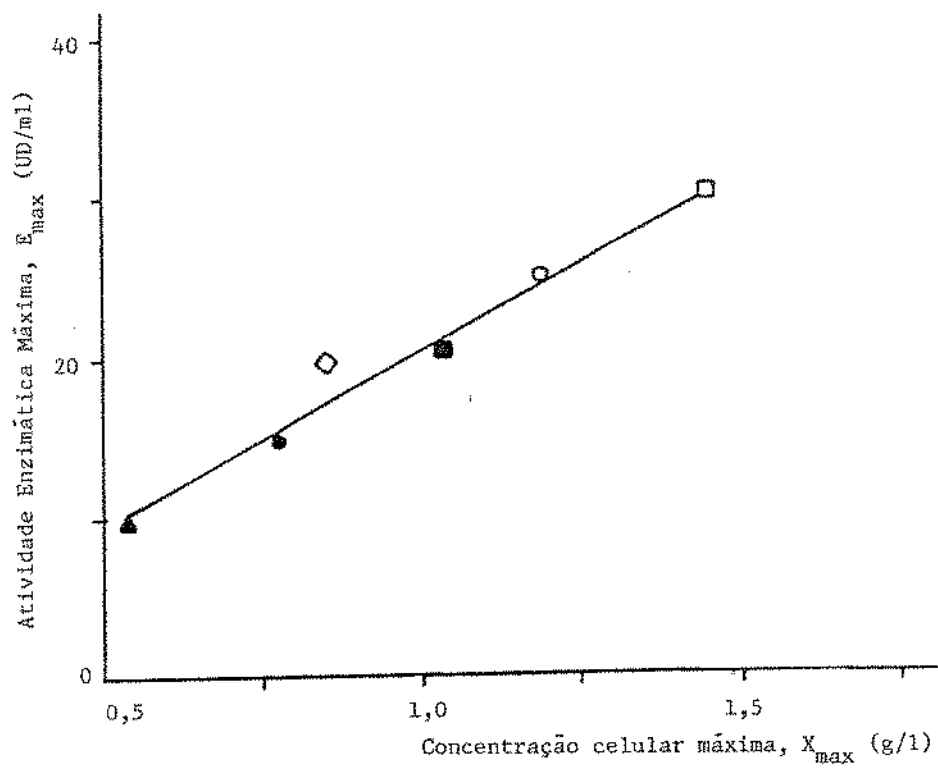


FIGURA 12. Variação da concentração enzimática máxima em função da concentração celular máxima atingida em meios de cultura com diferentes concentrações iniciais de glicose ▲ glicose 0,05g/l, ● glicose 1,0g/l, ◇ glicose 0,2g/l, ■ glicose 0,1g/l, ○ glicose 0,5g/l, □ glicose 0,75g/l.

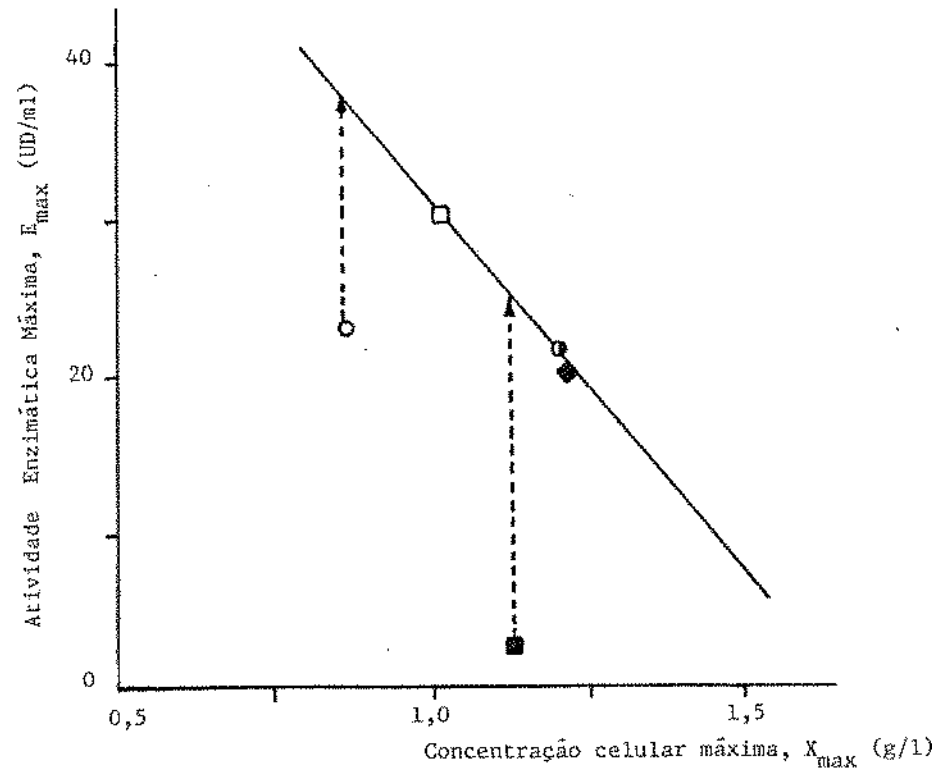


FIGURA 13. Variação da concentração enzimática máxima em função da concentração celular máxima atingida em diferentes meios de cultura com diferentes concentrações iniciais de glicose. ◆ glicose 10,0g/l, ○ glicose 20,0g/l, □ glicose 30,0g/l, ○ glicose 40,0g/l, ■ glicose 50g/l.

observado é que a glicose inibe a síntese enzimática, mas durante o processo fermentativo algum metabólito formado a estimula. SAITO *et alii* (51) trabalhando com *Bacillus licheniformis* admitiram também a possibilidade de que durante o processo fermentativo fosse formado algum metabólito estimulador da síntese enzimática.

Para concentrações iniciais de glicose iguais a 40g/l e 50g/l, observa-se um forte efeito negativo da elevada concentração do açúcar sobre a síntese da enzima. A essas concentrações iniciais do açúcar, uma redução da concentração celular máxima é acompanhada de uma grande redução da concentração enzimática máxima. Se o comportamento da síntese enzimática a 40,0g/l e 40,0g/l fosse o mesmo observado para concentrações iniciais iguais a 10,0g/l, 20,0g/l e 30,0g/l, as concentrações enzimáticas máximas àquelas concentrações iniciais de glicose deveriam ser da ordem de 38 UD/ml e 25 UD/ml (Unidades de atividade dextrinizante por mililitro) e não de 23 UD/ml e 2 UD/ml, como foi observado. Provavelmente ao menos em parte, esta inibição observada é consequência da glicose ainda presente no meio de cultura após 72 horas de fermentação, haja visto que a 40,0g/l após esse tempo de fermentação o microrganismo ainda está em fase de crescimento.

Vários pesquisadores afirmam que a glicose pode ser uma boa fonte de carbono para a produção de α -amilase, desde que empregada em concentrações iniciais da ordem de 0,01 a 0,05% (9, 20), acima das quais a síntese da enzima é fortemente inibida. Os resultados obtidos com *Bacillus subtilis* ATCC 601B revelam que acima dessa faixa de concentração inicial do açúcar, começa a haver realmente uma inibição da síntese enzimática que se estende até a concentração inicial de 40g/l (Quadro II). A

síntese da enzima, no entanto ocorre mesmo a concentrações iniciais de glicose dessa ordem somente que a tempos mais prolongados de fermentação.

4.1.b. Efeito da concentração de amido solúvel

Com relação ao papel dos carboidratos na síntese de α -amilase, tem sido observada uma tendência de polissacarídeos como amido solúvel, dextrina e glicogênio proporcionarem uma maior produção da enzima por *Bacillus* do que mono ou dissacarídeos como glicose, frutose, lactose, galactose e sacarose (9, 13, 18, 58). Não se sabe, no entanto, se nesses casos são os polissacarídeos adicionados ao meio de cultura em si, ou se são os seus produtos de degradação ou metabólitos formados durante a fermentação, que estimulam a síntese da enzima.

Neste trabalho foi observado que *Bacillus subtilis* ATCC 601B se desenvolveu e produziu α -amilase em meio de cultura contendo amido solúvel como fonte de carbono conforme as Figuras 14 a 21.

Como aconteceu em meio de cultura contendo glicose e extrato de levedura, o microrganismo cresceu em meio de cultura contendo amido solúvel e extrato de levedura também com mais de uma fase exponencial de crescimento. O fator que determina esse comportamento pode ser o mesmo que o determina em meio de cultura contendo glicose como fonte de carbono, qual seja, a composição do extrato de levedura, ou ainda o consumo preferencial de diferentes carboidratos provenientes da hidrólise do amido.

Para as concentrações iniciais de amido solúvel compreendidas entre 0,5g/l e 2,0g/l, a maior produtividade enzimática ocorre nas primeiras 24 horas de fermentação; entre 5,0g/l e 20,0g/l se dá entre 24 e 48 horas de fermentação; a 30,0g/l

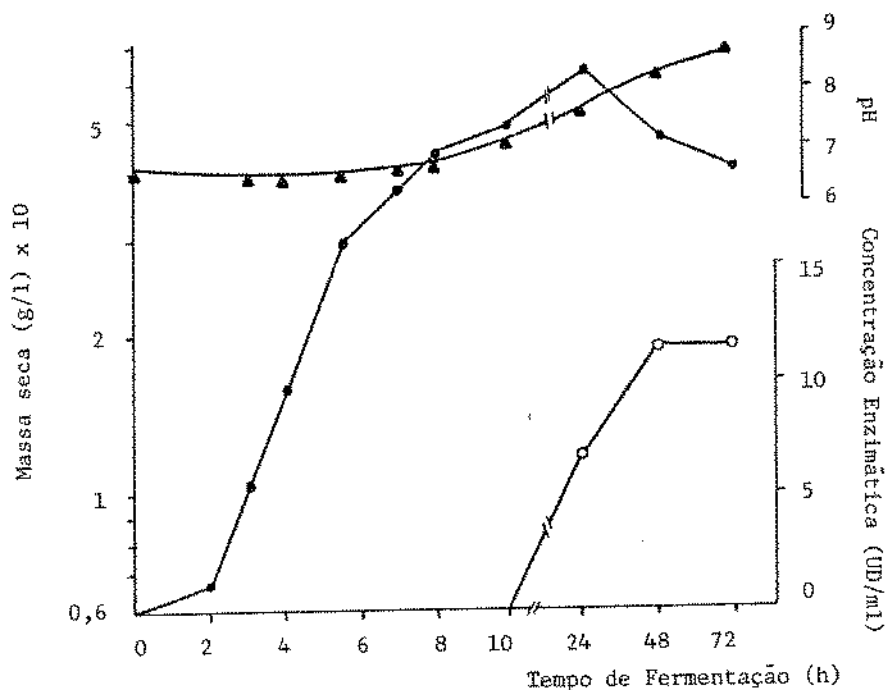


FIGURA 14. Variação do pH ($\blacktriangle$), da concentração celular ($\bullet$) e da concentração enzimática ($\circ$) com o tempo de fermentação em meio de cultura básico contendo amido solúvel 0,5g/l, peptona 10,0g/l e extrato de levedura 5,0g/l.

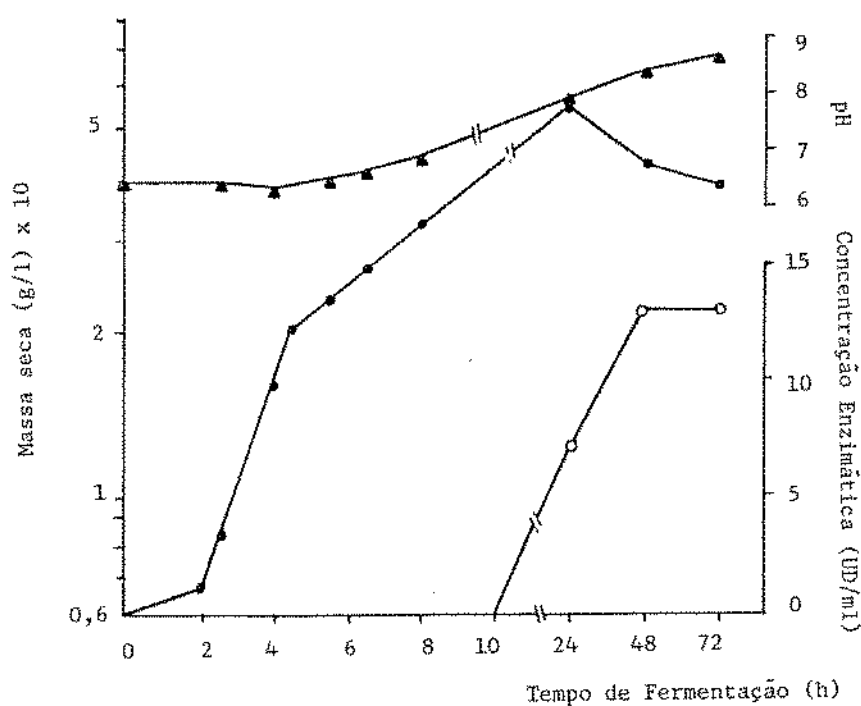


FIGURA 15. Variação do pH ($\blacktriangle$), da concentração celular ($\bullet$) e da concentração enzimática ($\circ$) com o tempo de fermentação em meio de cultura básico contendo amido solúvel 1,0g/l, peptona 10,0g/l e extrato de levedura 5,0g/l.

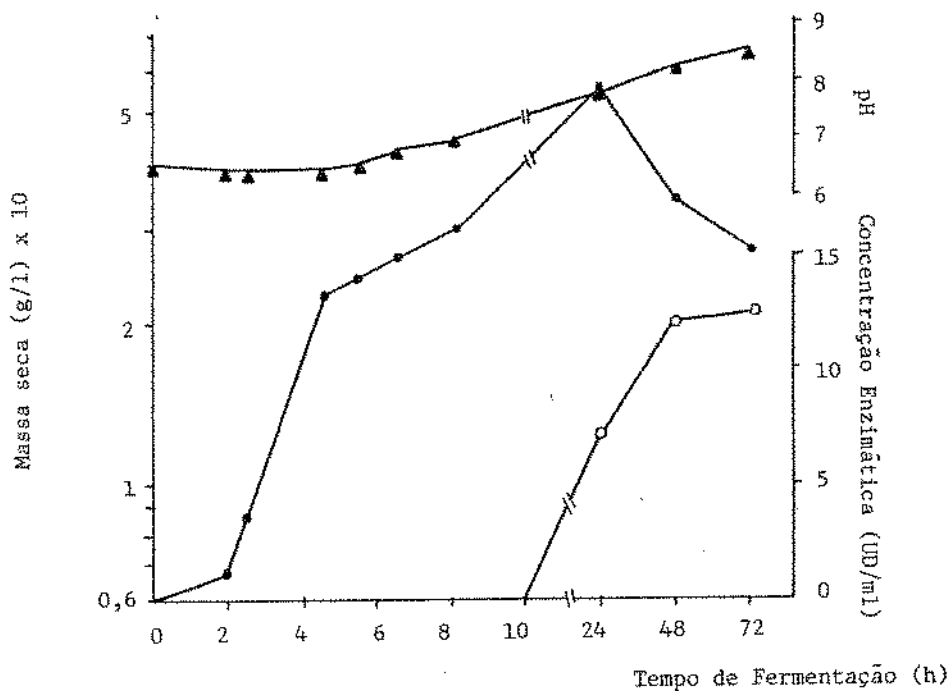


FIGURA 16. Variação do pH (▲) da concentração celular (●) e da concentração enzimática (○) com o tempo de fermentação em meio de cultura básico contendo amido solúvel 1,5g/l, peptona 10,0g/l e extrato de levedura 5,0g/l.

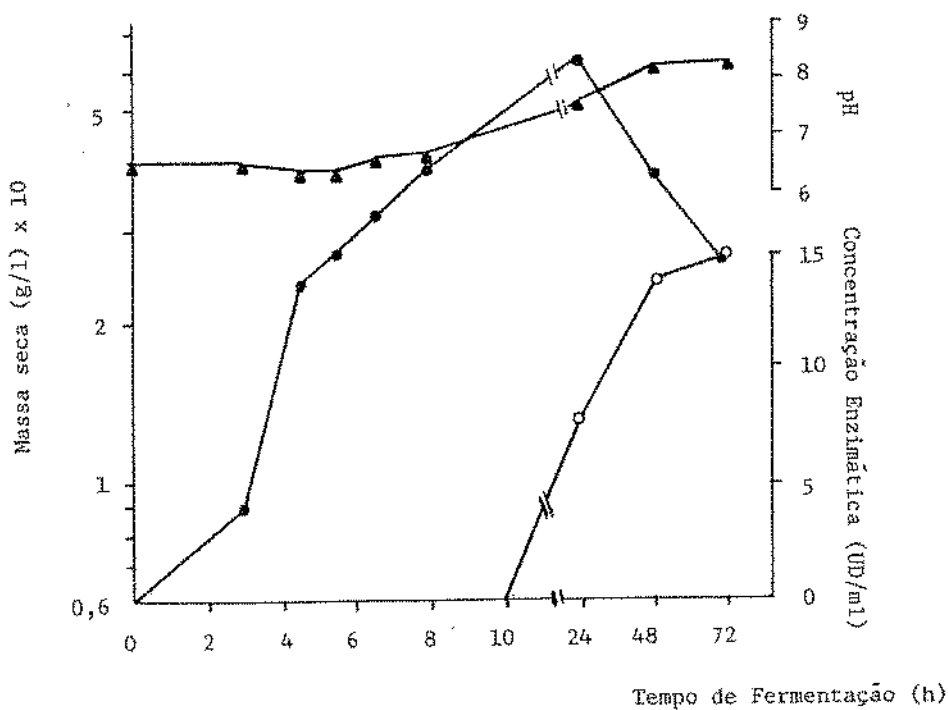


FIGURA 17. Variação do pH (▲), da cocncentração celular (●) e da concentração enzimática (○) com o tempo de fermentação em meio de cultura básico contendo amido solúvel 2,0g/l, peptona 10,0g/l e extrato de levedura 5,0g/l.

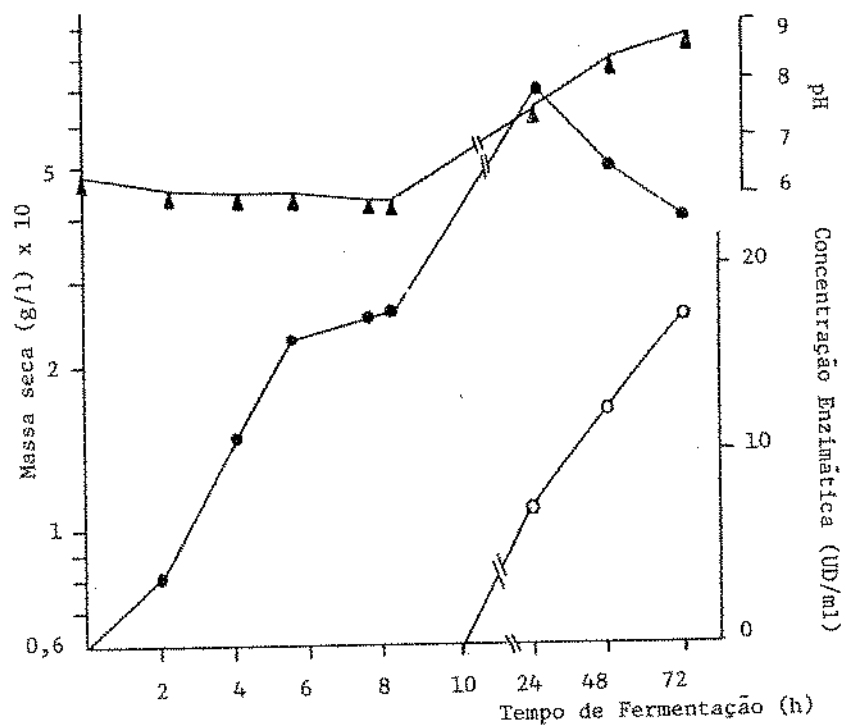


FIGURA 18. Variação do pH (▲), da concentração celular (●) e da concentração enzimática (○) com o tempo de fermentação em meio de cultura básico contendo amido solúvel 5,0g/l, peptona 10,0g/l e extrato de levedura 5,0g/l.

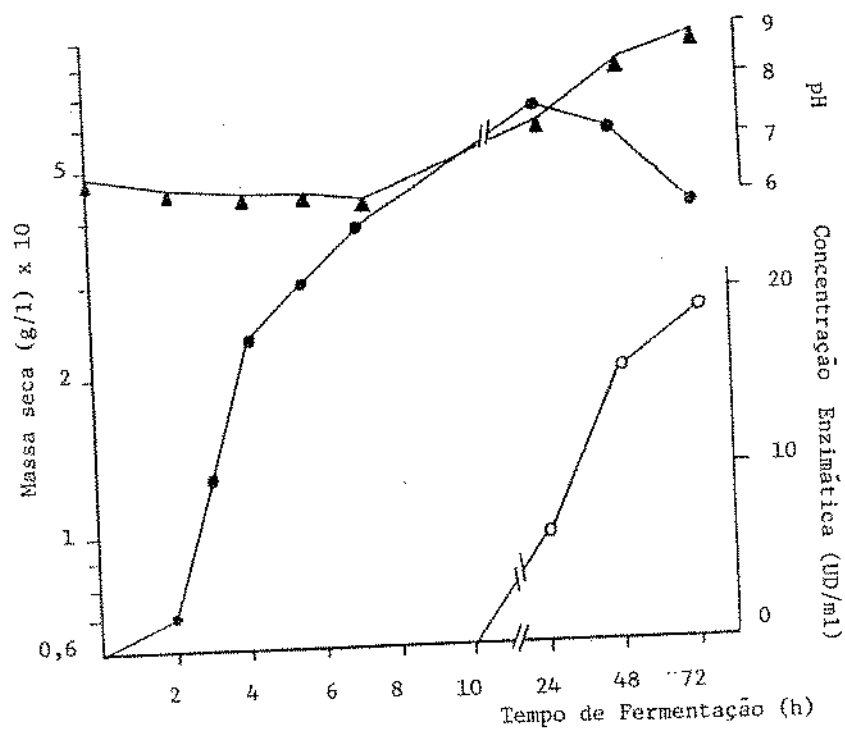


FIGURA 19. Variação do pH (▲), da concentração celular (●) e da concentração enzimática (○) com o tempo de fermentação em meio de cultura básico contendo amido solúvel 10,0g/l, peptona 10,0g/l e extrato de levedura 5,0g/l.

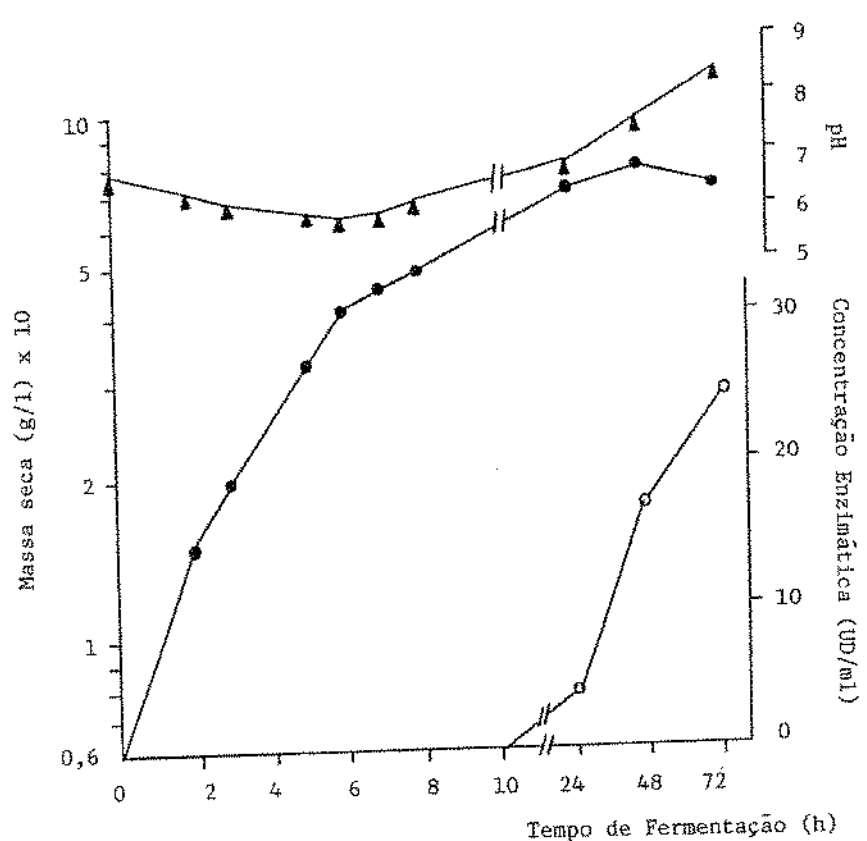


FIGURA 20. Variação do pH (▲), da concentração celular (●) e da concentração enzimática (○) com o tempo de fermentação em meio de cultura básico contendo amido solúvel 20,0g/l, peptona 10,0g/l e extrato de levedura 5,0g/l.

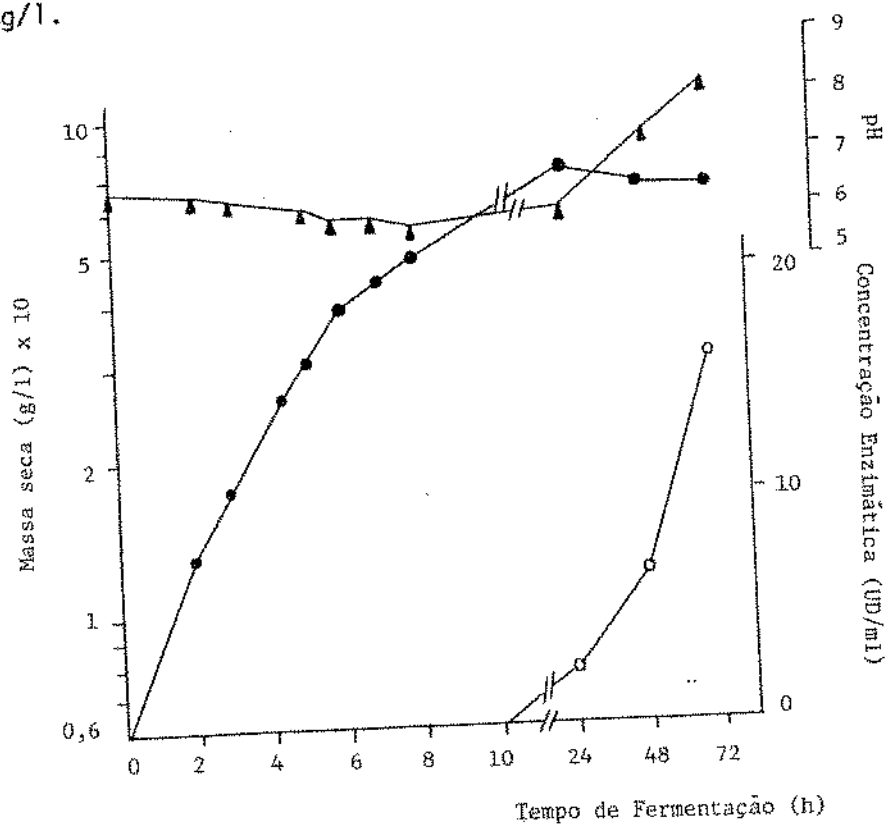


FIGURA 21. Variação do pH (▲), da concentração celular (●) e da concentração enzimática (○) com o tempo de fermentação em meio de cultura básico contendo amido solúvel 30,0g/l, peptona 10,0g/l e extrato de levedura 5,0g/l.

se dá entre 48 e 72 horas (Quadro III). Assim, a medida que se aumenta a concentração de amido solúvel no meio de cultura mais tardiamente a α -amilase é sintetizada pelo microrganismo, num comportamento semelhante ao observado quando se utilizou glicose como substrato. Esses resultados revelam igualmente uma repressão da síntese enzimática quando se utiliza amido solúvel como fonte de carbono. É possível, porém, que o inibidor real da síntese de α -amilase não seja o amido solúvel em si, e sim algum produto de sua degradação pela enzima sintetizada constitutivamente. YOO *et alii* (70) observaram, por exemplo, que a maltose causa repressão da síntese de α -amilase por *Bacillus amyloliquefaciens*.

O emprego de amido solúvel como fonte de carbono, parece causar uma menor repressão da síntese de α -amilase por *Bacillus subtilis* ATCC 601B do que a glicose. Nas concentrações iniciais dos carboidratos iguais a 10g/l e 30g/l tem-se que, nas primeiras 24 horas de fermentação, 17,5% e 9,4% do total de enzima produzida são formados, respectivamente, em meio de cultura contendo glicose. Em meio de cultura contendo amido aquelas duas concentrações iniciais são formados 33% e 14% respectivamente. Essa diferença de respostas à mesma concentração inicial das duas diferentes fontes de carbono, provavelmente, se deve ao fato de que, a esse tempo de fermentação, apenas uma parcela do amido tenha sido hidrolisado, havendo uma menor concentração do inibidor no meio de cultura.

Alguma evidência de que a síntese de α -amilase é função do carboidrato efetivamente utilizado como fonte de carbono no meio de cultura contendo amido solúvel pode ser obtida do fato que a 0,5g/l, 1,0g/l, 1,5g/l e 2,0g/l a lise celular, avaliada pela redução da concentração celular, é mais acentuada do

QUADRO III. Efeito da concentração inicial de amido solúvel no meio de cultura sobre a produtividade de α -amilase produzida por *Bacillus subtilis* ATCC 601B.

Concentração de amido solúvel g/l	PRODUTIVIDADE $P \left(\frac{UD}{mg \cdot h} \right)^*$		
	P (0-24)h	P (24-48)h	P (48-72)h
0,5	0,43	0,30	0
1,0	0,54	0,44	0,01
1,5	0,52	0,34	0,03
2,0	0,53	0,40	0,06
5,0	0,41	0,49	0,12
10,0	0,41	0,59	0,24
20,0	0,25	0,75	0,30
30,0	0,13	0,25	0,56

* UD = Unidade de atividade dextrinizante

mg = massa celular máxima produzida até 24, 48 ou 72 horas de fermentação

que nos demais meios de cultura. Também, a essas concentrações iniciais de amido, a concentração enzimática varia muito pouco ou permanece constante após 48 horas de fermentação. Do mesmo modo, para as demais concentrações iniciais de amido solúvel, quanto menor é a lise celular maior é a variação da concentração enzimática nas últimas 24 horas do processo fermentativo.

A Figura 22 mostra que para concentrações iniciais de amido solúvel, na faixa de 2,0g/l a 20,0g/l, o total de enzima produzida em 72 horas de fermentação aumenta com o aumento da concentração celular máxima. Esse aumento da concentração enzimática máxima poderia ser reflexo de um estímulo da síntese da enzima ou simplesmente da maior concentração celular.

Os resultados apresentados na Figura 22 mostram ainda que entre 10,0g/l e 20,0g/l embora haja uma razoável diferença entre as concentrações celulares máximas não há um aumento muito elevado da concentração enzimática máxima. Esse resultado sugere que provavelmente a 20,0g/l não se tem um maior estímulo do que a 10,0g/l. À concentração inicial de 30,0g/l observa-se uma concentração enzimática menor do que a obtida a 10,0g/l muito embora a concentração celular seja mais elevada. A esperar o mesmo comportamento da síntese enzimática a concentrações iniciais iguais a 20,0g/l e 30,0g/l obter-se-ia a esta última concentração de amido solúvel uma concentração enzimática máxima igual a 22 UD/ml e não 16 UD/ml como foi observado. Essa representação da síntese de α -amilase provavelmente é consequência de elevadas concentrações do carboidrato inibidor ainda presente no meio de cultura após 72 horas de fermentação.

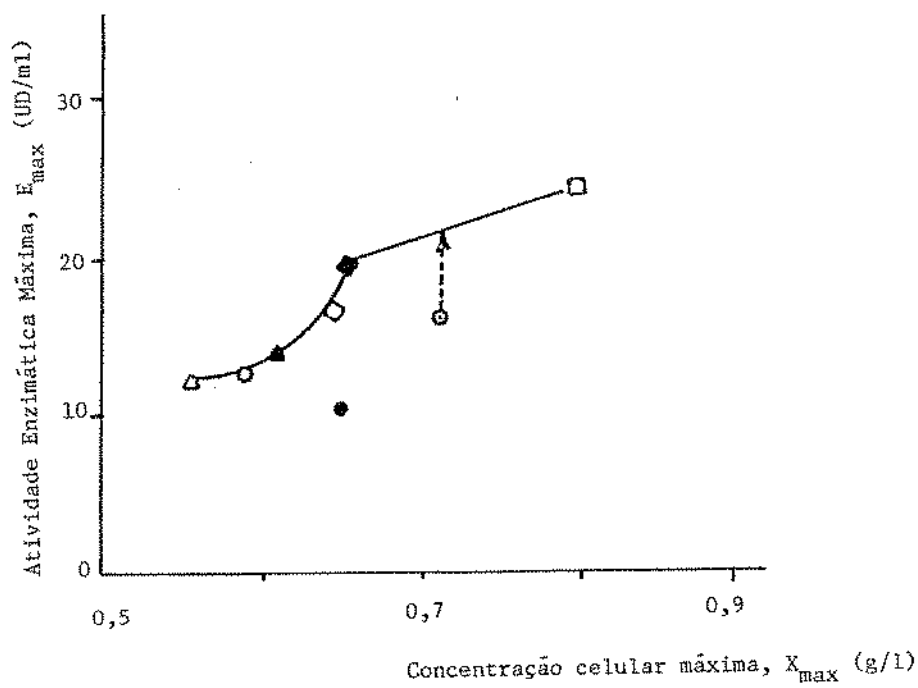


FIGURA 22. Variação da concentração enzimática máxima com a concentração celular máxima atingida em meios de cultura com diferentes concentrações de amido solúvel. ● amido solúvel 0,5g/l, Δ amido solúvel 1,0g/l, ○ amido solúvel 1,5g/l, ▲ amido solúvel 2,0g/l, ◇ amido solúvel 5,0g/l, ◆ amido solúvel 10,0g/l, □ amido solúvel 20,0g/l, ◊ amido solúvel 30,0g/l.

4.1.c. Efeito da concentração de dextrina

Os resultados apresentados nas Figuras 23 a 29 mostram as curvas de crescimento e de produção de α -amilase por *Bacillus subtilis* ATCC 601B em meio de cultura contendo dextrina como fonte de carbono.

Em meio de cultura contendo extrato de levedura e dextrina o crescimento microbiano tem o mesmo perfil observado em meio de cultura contendo glicose e extrato de levedura. Aqui também o crescimento do microrganismo se dá com mais de uma fase exponencial.

Com relação à síntese enzimática foi observada também a sua inibição à medida que se aumenta a concentração inicial do carboidrato no meio de cultura (Quadro IV). Para concentrações iniciais de dextrina compreendidas entre 1,5g/l e 4,0g/l a produtividade enzimática é maior nas primeiras 24 horas de fermentação. Para a concentração inicial de dextrina igual a 10,0g/l a maior produtividade ocorre entre 24 e 48 horas de incubação, para a 20,0g/l e 30,0g/l ocorrer principalmente entre 48 e 72 horas.

Alguma evidência de que existe uma correlação entre a velocidade de síntese de α -amilase e a metabolização do carboidrato de baixo peso molecular efetivamente utilizado como fonte de carbono, pode ser obtida do fato que quanto mais cedo ocorre a lise celular, avaliada pela redução da concentração celular, mais cedo se observa também a síntese enzimática. O efeito da concentração inicial de dextrina sobre a velocidade de síntese de α -amilase por *Bacillus subtilis* ATCC 601B é portanto semelhante ao efeito da concentração inicial de glicose e de amido solúvel. Provavelmente, como já foi discutido para o amido solú

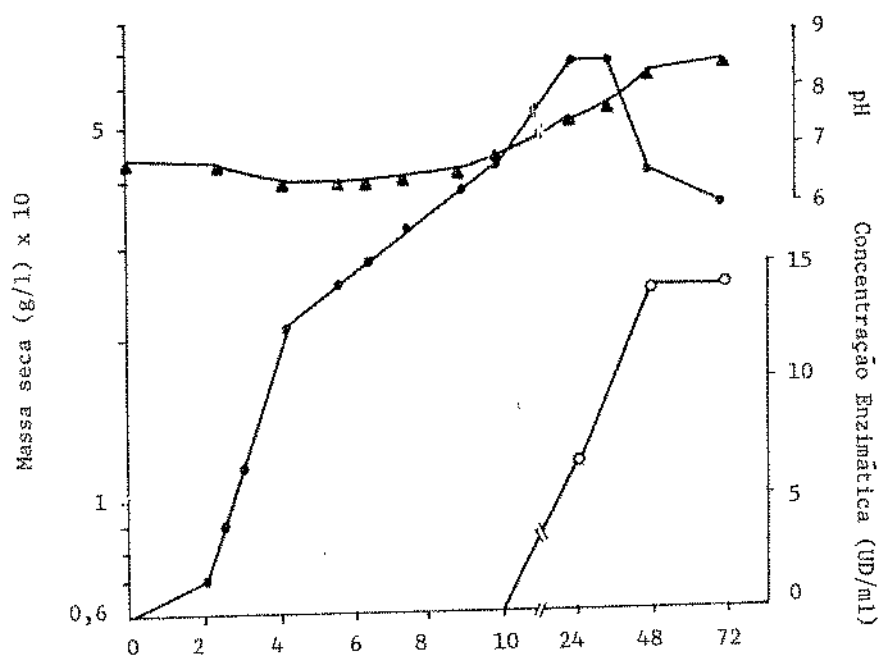


FIGURA 23. Variação do pH (▲), da concentração celular (●) e da concentração enzimática (○) com o tempo de fermentação em meio de cultura básico contendo dextrina 1,0g/l, peptona 10,0g/l e extrato de levedura 5,0g/l.

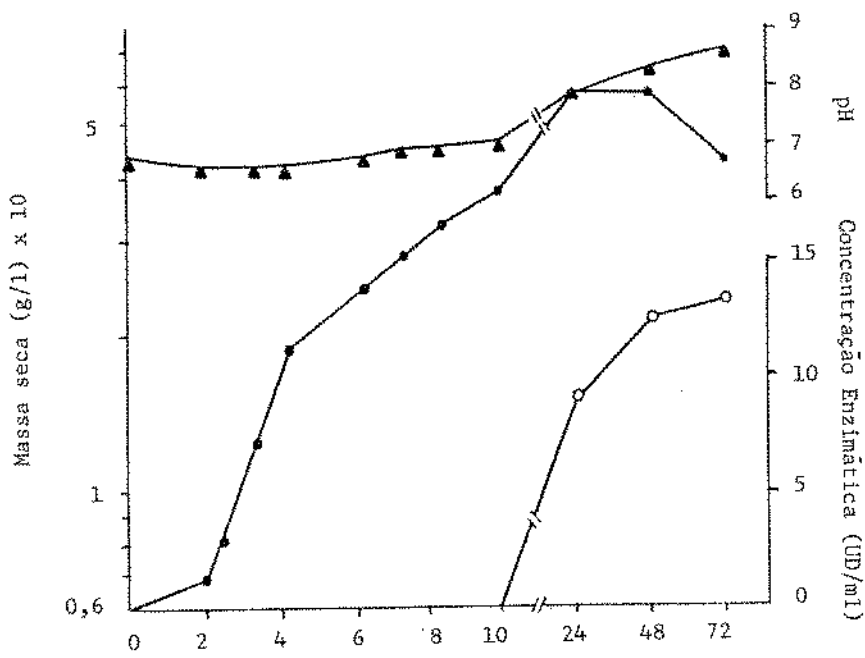


FIGURA 24. Variação do pH (▲), da concentração celular (●) e da concentração enzimática (○) com o tempo de fermentação em meio de cultura básico contendo dextrina 1,5g/l, peptona 10,0g/l e extrato de levedura 5,0g/l.

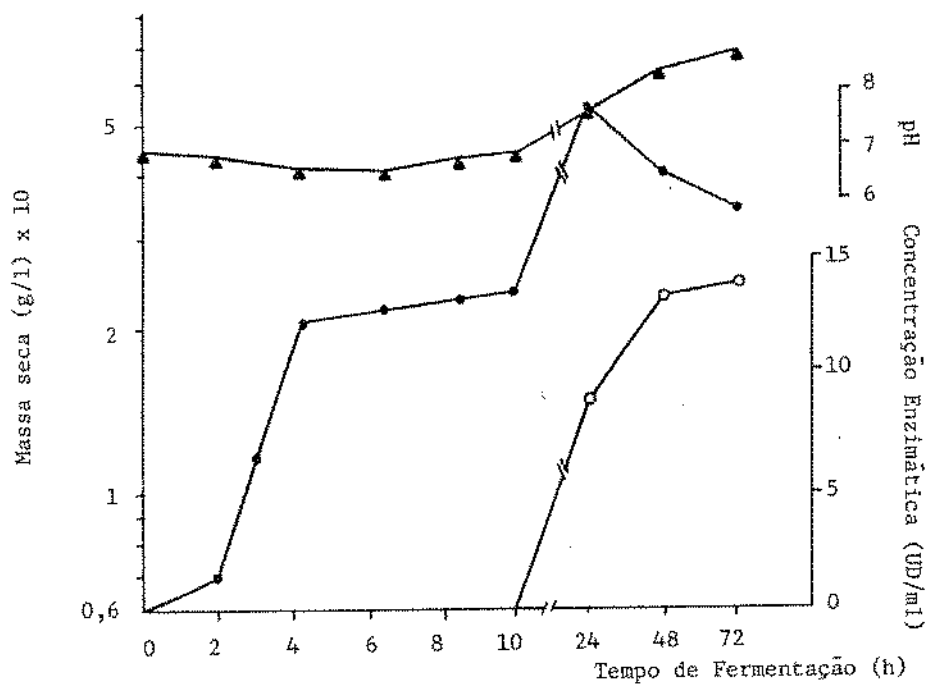


FIGURA 25. Variação do pH (▲), da concentração celular (●) e da concentração enzimática (○) com o tempo de fermentação em meio de cultura básico contendo dextrina 2,0g/l, peptona 10,0g/l e extrato de levedura 5,0g/l.

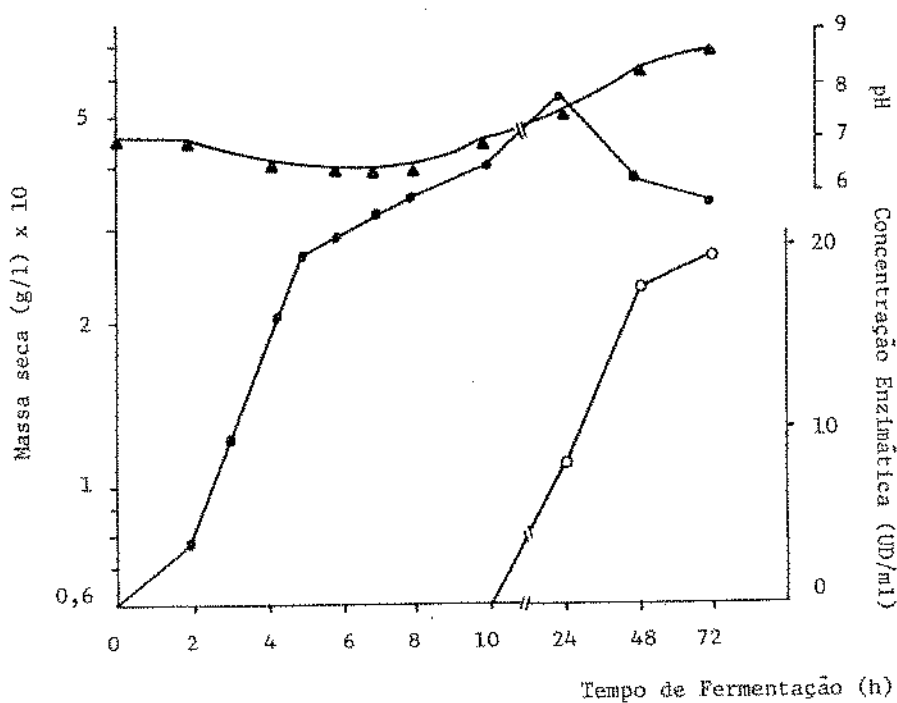


FIGURA 26. Variação do pH (▲), da concentração celular (●) e da concentração enzimática (○) com o tempo de fermentação em meio de cultura básico contendo dextrina 4,0g/l, peptona 10,0g/l e extrato de levedura 5,0g/l.

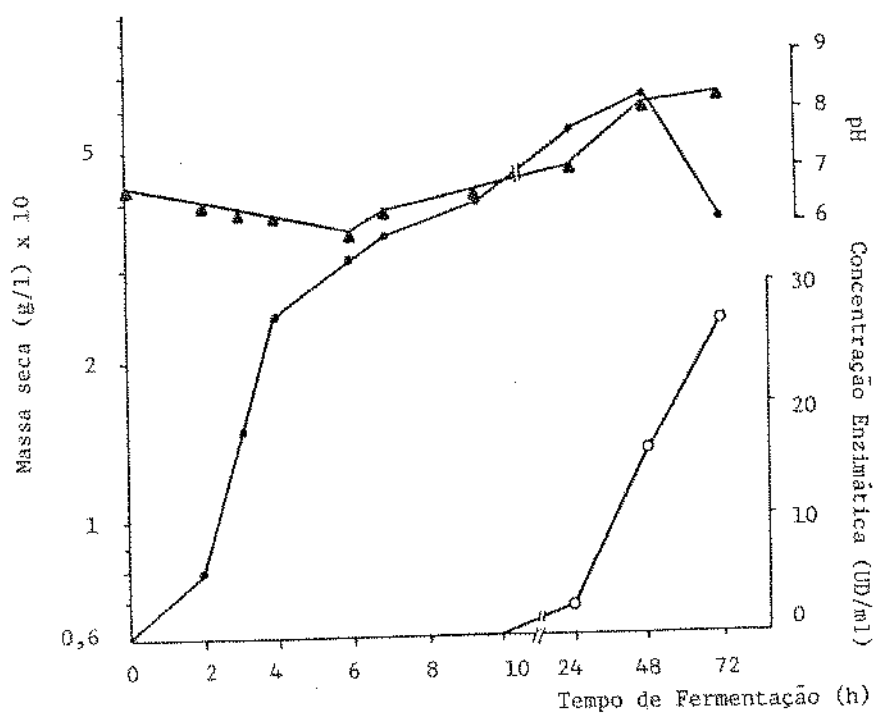


FIGURA 27. Variação do pH (▲), da concentração celular (●) e da concentração enzimática (○) com o tempo da fermentação em meio de cultura básico contendo dextrina 10,0g/l, peptona 10,0g/l e extrato de levedura 5,0g/l.

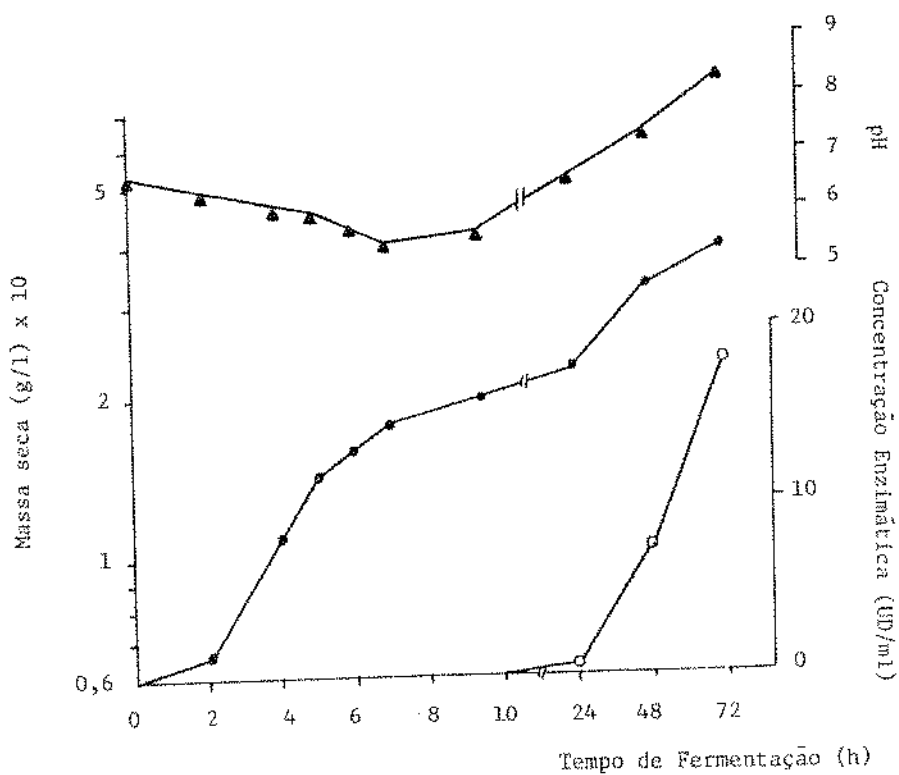


FIGURA 28. Variação do pH (▲), da concentração celular (●) e da concentração enzimática (○) com o tempo de fermentação em meio de cultura básico contendo dextrina 20,0g/l, peptona 10,0g/l e extrato de levedura 5,0g/l.

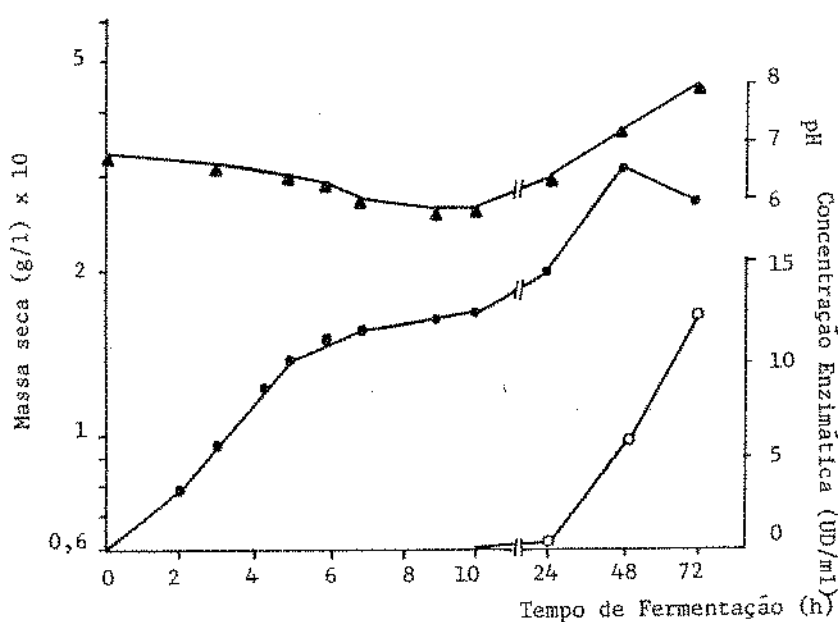


FIGURA 29. Variação do pH (▲), da concentração celular (●) e da concentração enzimática (○) com o tempo de fermentação em meio de cultura básico contendo dextrina 30,0g/l, peptona 10,0g/l e extrato de levedura 5,0g/l.

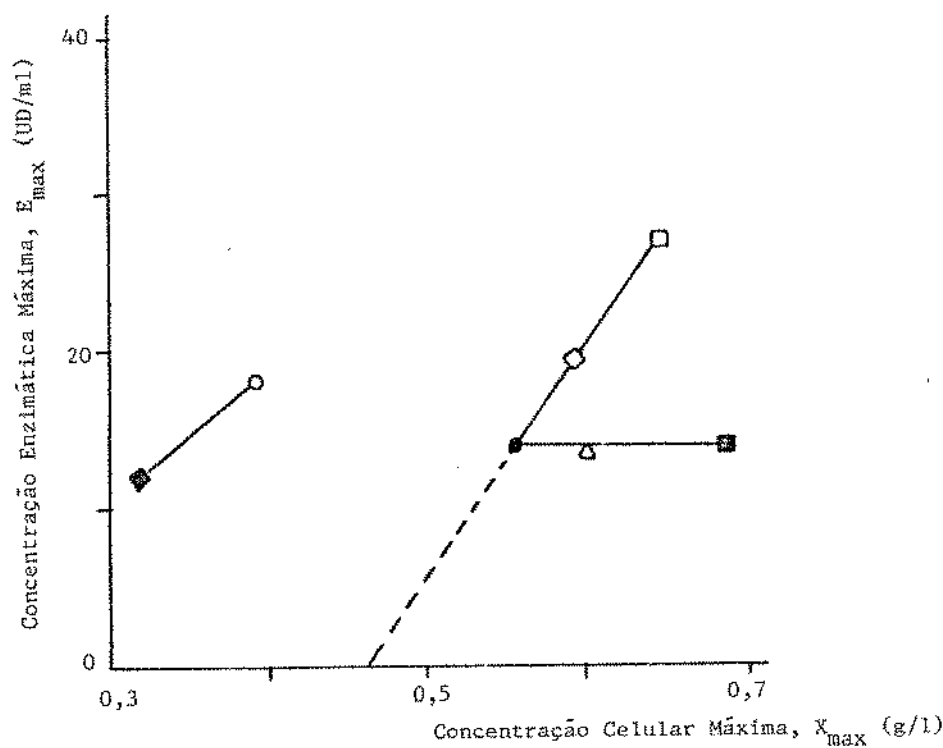


FIGURA 30. Variação da concentração enzimática máxima em função da concentração celular máxima atingida em meio de cultura com diferentes concentrações de dextrina. ■ dextrina 1,0g/l, ▲ dextrina 1,5g/l, ● dextrina 2,0g/l, ◇ dextrina 4,0g/l, □ dextrina 10,0g/l, ○ dextrina 20,0g/l, ◆ dextrina 30,0g/l.

QUADRO IV. Efeito da concentração inicial de dextrina no meio de cultura sobre a produtividade de α -amilase produzida por *Bacillus subtilis* ATCC 601B.

Concentração de dextrina g/l	PRODUTIVIDADE $P \left(\frac{UD}{mg \cdot h} \right)^*$		
	P (0-24) h	P (24-48) h	P (48-72) h
1,0	0,40	0,45	0,0
1,5	0,64	0,26	0,05
2,0	0,66	0,33	0,05
4,0	0,63	0,63	0,13
10,0	0,18	0,88	0,71
20,0	0,09	0,84	1,14
30,0	0,10	0,69	0,85

* UD = Unidade de atividade dextrinizante

mg = Massa celular sua máxima produzida até 24, 48 ou 72 horas de fermentação

vel, os inibidores da síntese enzimática, em meio de cultura contendo dextrina como fonte de carbono, são carboidratos de baixo peso molecular, como maltose por exemplo, resultantes da ação da α -amilase sobre o polissacarídeo.

Apesar de elevadas concentrações de dextrina causa-rem um atraso da síntese enzimática, o total de enzima produzi-da aumenta com o aumento da concentração inicial de dextrina na faixa de 1,0g/l a 10,0g/l (Figuras 23 a 27). Esse aumento da concentração enzimática máxima com o aumento da concentração inicial do carboidrato poderia ser consequência de uma maior densi-dade celular ou de um estímulo da sua síntese pelo microrganis-mo. A Figura 30 revela que, muito embora a 2,0g/l se obtenha uma menor densidade celular do que a 1,0g/l de dextrina, as concen-trações enzimáticas máximas são praticamente iguais. Esse resul-tado sugere que há um estímulo da síntese enzimática a 2,0g/l em comparação à concentração inicial de 1,0g/l. A Figura 30 permite também supor, pelas mesmas razões, que às concentrações iniciais de dextrina iguais a 20g/l e 30g/l se tem um maior estímu-lo da síntese enzimática do que a 2,0g/l.

Muito embora a dextrina tenha sido apontada como in-dutora da síntese de α -amilase por *Bacillus licheniformis* (9, 51) os resultados da produtividade enzimática observados quan-do se usa esse carboidrato como fonte de carbono (Quadro IV) su-gerem que não é ele propriamente o indutor da síntese da enzima por *Bacillus subtilis* ATCC 601B. Provavelmente o indutor real da α -amilase são oligossacarídeos como maltotriose, maltotetrao-se e maltoligossacarídeos maiores produzidos durante a fermenta-ção. Alguns autores afirmam por exemplo que a maltotetraose é um indutor efetivo da síntese de α -amilase por *Bacillus stearothermophilus* (62) e *Bacillus licheniformis* (51).

4.1.d. Efeito da concentração da lactose

Bacillus subtilis ATCC 601B cresce e produz α -amilase em meio de cultura contendo lactose como fonte de carbono conforme o apresentado nas Figuras 31 a 34. Pode-se observar nessas Figuras que a concentração da enzima aumenta nas 72 horas de fermentação. Durante esse tempo observa-se também um aumento da concentração celular para as concentrações iniciais do carboidrato iguais a 20,0 e 30,0g/l, sugerindo que o açúcar não foi totalmente consumido pelo microrganismo. Para a concentração inicial de lactose igual a 5,0g/l observa-se a lise celular após 48 horas de fermentação enquanto que, para a concentração inicial de lactose igual a 10,0g/l observa-se uma constância da concentração celular (Figura 32).

O Quadro V mostra que a maior produtividade enzimática ocorre entre 48 e 72 horas de fermentação para as concentrações iniciais de lactose iguais a 5,0g/l, 10,0g/l e 30,0g/l. Esses resultados sugerem, como para o amido solúvel, dextrina e glicose, que a lactose também inibe a síntese de α -amilase por *Bacillus subtilis* ATCC 601B.

A Figura 35 mostra que a concentração enzimática máxima ($E_{\max}$) aumentou com o aumento da concentração celular máxima ($X_{\max}$). Esse aumento da concentração enzimática tanto pode ser consequência de uma maior concentração celular como de um estímulo da sua síntese.

À concentração inicial de lactose igual a 30,0g/l, observa-se que muito embora se tenha no meio de cultura uma maior concentração celular, tem-se uma menor concentração enzimática do que nos demais caldos. Essa inibição da síntese de α -amilase provavelmente é causada pela própria lactose remanescente no caldo de cultura

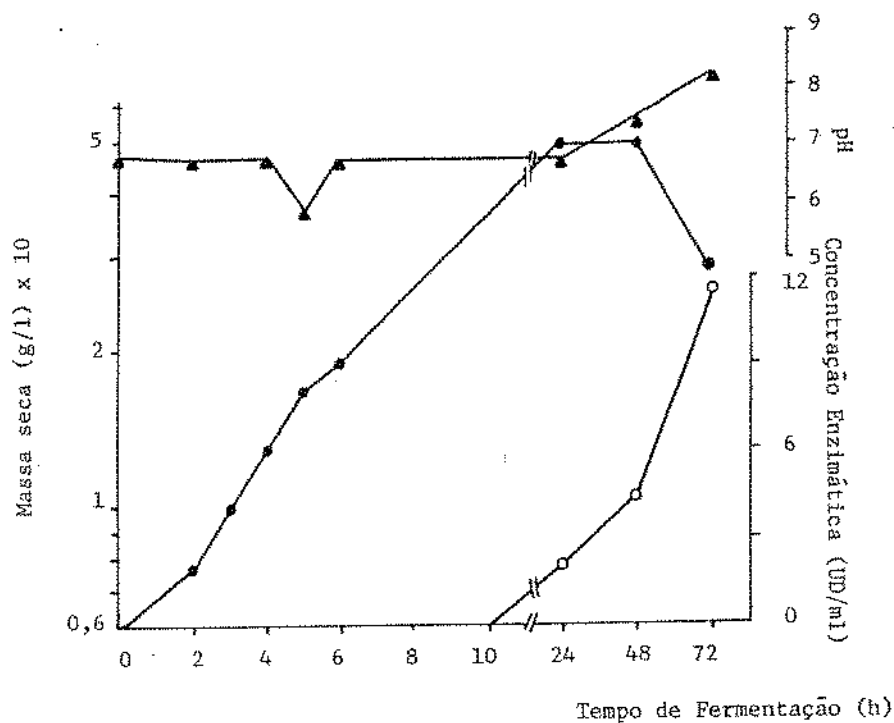


FIGURA 31. Variação do pH (▲), da concentração celular (●) e da concentração enzimática (○) com o tempo de fermentação em meio de cultura básico contendo lactose 5,0g/l, peptona 10,0g/l e extrato de levedura 5,0g/l.

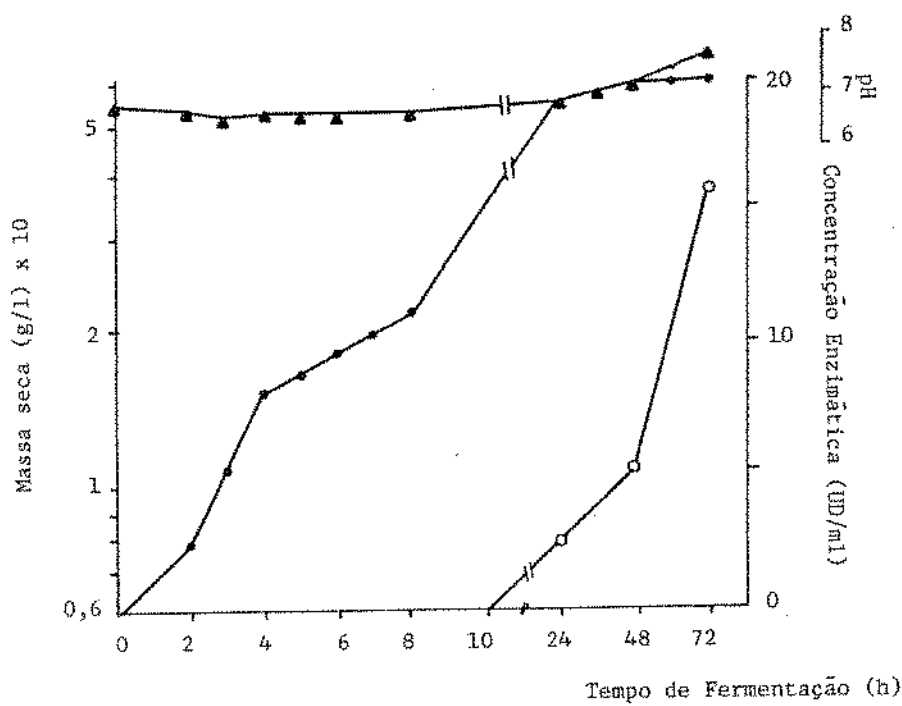


FIGURA 32. Variação do pH (▲), da concentração celular (●) e da concentração enzimática (○) em meio de cultura básico contendo lactose 10,0g/l, peptona 10,0g/l e extrato de levedura 5,0g/l.

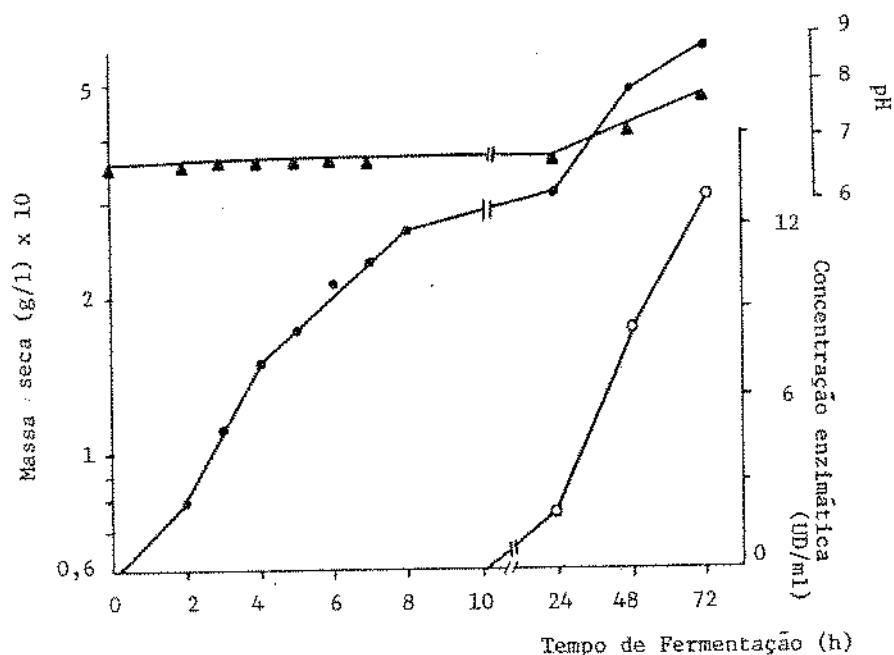


FIGURA 33. Variação do pH (▲), da concentração celular (●) e da concentração enzimática (○) com o tempo de fermentação em meio de cultura básico contendo lactose 20,0g/l, peptona 10,0g/l e extrato de levedura 5,0g/l.

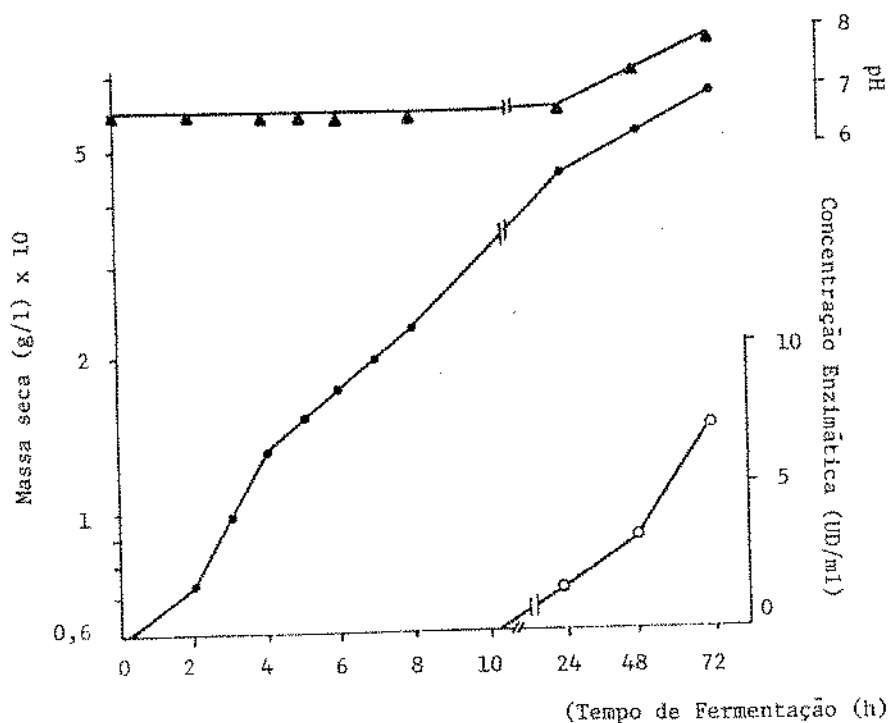


FIGURA 34. Variação do pH (▲), da concentração celular (●) e da concentração enzimática (○) com o tempo de fermentação em meio de cultura básico contendo lactose 30,0g/l, peptona 10,0g/l e extrato de levedura 5,0g/l.

QUADRO V. Efeito da concentração inicial de lactose no meio de cultura sobre a produtividade de α -amilase produzida por *Bacillus subtilis* ATCC 601B.

Concentração inicial de lac tose g/l	PRODUTIVIDADE $P \left(\frac{UD}{mg \cdot h} \right)^*$		
	P (0-24) h	P (24-48) h	P (48-72) h
5,0	0,17	0,19	0,59
10,0	0,18	0,18	0,70
20,0	0,25	0,54	0,34
30,0	0,14	0,14	0,24

* UD = Unidade de atividade dextrinizante

mg = Concentração celular máxima obtida a 24, 48 ou 72 horas de fermentação

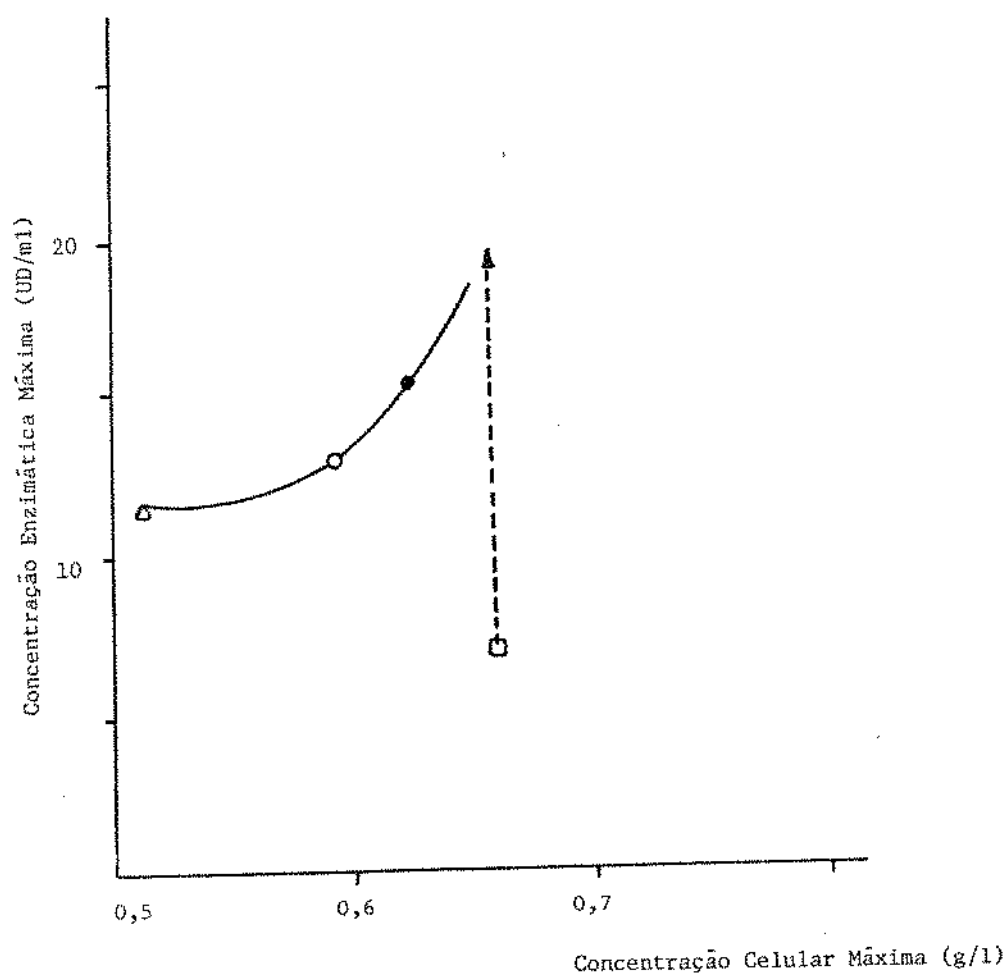


FIGURA 35. Variação da concentração enzimática máxima em função da concentração celular máxima atingida em meios de cultura em diferentes concentrações de lactose. Δ lactose 5,0g/l, $\bullet$ lactose 10,0g/l, $\circ$ lactose 20,0g/l, $\square$ lactose 30,0g/l.

Os resultados obtidos do efeito da concentração de lactose sobre a produção de α -amilase por *Bacillus subtilis* ATCC 601B sugerem que essa linhagem é menos sensível ao efeito repressor da lactose sobre a síntese da enzima do que a linhagem de *Bacillus licheniformis* estudada por CHANDRA *et alii* (9). Esses pesquisadores observaram uma diminuição da síntese da enzima com o aumento da concentração inicial do açúcar na faixa de 1,0 a 5,0g/l.

A Figura 36 compara os resultados obtidos para as concentrações de α -amilase máximas (E_{max}) nos meios de cultura com diversas concentrações iniciais das quatro diferentes fontes de carbono estudadas. As concentrações iniciais mais adequadas para a produção da enzima em meios de cultura contendo glicose, amido solúvel, dextrina e lactose são respectivamente 0,1g/l ou 30,0g/l, 20,0g/l, 10,0g/l e 10,0g/l. Pode-se observar pela Figura 36 que as mesmas concentrações enzimáticas máximas são obtidas usando-se dextrina à concentração inicial de 10,0g/l ou glicose à 30,0g/l.

Os resultados apresentados na Figura 37 sugerem que a alta concentração enzimática obtida quando a concentração inicial de glicose é igual a 30,0g/l deve-se a alta concentração celular atingida nesse meio de cultura. A relação E_{max}/X_{max} (definida por ROYCHOUDHURY (49) como atividade enzimática específica global) nesse caldo de cultura é inferior à obtida no caldo de cultura contendo 10,0g/l de dextrina. Além disso, a produtividade global da enzima (definida por ALAM *et alii* (1) como a quantidade de enzima produzida por unidade de massa e por unidade de tempo) no caldo contendo glicose é inferior à observada quando se usa a dextrina como fonte de carbono (Figura 38). Ambos os resultados sugerem que há um menor estímulo da síntese

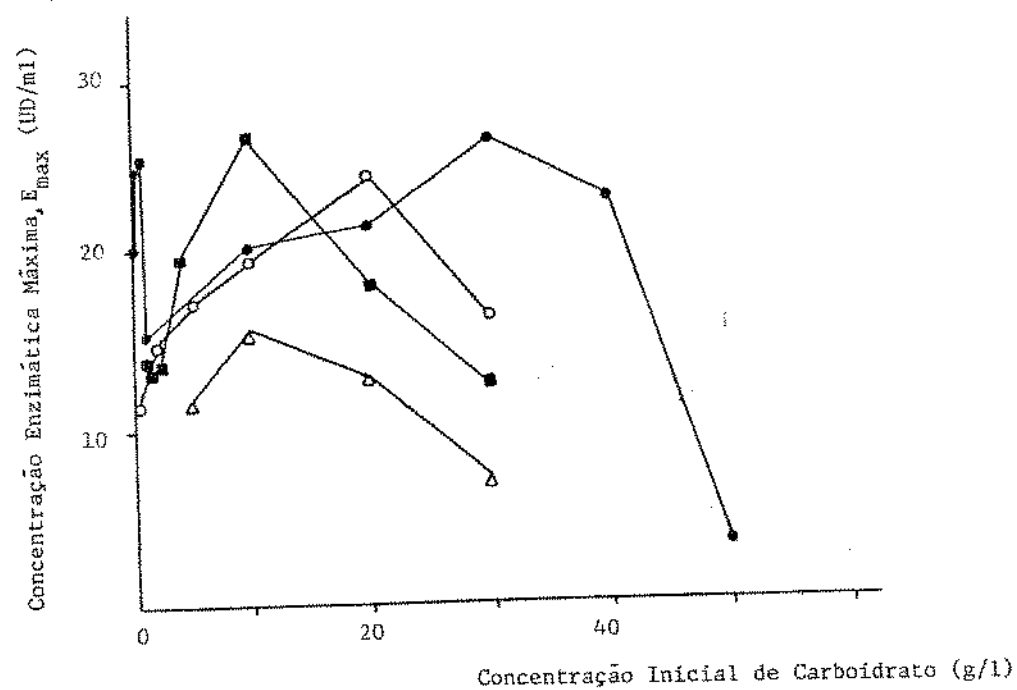


FIGURA 36. Variação da concentração enzimática máxima em função da concentração inicial dos diferentes carboidratos empregados no meio de cultura básico contendo peptona 10g/l e extrato de levedura 5,0g/l. $\circ$ - $\circ$ amido, $\blacksquare$ - $\blacksquare$ dextrina, $\bullet$ - $\bullet$ glicose, $\triangle$ - $\triangle$ lactose.

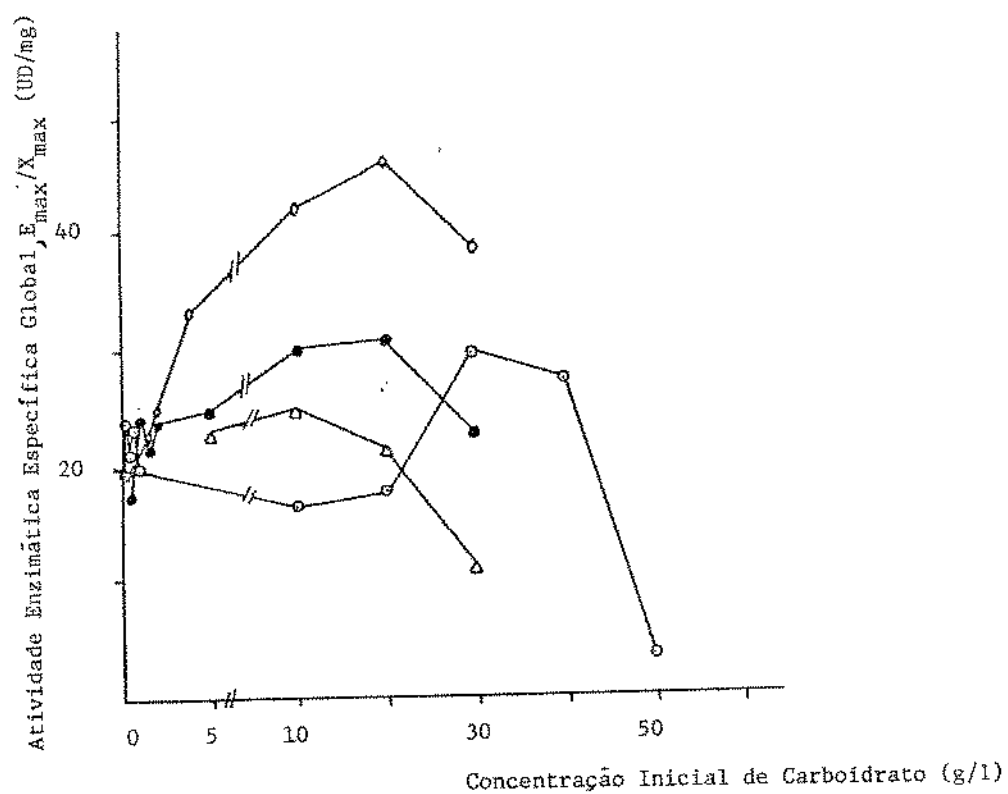


FIGURA 37. Variação da atividade enzimática específica global em função da concentração inicial dos diferentes carboidratos empregados no meio de cultura básico contendo peptona 10g/l e extrato de levedura 5,0g/l.
o-o glicose, Δ-Δ lactose, ●-● amido solúvel, ◇-◇ dextrina.

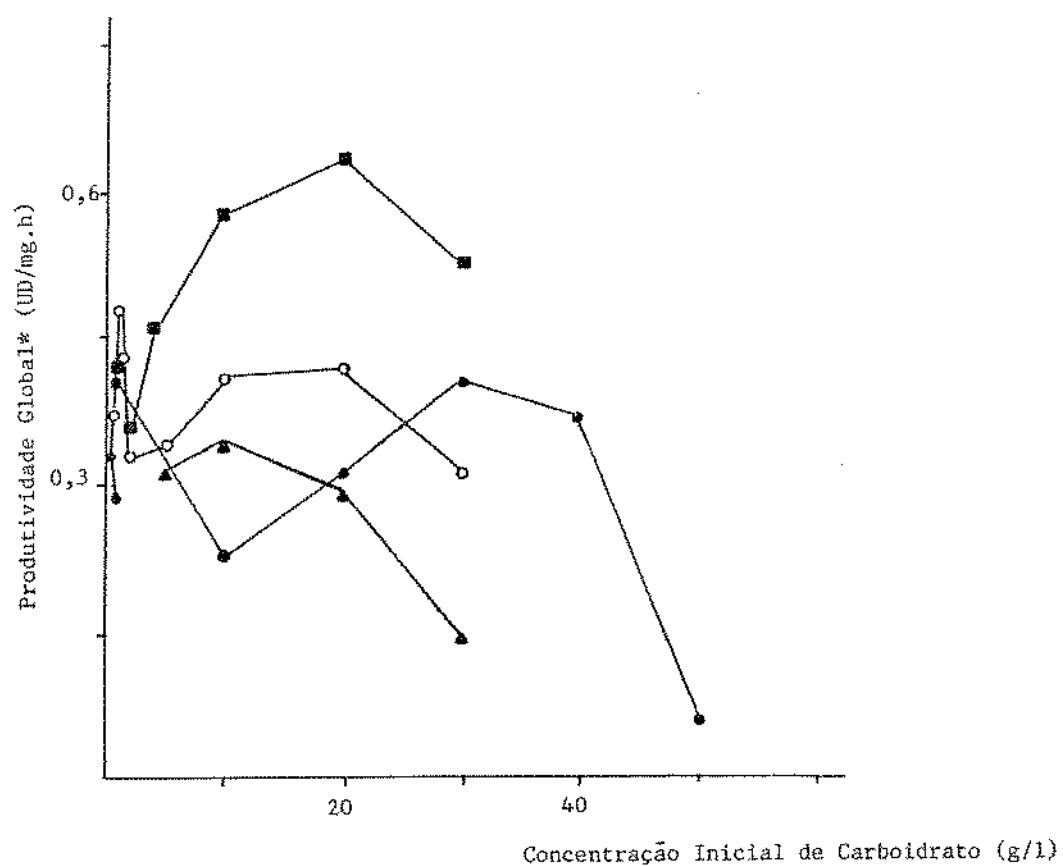


FIGURA 38. Variação da produtividade global em função da concentração inicial dos diferentes carboidratos empregados no meios de cultura básico contendo peptona 10g/l e extrato de levedura 5,0g/l. ●-● glicose, □-□ dextrina, ○-○ amido solúvel, △-△ lactose.

* Considerando a concentração enzimática máxima, a concentração celular máxima atingida no meio de cultura e o tempo necessário para ocorrer a concentração enzimática máxima.

de α -amilase por *Bacillus subtilis* ATCC 601B quando se usa glicose à concentração inicial de 30,0g/l, do que quando se usa dextrina a 10,0g/l.

Como a glicose, a lactose, o amido solúvel e a dextrina são inibidores da síntese da enzima, pois concentrações crescentes dos açúcares levam a um atraso no seu aparecimento (Quadros II, III, IV e V), o estímulo da atividade específica global ($E_{\max}/X_{\max}$) poderá ser devido a metabólitos ou produtos de degradação dos polímeros, produzidos e acumulados durante o processo fermentativo. TSUCHIYA *et alii* (58) já atribuíram o estímulo da síntese de α -amilase por *Bacillus subtilis* KYA 741 em meio de cultura contendo amido solúvel como fonte de carbono, a seus produtos de degradação e não a ele próprio.

Embora a concentração enzimática máxima obtida a 10,0g/l das diferentes fontes de carbono apareça na ordem dextrina > glicose > amido solúvel > lactose, a concentrações iniciais iguais a 20g/l a ordem é amido solúvel > glicose > dextrina > lactose, isso porque a essas concentrações iniciais dos carboidratos a concentração celular máxima em caldo com dextrina é muito inferior à observada nos demais carboidratos. Tanto é assim que a produtividade global (Figura 38) e a atividade enzimática específica global (Figura 37) continuam sendo maiores para o meio de cultura com dextrina do que para os meios de cultura com os demais açúcares.

A Figura 36 mostra que a lactose foi a fonte de carbono menos indicada para a produção de α -amilase por *Bacillus subtilis* ATCC 601B em qualquer uma das concentrações estudadas, embora à concentração inicial igual a 10,0g/l ela proporcione uma maior produtividade global do que a glicose na mesma concen

tração (Figura 38). Esses resultados revelam uma diferença entre essa linhagem e a de *Bacillus amyloliquefaciens* estudada por FUKUMOTO *et alii* (20), para a qual a lactose foi a melhor fonte de carbono para a produção de α -amilase quando usada à concentração inicial igual a 5,0g/l.

A Figura 37 mostra que em meio de cultura contendo dextrina obtem-se o maior estímulo da síntese de α -amilase em quaisquer concentrações iniciais estudadas. Para os demais carboidratos o comportamento depende da concentração inicial utilizada. Para as concentrações iniciais mais elevadas dos carboidratos, a redução da produtividade pode, de qualquer modo, ser conseqüência da ação inibidora da síntese enzimática pelo açúcar inicialmente adicionado, e, ainda presente no caldo de cultura.

4.2. Perfil da síntese de α -amilase por *Bacillus subtilis* ATCC 601B

Algumas linhagens de *Bacillus* produzem α -amilase desde o início do seu crescimento, enquanto outras produzem a enzima apenas após a fase exponencial. Assim, a síntese de α -amilase por *Bacillus stearothermophilus* (62) foi observada já durante a fase logarítmica de crescimento enquanto que a de *Bacillus subtilis* (13, 58), *Bacillus amyloliquefaciens* (12) e *Bacillus picheniformis* (51) foi observada apenas após a fase exponencial. Pode-se notar, porém, que há muita controvérsia sobre a fase do crescimento microbiano em que a α -amilase de *Bacillus subtilis* é sintetizada. A α -amilase de *Bacillus subtilis* Marburg, por exemplo, foi sintetizada durante o crescimento microbiano com

um grande aumento da velocidade de síntese após a fase exponencial (53). A enzima, no entanto, foi sintetizada por *Bacillus subtilis* W23, a uma velocidade constante apenas durante o crescimento exponencial, com uma produção nula na fase pós logarítmica de crescimento (64). Vários fatores podem contribuir para as diferenças observadas nesses resultados, como a metodologia empregada para quantificar a enzima, as características próprias do microrganismo e a composição do meio de cultura.

PRIEST (47) atribui à composição do meio de cultura o fato de alguns pesquisadores terem observado que a síntese de α -amilase por *Bacillus subtilis* é linear durante todo o ciclo de crescimento. Segundo ele, um meio de cultura de composição pobre pode reduzir o crescimento microbiano e conseqüentemente as diferenças de velocidade de síntese da enzima nas diversas fases do crescimento. LAMPEN (33) sugere por sua vez que as linhagens japonesas de *Bacillus subtilis* são particularmente sensíveis à repressão por metabólitos, de modo que a enzima é sintetizada apenas quando a fonte de carbono é consumida.

Os resultados obtidos no experimento delineado no item 3.3.f. são mostrados na Figura 39. A produção de α -amilase por *Bacillus subtilis* ATCC 601B tem início na fase exponencial de crescimento, conforme revela a atividade sacarificante, com um grande aumento da velocidade de síntese na fase estacionária. Como a produção da enzima na fase exponencial de crescimento é lenta e sua concentração muito baixa, ela não é detectada pelo método menos sensível empregado para a medida da atividade dextrinizante.

A maior velocidade de síntese enzimática ocorre ao mesmo tempo em que ocorre a esporulação do *Bacillus subtilis*

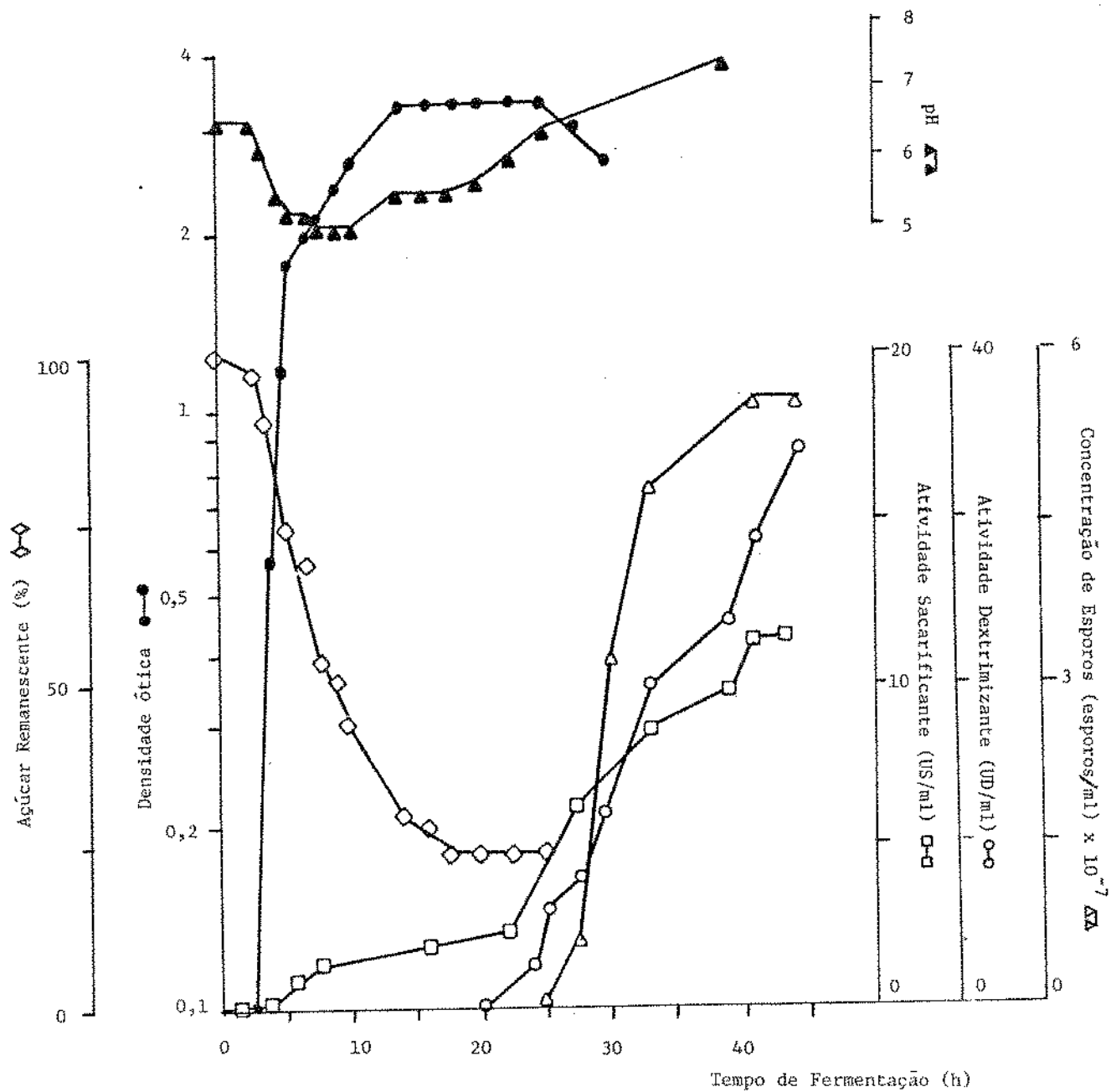


FIGURA 39. Perfil da síntese de α -amilase. Fermentação realizada em meio de cultura básico contendo glicose 10,0g/l, peptona 10,0g/l e extra- to de levedura 5,0g/l.

ATCC 601B, num comportamento semelhante ao observado com *Bacillus subtilis* Marburg linhagem 168 (16). Tal fato poderia sugerir que a esporulação e a síntese de α -amilase fossem fenômenos interdependentes, de modo que a esporulação fosse imprescindível para a síntese da enzima ou vice-versa. DANCER *et alii* (16) e SHAEFFER (52), porém, observaram a produção de α -amilase por *Bacillus subtilis* mesmo em condições onde não ocorria a esporulação. Concluíram então que, embora se dêem ao mesmo tempo, a esporulação e a síntese de α -amilase são fenômenos independentes que se manifestam como consequência de mudanças nas funções vegetativas da célula decorrentes de alterações no meio de cultura ao final da fase exponencial.

4.3. Efeito da concentração peptona sobre a síntese de α -amilase

As Figuras 40 a 44 mostram as curvas de crescimento, de pH e de síntese de α -amilase por *Bacillus subtilis* ATCC 601B. Verifica-se na Figura 41 que na ausência de peptona há uma inativação enzimática entre 48 e 72 horas de fermentação. Esse resultado sugere que a peptona, ou algum produto do metabolismo microbiano produzido somente na sua presença, contribui para a estabilização da enzima no caldo de cultura. Para os demais meios de cultura a concentração de α -amilase no caldo de cultura aumenta durante as 72 horas de fermentação.

Pela Figura 45 tem-se que a melhor concentração inicial de peptona para a produção de α -amilase por *Bacillus subtilis* ATCC 601B no meio de cultura considerado é 10,0g/l, pois com ela se obtém a maior concentração enzimática ao final de 72 horas de fermentação. Acima dessa concentração há um decréscimo na pro-

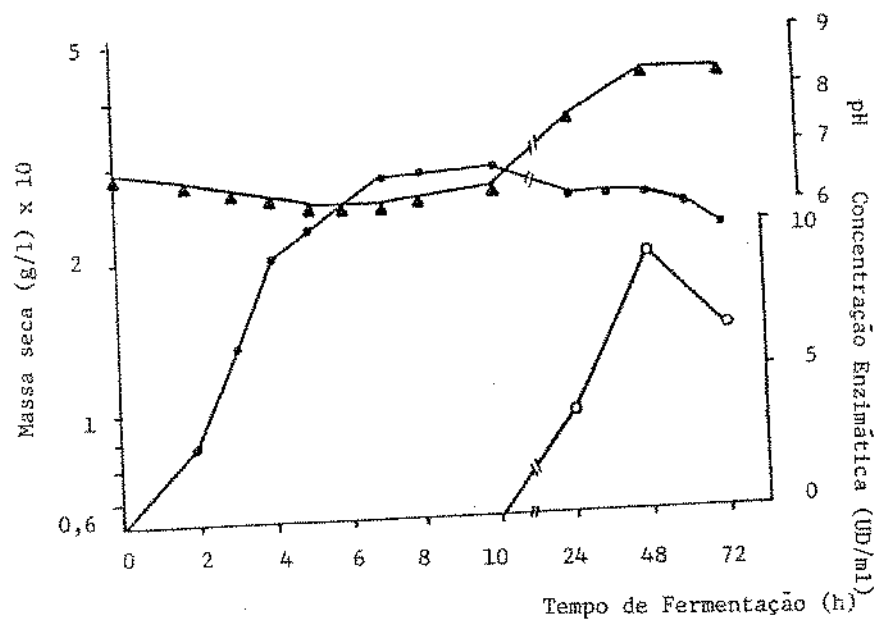


FIGURA 40. Variação do pH (▲-▲), da concentração celular (●-●) e da concentração enzimática (○-○) com o tempo de fermentação em meio de cultura básico isento de peptona, contendo dextrina 4,0g/l e extrato de levedura 5,0g/l.

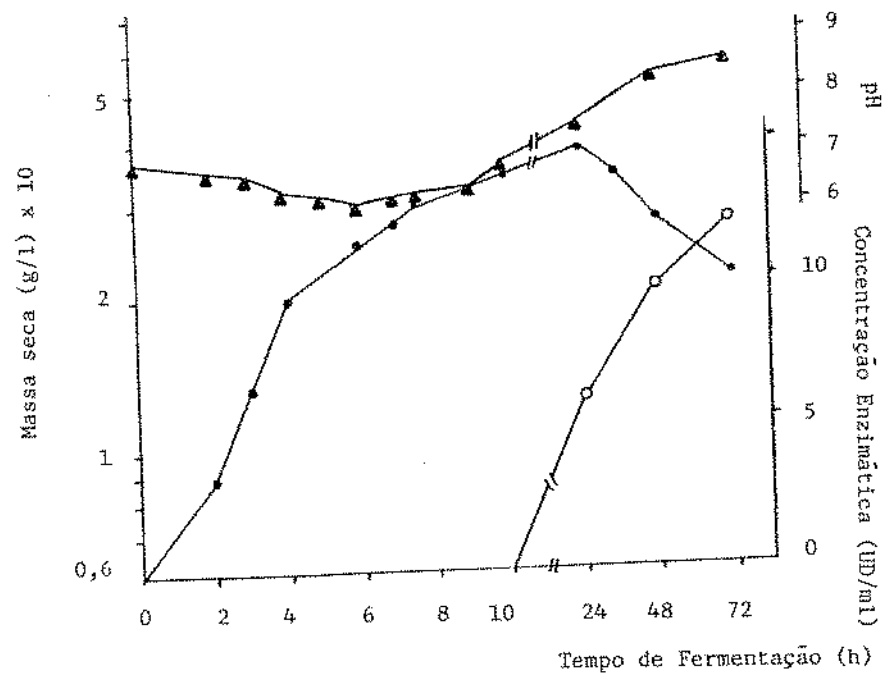


FIGURA 41. Variação do pH (▲-▲), da concentração celular (●-●) e da concentração enzimática (○-○) com o tempo de fermentação em meio de cultura básico contendo peptona 2,5g/l, dextrina 4,0g/l e extrato de levedura 5,0g/l.

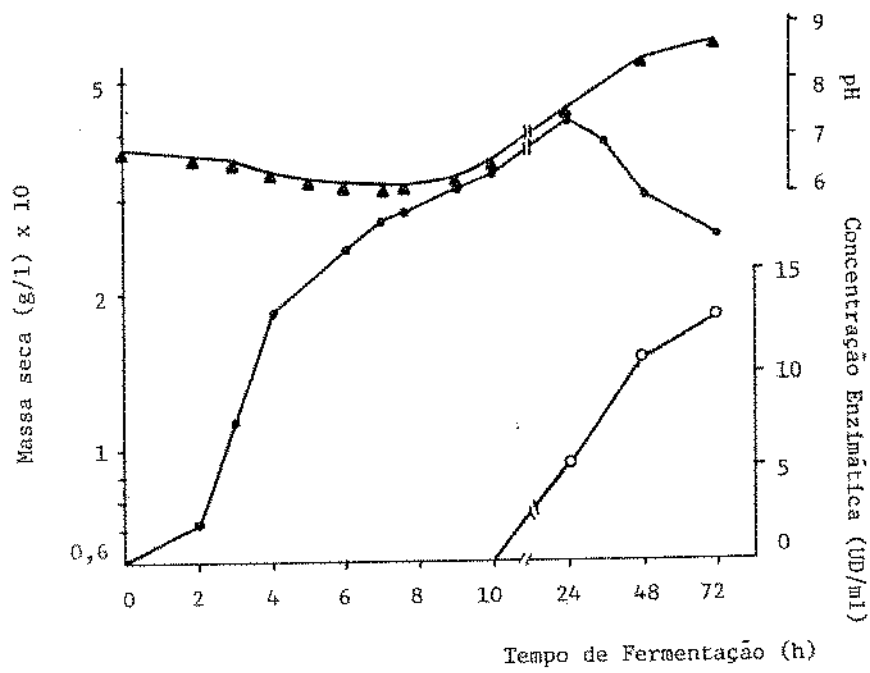


FIGURA 42. Variação do pH (▲), da concentração celular (●) e da concentração enzimática (○) com o tempo de fermentação em meio de cultura básico contendo peptona 5,0g/l, dextrina 4,0g/l e extrato de levedura 5,0g/l.

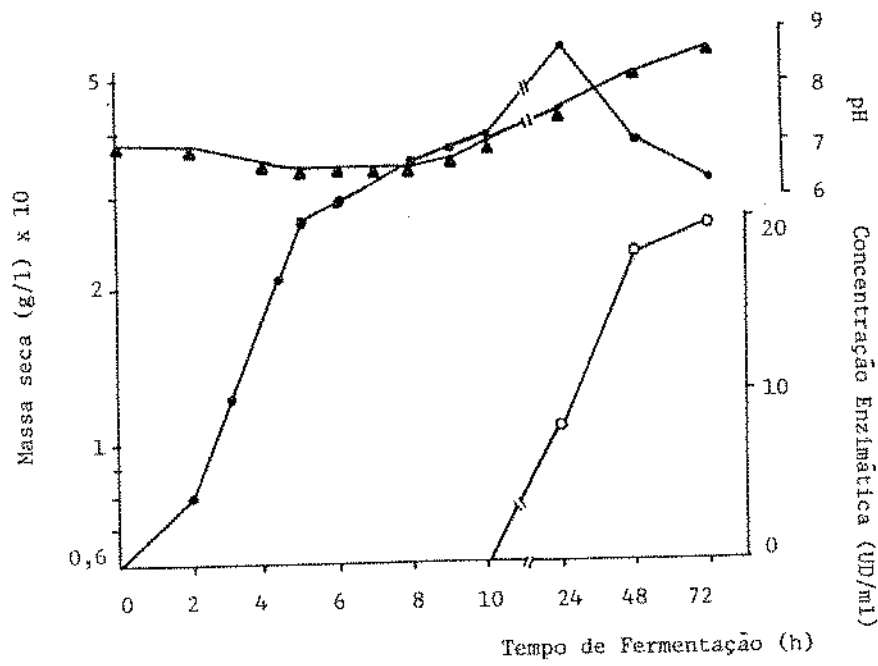


FIGURA 43. Variação do pH (▲), da concentração celular (●) e da concentração enzimática (○) com o tempo de fermentação em meio de cultura básico contendo peptona 10,0g/l, dextrina 4,0g/l e extrato de levedura 5,0g/l.

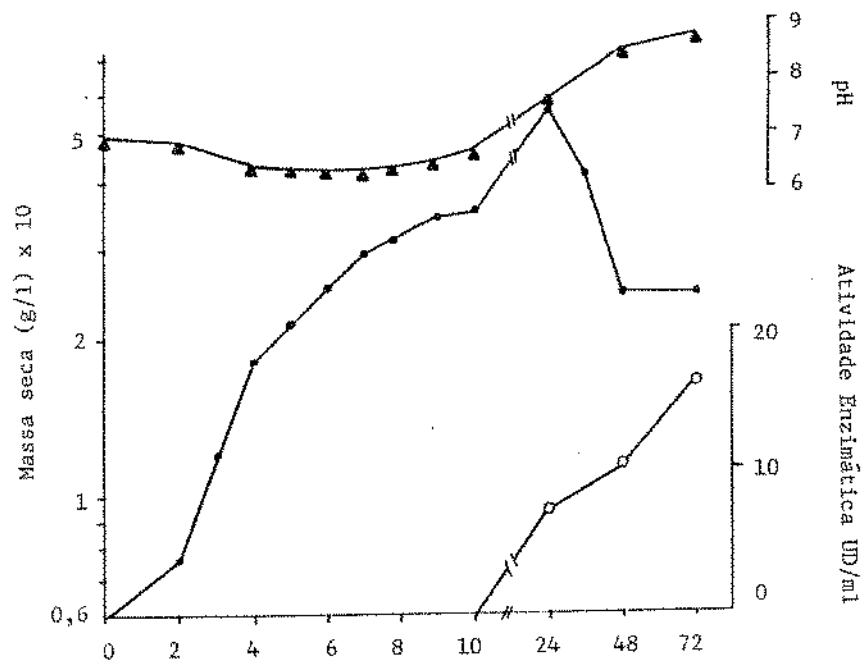


FIGURA 44. Variação do pH (▲), da concentração celular (●) e da concentração enzimática (○) com o tempo de fermentação em meio de cultura básico contendo peptona 12,5g/l, dextrina 4,0g/l e extrato de levedura 5,0g/l.

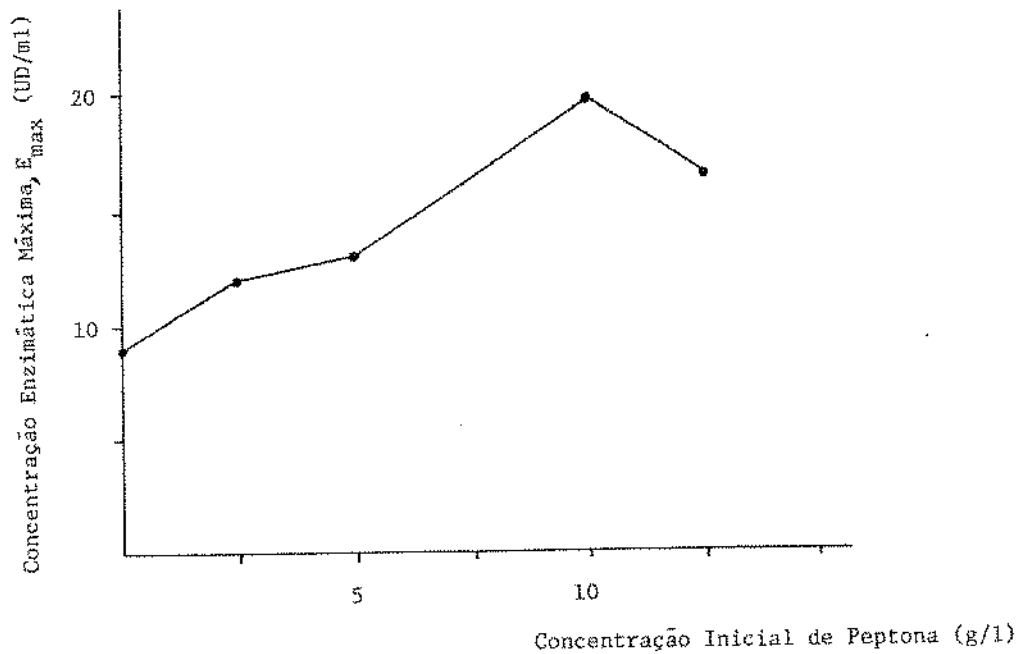


FIGURA 45. Variação da concentração enzimática máxima em função da concentração inicial de peptona no meio de cultura.

dução da enzima. BAJPAI *et alii* (5) estudando o efeito da concentração de peptona sobre a síntese de α -amilase por *Bacillus licheniformis* TCRDC-B13 observaram, igualmente, que a produção da enzima aumenta para as concentrações de peptona compreendidas entre 2,5 e 10,0g/l. A produção de α -amilase pela linhagem diminui para concentrações de peptona superiores a 10,0g/l.

A Figura 46 mostra que a concentração enzimática máxima ($E_{\max}$) aumenta com o aumento da concentração celular máxima ($X_{\max}$).

Pela Figura 47 observa-se que em meio de cultura isento de peptona obtém-se uma produtividade superior à observada nos demais meios, provavelmente como consequência única do menor tempo de fermentação. Essa observação é corroborada pelos resultados da Figura 48 que mostra que a relação $E_{\max}/X_{\max}$, na faixa de 0 a 10g/l, independe da concentração inicial de peptona no meio de cultura, de modo que a maior produtividade observada em meio isento de peptona se deve ao menor tempo de fermentação necessário para obter a atividade enzimática máxima. Os resultados sugerem que a peptona não afeta a síntese de α -amilase mas apenas o crescimento celular. Afetando o crescimento celular, no entanto, esse componente do meio de cultura afeta a quantidade total de enzima produzida.

4.4. Efeito da concentração inicial de extrato de levedura sobre a síntese de α -amilase

O extrato de levedura é usado nos meios de cultura como uma fonte alternativa de vitaminas, aminoácidos, minerais e outros fatores que proporcionam um bom desenvolvimento de mi-

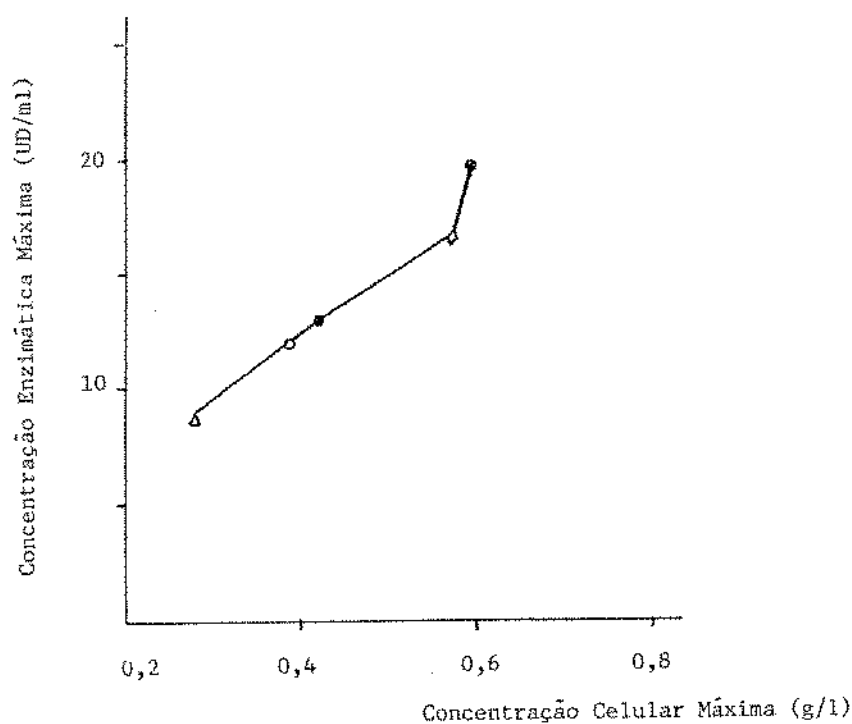


FIGURA 46. Variação da concentração enzimática máxima em função da concentração celular máxima atingida em meios de cultura com diferentes concentrações iniciais de peptona. Δ peptona 0,0g/l, $\circ$ peptona 2,5g/l, $\bullet$ peptona 5,0g/l, $\odot$ peptona 10,0g/l, $\diamond$ peptona 12,5g/l.

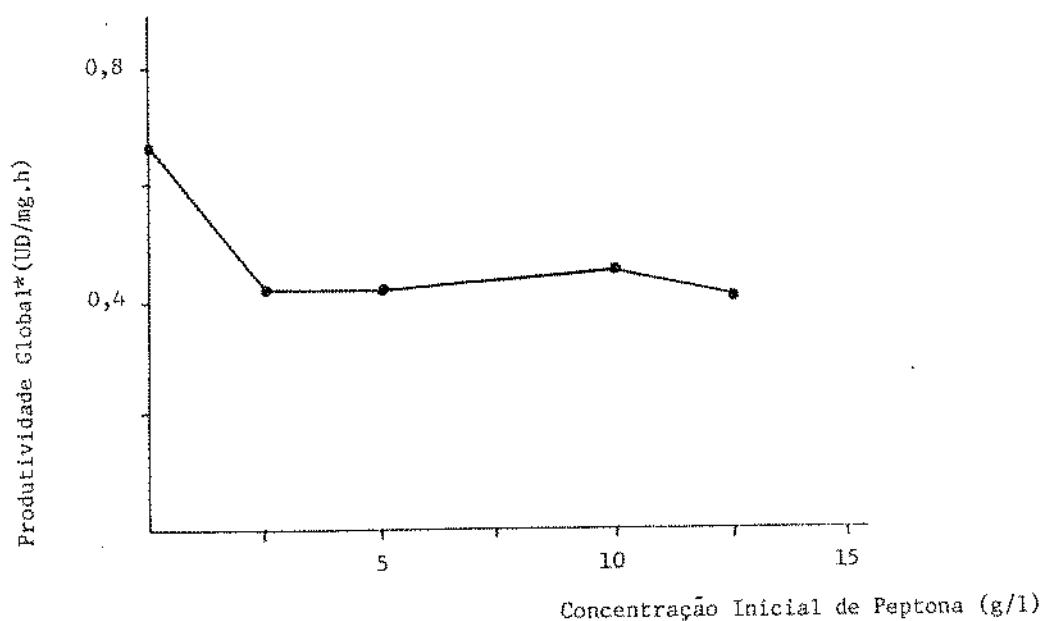


FIGURA 47. Variação da produtividade global em função da concentração inicial de peptona no meio de cultura.

* Considerando a concentração enzimática máxima, a concentração celular máxima atingida no meio de cultura e o tempo necessário para ocorrer a concentração enzimática máxima.

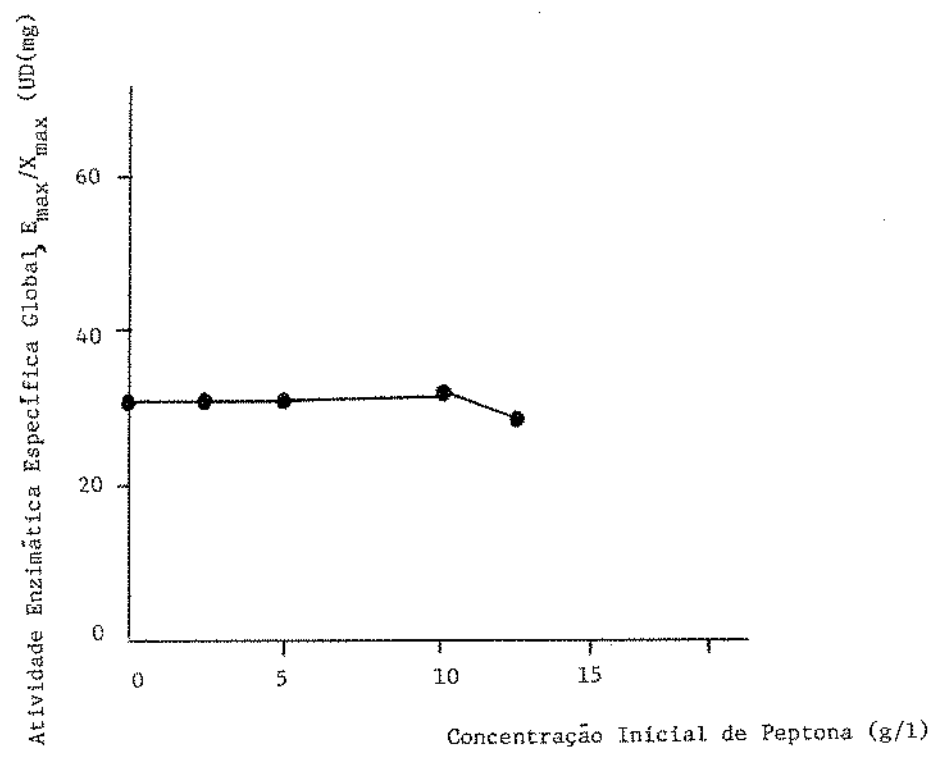


FIGURA 48. Variação da atividade enzimática específica global com a concentração inicial de peptona.

crorganismos (1). Por conter nutrientes que afetam a produção de α -amilase por microrganismos do gênero *Bacillus*, considerou-se importante estudar o efeito do extrato de levedura sobre a produção de α -amilase por *Bacillus subtilis* ATCC 601B.

As Figuras 49 a 52 mostram as curvas de crescimento, de variação de pH do caldo e de produção de α -amilase por *Bacillus subtilis* ATCC 601B em meios de cultura contendo extrato de levedura em diversas concentrações conforme experimentos delineados no item 3.3.c. Essas Figuras mostram que em meio de cultura sem extrato de levedura a lise celular, avaliada pela redução da concentração celular, ocorre a um menor tempo de fermentação. Pode-se observar também que a concentração celular após 10 horas de fermentação é maior nesse meio de cultura do que nos demais.

Apesar de se observar um bom desenvolvimento microbiano em meio de cultura isento de extrato de levedura (Figura 49), a produção de enzima no caldo após 72 horas de fermentação é inferior à observada nos caldos ao qual se adicionou o componente (Figura 53), sugerindo uma certa importância do extrato de levedura na síntese de α -amilase pelo microrganismo.

A Figura 54 mostra que para concentrações iniciais de extrato de levedura iguais a 2,5g/l, 5,0g/l e 10,0g/l há um aumento da concentração enzimática máxima com o aumento da concentração celular máxima. Há no entanto uma concentração enzimática máxima bastante baixa no meio de cultura isento de extrato de levedura apesar de se observar uma elevada concentração celular. Esses resultados sugerem um forte efeito do extrato de levedura sobre a síntese de α -amilase por *Bacillus subtilis* ATCC 601B.

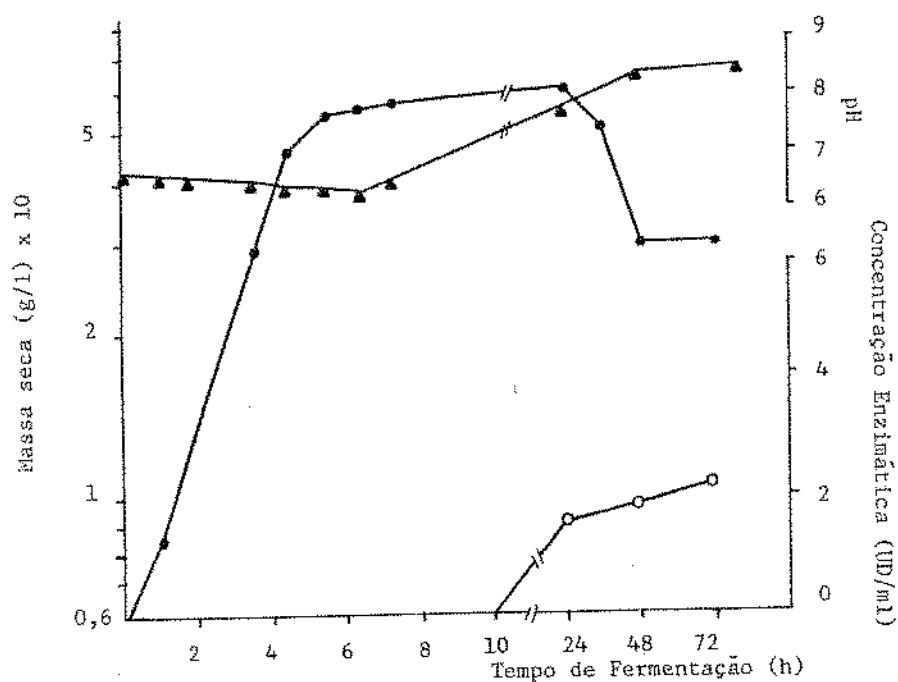


FIGURA 49. Variação do pH (▲), da concentração celular (●) e da concentração enzimática (○) com o tempo de fermentação em meio de cultura básico contendo dextrina 4,0g/l, peptona 10,0g/l e isento de extrato de levedura.

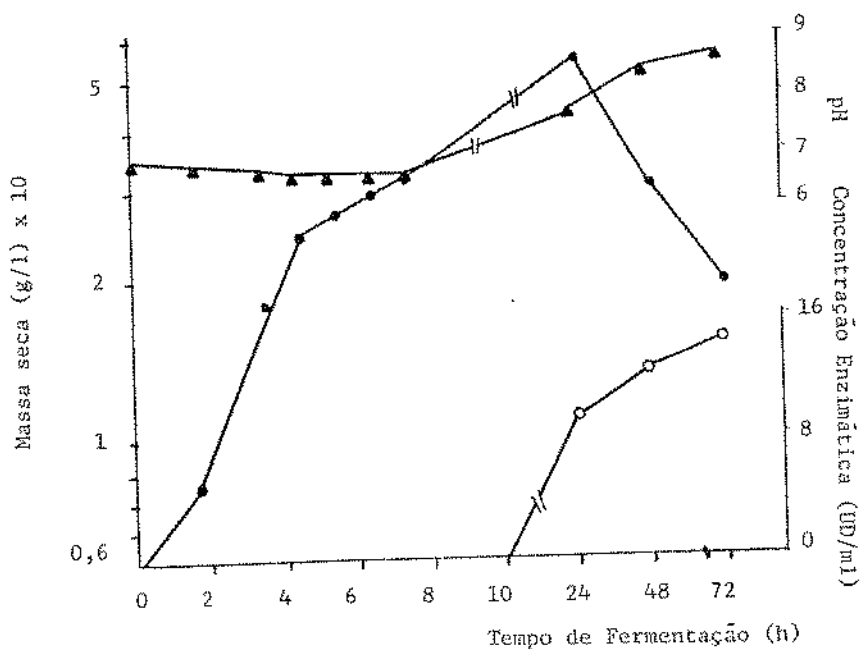


FIGURA 50. Variação do pH (▲), da concentração celular (●) e da concentração enzimática (○) com o tempo de fermentação em meio de cultura básico contendo dextrina 4,0g/l, peptona 10,0g/l e extrato de levedura 2,5g/l.

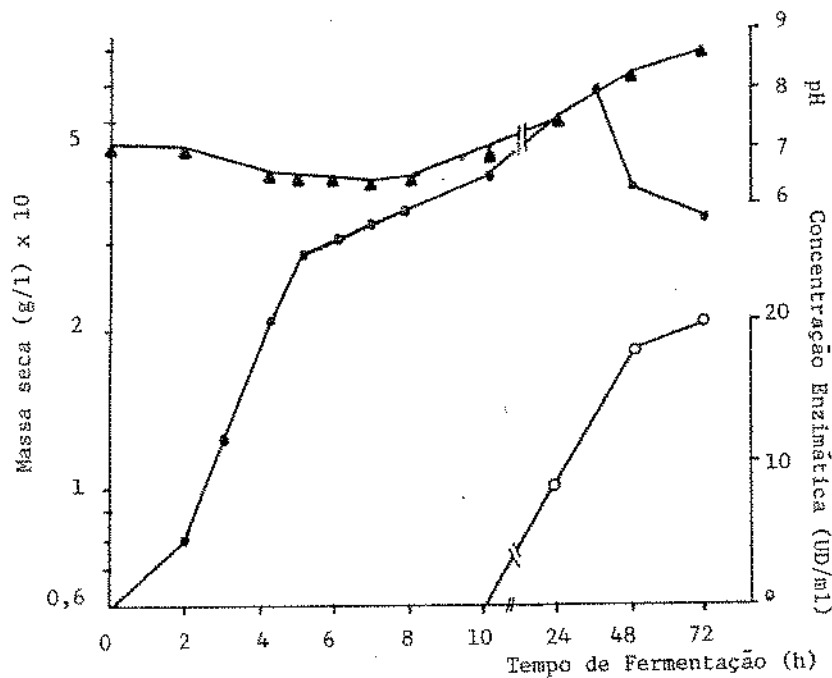


FIGURA 51. Variação do pH (▲), da concentração celular (●) e da concentração enzimática (○) com o tempo de fermentação em meio de cultura básico contendo extrato de levedura 5,0g/l, dextrina 4,0g/l e peptona 10,0g/l.

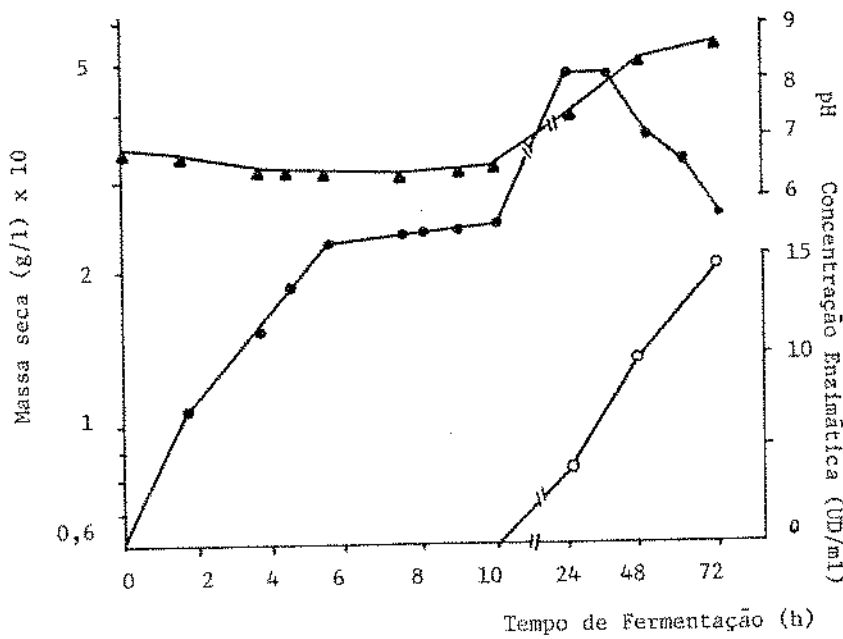


FIGURA 52. Variação do pH (▲), da concentração celular (●) e da concentração enzimática (○) com o tempo de fermentação em meio de cultura básico com extrato de levedura 10,0g/l, dextrina 4,0g/l e peptona 10g/l.

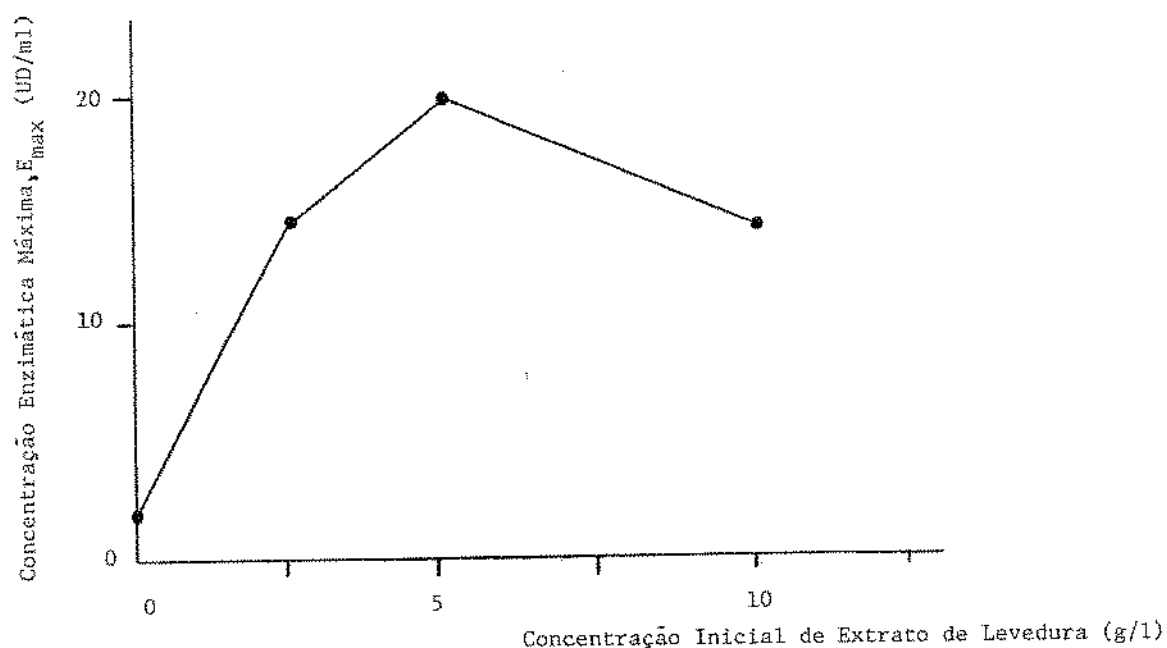


FIGURA 53. Variação da concentração enzimática máxima em função da concentração inicial de extrato de levedura no meio de cultura.

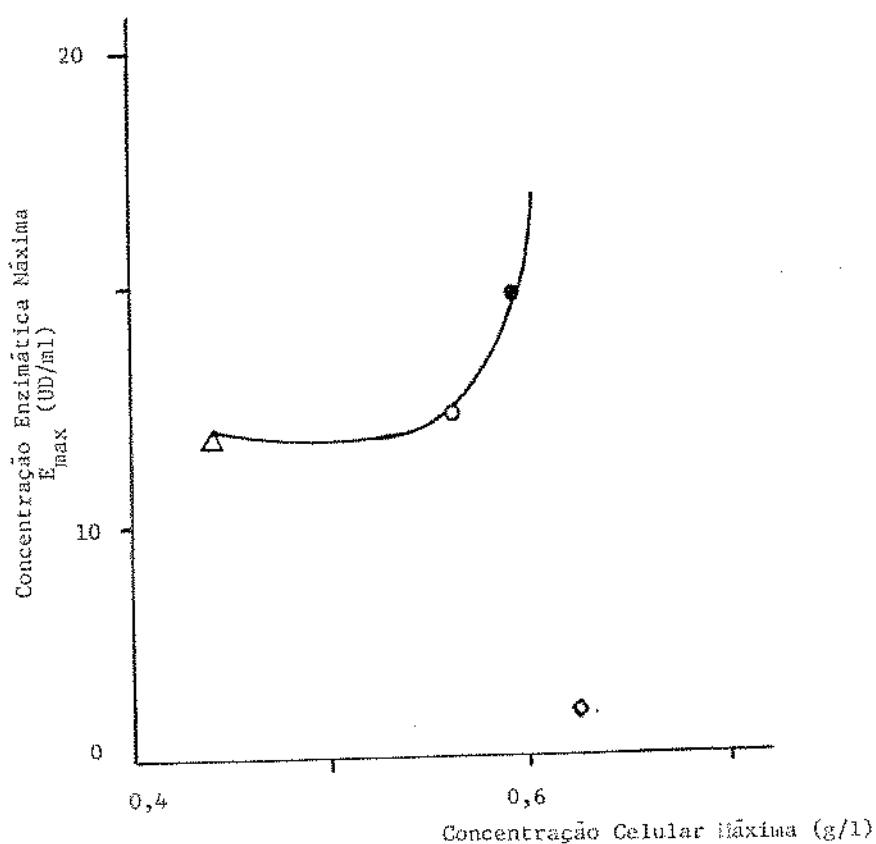


FIGURA 54. Variação da concentração enzimática máxima em função da concentração celular máxima atingida em meios de cultura com diferentes concentrações iniciais de extrato de levedura. ◊ extrato de levedura 0,0g/l, ○ extrato de levedura 2,5g/l, ● extrato de levedura 5,0g/l, Δ extrato de levedura 10,0g/l.

A Figura 55 mostra que há um estímulo da síntese de α -amilase pelo extrato de levedura de modo que à medida que se aumenta a concentração inicial do componente no meio de cultura aumenta a relação $E_{\max}/X_{\max}$. Observa-se no entanto um limite da ordem de 5,0g/l para a concentração inicial do extrato de levedura, acima do qual um aumento da quantidade inicial do componente adicionada diminui a produção da enzima.

A Figura 56 mostra que, num comportamento semelhante ao observado para a relação $E_{\max}/X_{\max}$, a produtividade enzimática global aumenta com a adição de extrato de levedura até um limite de 5,0g/l. Observa-se também uma redução da produtividade global à concentração inicial de extrato de levedura igual à 10,0g/l.

O efeito positivo do extrato de levedura sobre a síntese de α -amilase por *Bacillus subtilis* ATCC 601B, contrasta com o efeito do componente sobre a produção da enzima por *Bacillus amyloliquefaciens*. ALAM *et alii* (1), num estudo semelhante sobre o efeito do extrato de levedura sobre a síntese de α -amilase por *Bacillus amyloliquefaciens*, observaram que a sua adição ao meio de cultura, onde a fonte de carbono era glicose, em concentrações iniciais superiores a 2,0g/l diminuía a produtividade global da enzima. Esses pesquisadores observaram que à concentração inicial de extrato de levedura igual a 5,0g/l por exemplo não havia produção de α -amilase.

As diferenças entre os resultados obtidos para o efeito do extrato de levedura sobre a síntese de α -amilase por *Bacillus subtilis* ATCC 601B e pelo *Bacillus amyloliquefaciens* podem ser devidas, além das diferenças genéticas entre as linhagens, à composição dos meios de cultura empregados nos experi-

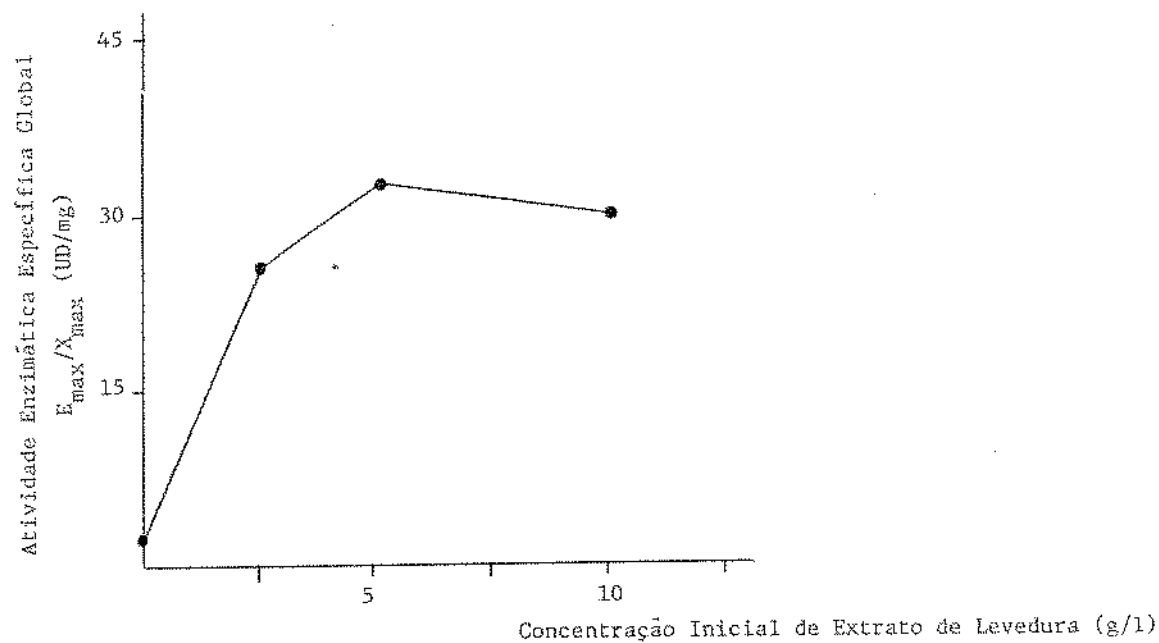


FIGURA 55. Variação da atividade enzimática específica global em função da concentração inicial de extrato de levedura no meio de cultura.

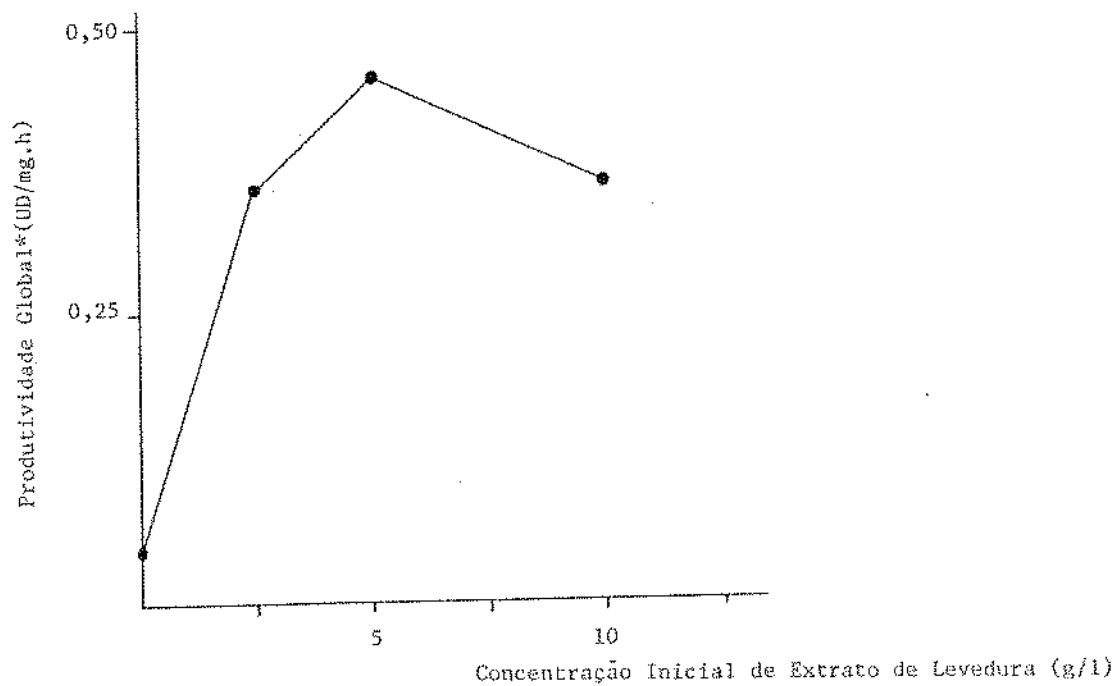


FIGURA 56. Variação da produtividade enzimática global em função da concentração inicial de extrato de levedura no meio de cultura.

* Considerando a concentração enzimática máxima, a concentração celular máxima atingida no meio de cultura e o tempo necessário para ocorrer a concentração enzimática máxima.

mentos. Segundo os resultados obtidos por *Bacillus subtilis* ATCC 601B, a glicose retarda a síntese de α -amilase enquanto favorece o crescimento microbiano. Assim, se o tempo considerado para o cálculo da produtividade enzimática global (não mencionado pelos autores) por *Bacillus amyloliquefaciens* não foi suficientemente elevado, pode-se ter observado uma alta biomassa e uma baixa concentração enzimática, resultando em um baixo valor de $E_{\max}/X_{\max}$.

4.5. Efeito da temperatura de incubação sobre a síntese de α -amilase

As Figuras 57 a 60 mostram as curvas de crescimento, de variação de pH e da concentração de α -amilase em meio de cultura inoculado com *Bacillus subtilis* ATCC 601B incubado a 30°C, 33°C, 37°C e 40°C.

O microrganismo se desenvolve bem em qualquer das 4 temperaturas experimentadas. Nos casos onde a incubação foi feita a 30°C e 33°C a concentração máxima de enzima é obtida após 48 horas de fermentação. Às temperaturas mais elevadas de incubação a concentração enzimática aumenta até 72 horas de fermentação.

A Figura 61 mostra que a concentração enzimática máxima aumenta com o aumento da temperatura de incubação na faixa de 30°C a 37°C, havendo uma redução a 40°C. Os resultados dessa Figura sugerem que 37°C, dentre as temperaturas estudadas, é a temperatura de incubação mais apropriada para a produção de α -amilase por *Bacillus subtilis* ATCC 601B.

Observa-se pela Figura 62 que a relação entre a con-

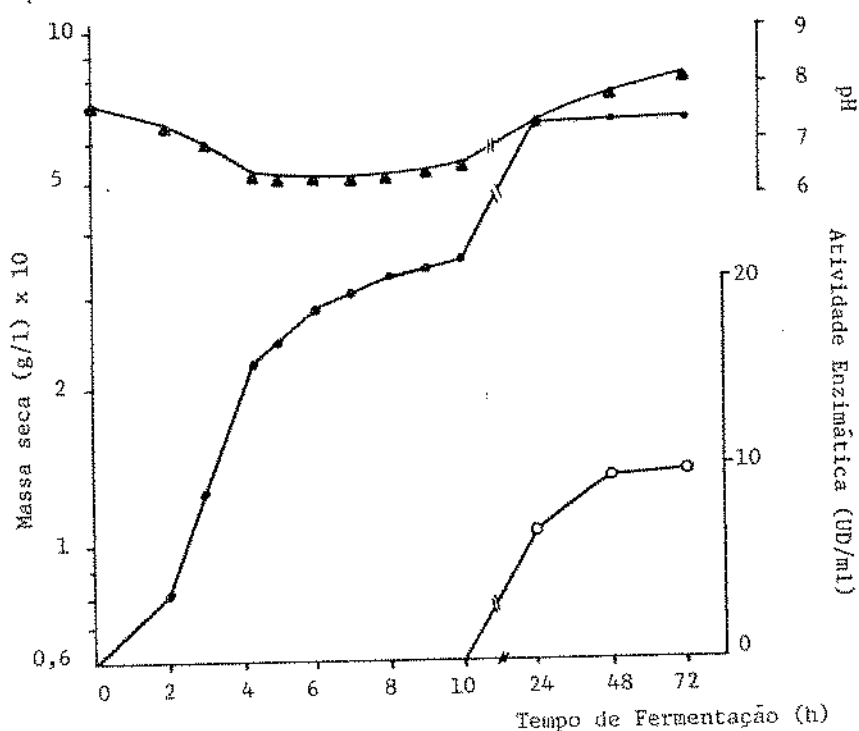


FIGURA 57. Variação do pH (▲), da concentração celular (●) e da concentração enzimática (○) com o tempo de fermentação a 30°C. Fermentação realizada em meio de cultura básico contendo dextrina 4,0g/l, peptona 10,0g/l e extrato de levedura 5,0g/l.

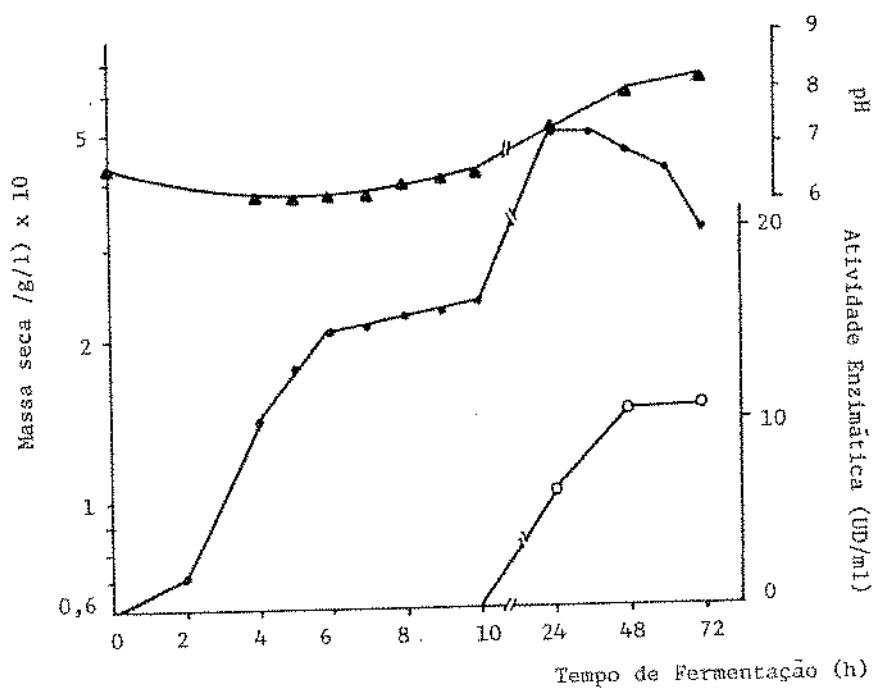


FIGURA 58. Variação do pH (▲), da concentração celular (●) e da concentração enzimática (○) com o tempo de fermentação a 33°C. Fermentação realizada em meio de cultura básico contendo dextrina 4,0g/l, peptona 10,0g/l e extrato de levedura 5,0g/l.

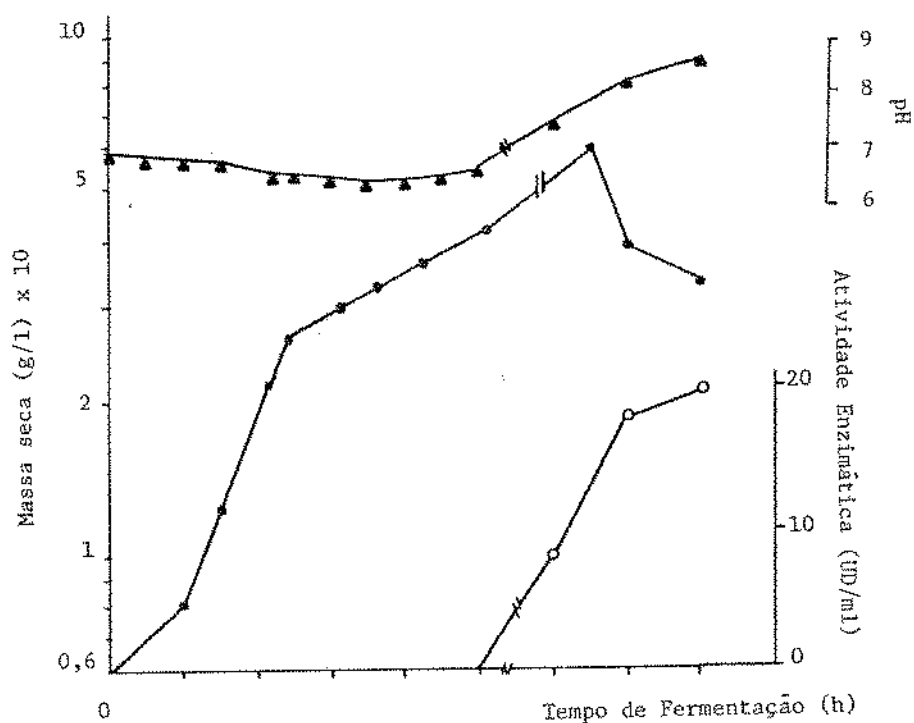


FIGURA 59. Variação do pH (▲▲), da concentração celular (●-●) e da concentração enzimática (○-○) com o tempo de fermentação a 37°C. Fermentação realizada em meio de cultura básico contendo dextrina 4,0g/l, peptona 10,0g/l e extrato de levedura 5,0g/l.

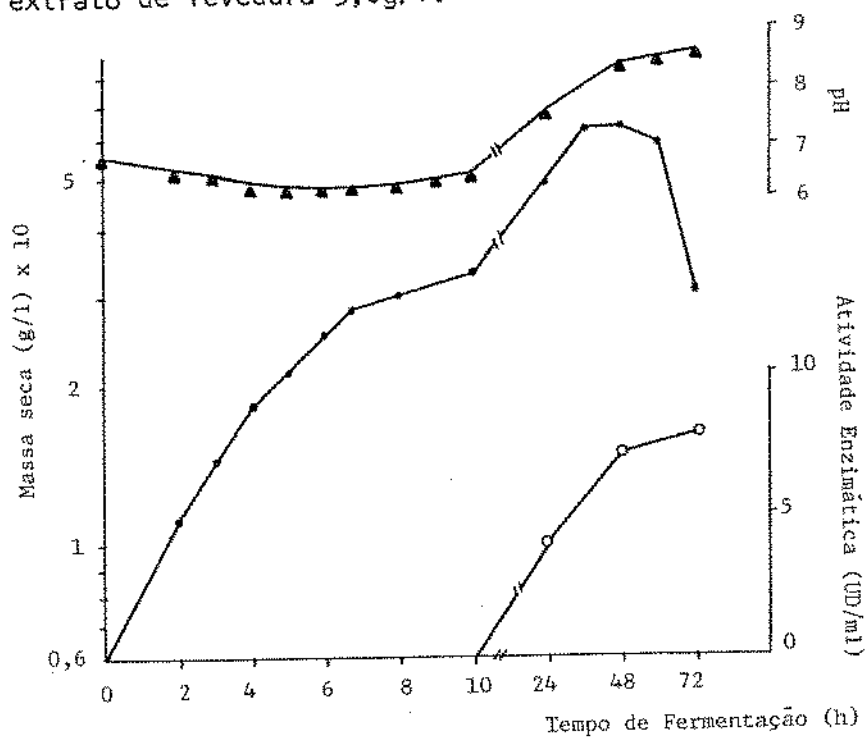


FIGURA 60. Variação do pH (▲▲), da concentração celular (●-●) e da concentração enzimática (○-○) com o tempo de fermentação a 40°C. Fermentação realizada em meio de cultura básico contendo dextrina 4,0g/l, peptona 10,0g/l e extrato de levedura 5,0g/l.

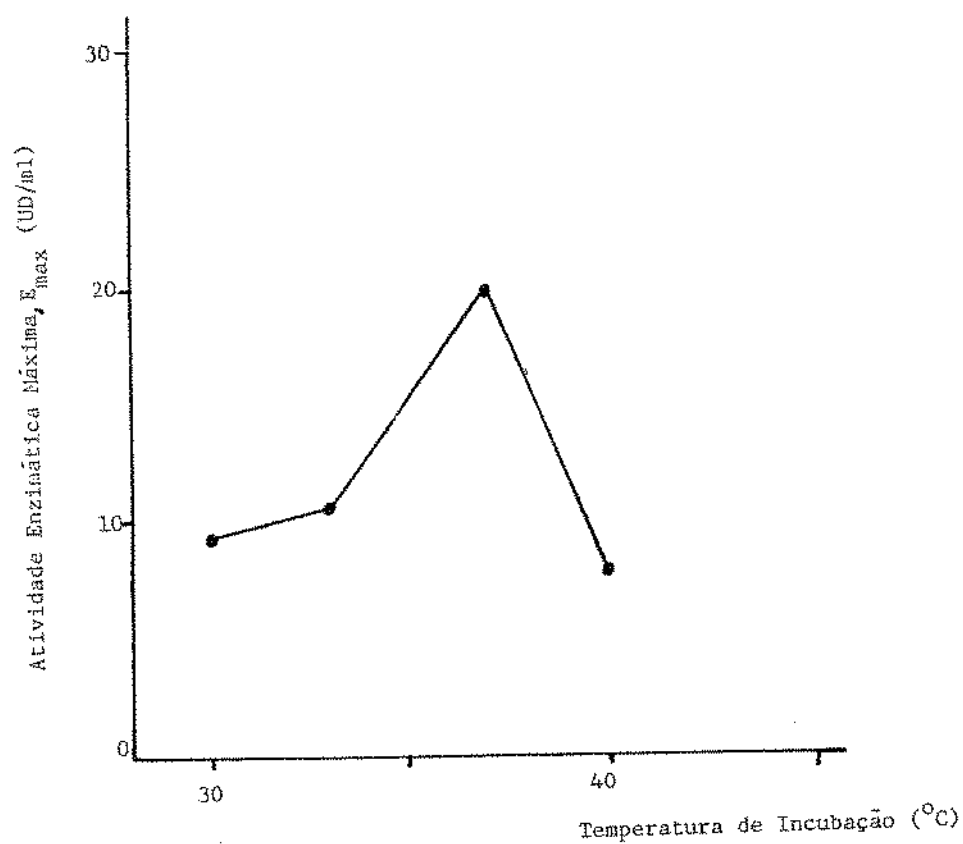


FIGURA 61. Variação da concentração enzimática máxima em função da temperatura de incubação.

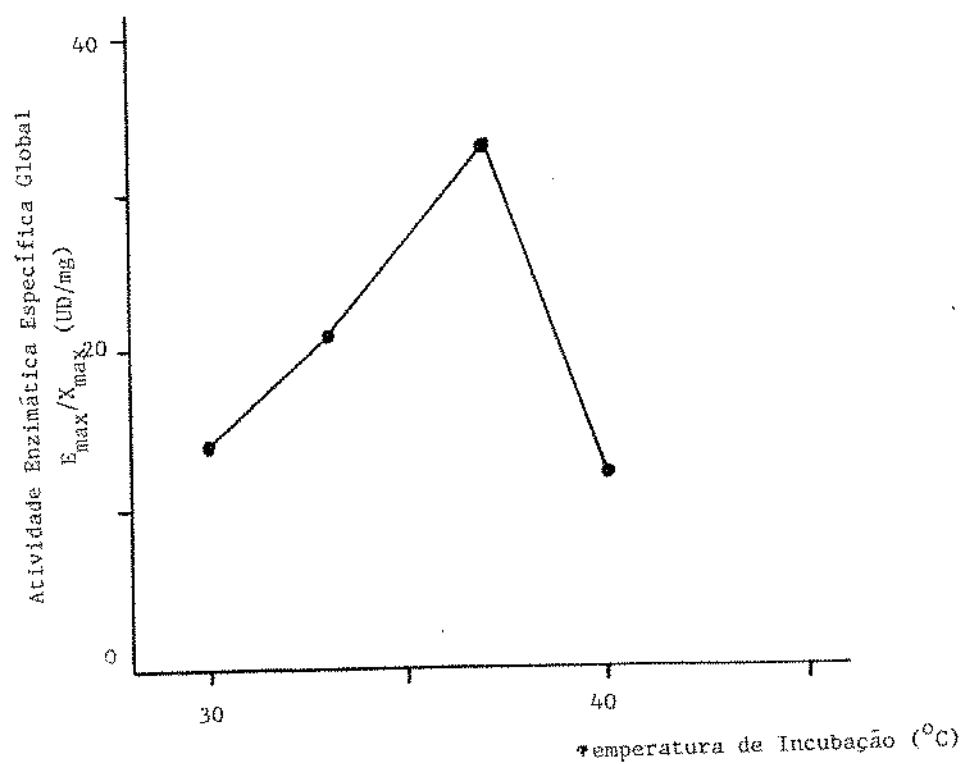


FIGURA 62. Variação da atividade enzimática específica global em função da temperatura de incubação.

centração enzimática máxima ($E_{\max}$) e a concentração celular máxima ($X_{\max}$) aumenta com o aumento da temperatura de incubação na faixa de 30°C a 37°C. À 40°C houve uma menor produção de enzima por unidade de massa celular do que nas demais temperaturas testadas. Esses resultados revelam que 37°C é a temperatura de incubação mais apropriada para a síntese de α -amilase por *Bacillus subtilis* ATCC 601B.

A Figura 63 mostra a variação da produtividade global de α -amilase nas diferentes temperaturas de incubação. O comportamento da variação da produtividade global é semelhante ao observado para a relação $E_{\max}/X_{\max}$ (Figura 62). Nessa, no entanto, observa-se uma menor diferença entre os resultados obtidos a 33°C e a 37°C como consequência dos diferentes tempos de incubação necessários para se obter a concentração enzimática máxima.

As temperaturas de incubação do *Bacillus subtilis* ATCC 601B mais apropriadas para a produção de α -amilase são, portanto, aquelas próprias para a incubação de microrganismos mesófilos. Normalmente as temperaturas empregadas para a produção da enzima por outras linhagens de *Bacillus subtilis* variam entre 30°C e 37°C (4, 24, 30, 35, 44, 58, 66, 68).

4.6. Efeito do pH inicial do meio de cultura sobre a produção de α -amilase

A linhagem *Bacillus subtilis* ATCC 601B não se desenvolveu em meios de cultura cujos valores de pH iniciais foram ajustados a 4,0, 5,0 e 10,0.

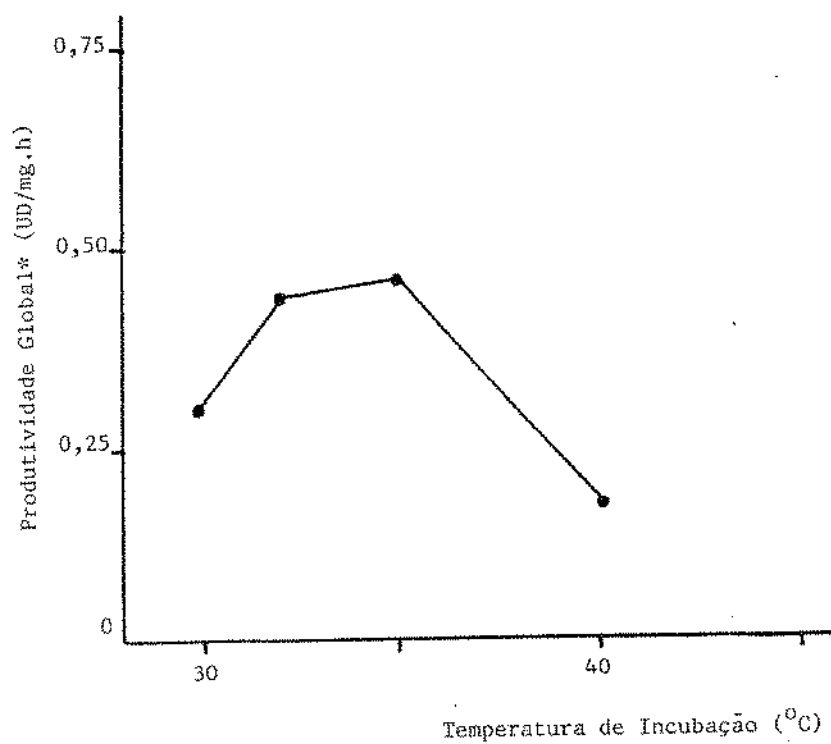


FIGURA 63. Variação da produtividade global em função da temperatura de incubação.

* Considerando a concentração enzimática máxima, a concentração celular máxima atingida no meio de cultura e o tempo necessário para ocorrer a concentração enzimática máxima.

O crescimento microbiano, a variação do pH e a produção de α -amilase nos caldos de cultura cujos valores iniciais de pH foram ajustados a 6,0; 6,5; 7,0; 8,0; 8,5 e 9,0 são apresentados nas Figuras 64 a 69. Observa-se em todos os casos um bom crescimento microbiano com aumento da concentração enzimática durante as 72 horas de fermentação.

A Figura 70 mostra a variação da concentração enzimática com o pH inicial do meio de cultura. A produção de enzima aumenta com o aumento do pH inicial na faixa de 5,0 a 7,0 onde atinge o seu valor máximo. Observa-se também uma redução da quantidade de enzima produzida a valores de pH iniciais superiores a 7,0.

As Figuras 71 e 72 mostram as variações da relação entre a concentração enzimática máxima e a concentração máxima ($E_{\max}/X_{\max}$) e da produtividade global, respectivamente, com os valores de pH inicial do meio de cultura. As duas curvas apresentam o mesmo comportamento com um máximo ao valor de pH inicial igual a 7,0. O fato de se obter um valor máximo para a relação $E_{\max}/X_{\max}$ a pH inicial igual a 7,0 sugere que a esse valor de pH inicial a síntese de α -amilase por *Bacillus subtilis* ATCC 601B é favorecida em relação aos demais.

Os resultados obtidos para o efeito do pH inicial do meio de cultura sobre a síntese de α -amilase por *Bacillus subtilis* ATCC 601B mostram o comportamento normal dos *Bacillus subtilis*. Normalmente as linhagens desse gênero são incubadas em meios de cultura com pH inicial da ordem de 7,0 (4, 24, 44).

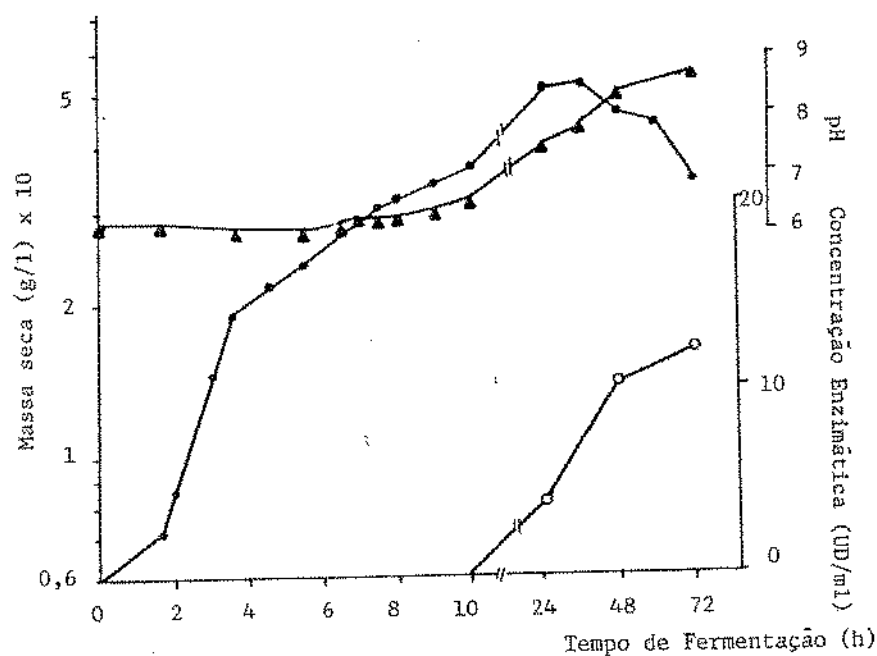


FIGURA 64. Variação do pH (▲▲), da concentração celular (●●) e da concentração enzimática (o-o) com o tempo de fermentação em meio de cultura básico contendo dextrina 4,0g/l, peptona 10,0g/l e extrato de levedura 5,0g/l com pH ajustado a 6,0 antes da esterilização.

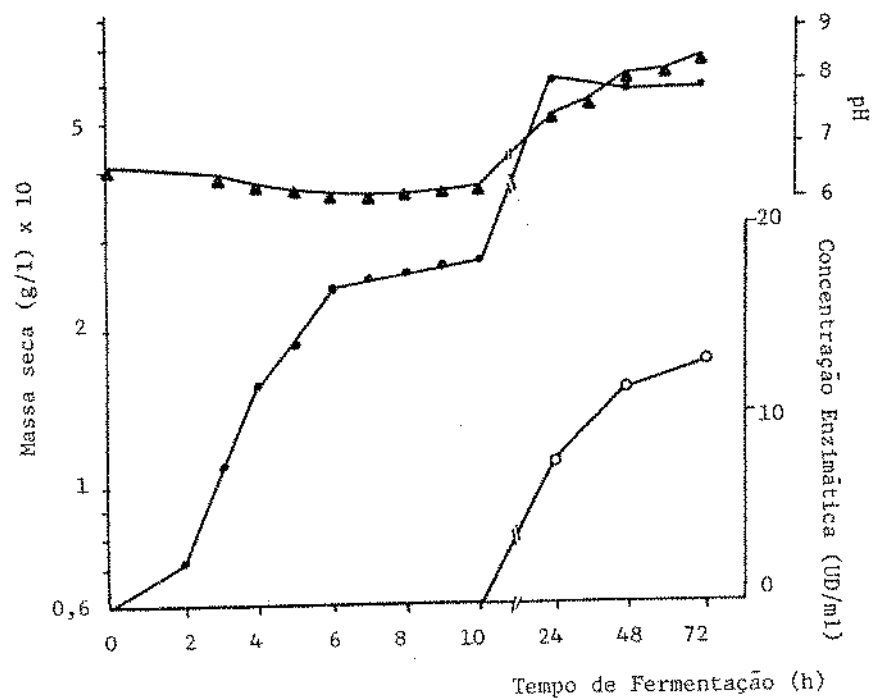


FIGURA 65. Variação do pH (▲▲), da concentração celular (●●) e da concentração enzimática (o-o) com o tempo de fermentação em meio de cultura básico contendo dextrina 4,0g/l, peptona 10,0g/l e extrato de levedura 5,0g/l com pH ajustado a 6,5 antes da esterilização.

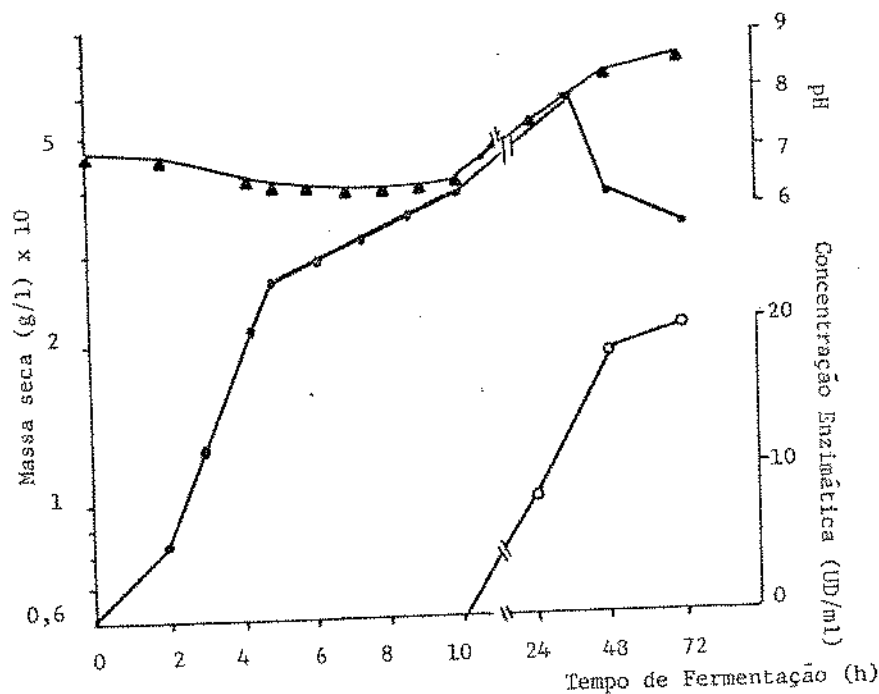


FIGURA 66. Variação do pH (▲), da concentração celular (●) e da concentração enzimática (○) com o tempo de fermentação em meio de cultura básico contendo dextrina 4g/l, peptona 10,0g/l e extrato de levedura 5,0g/l com pH ajustado a 7,0 antes da esterilização.

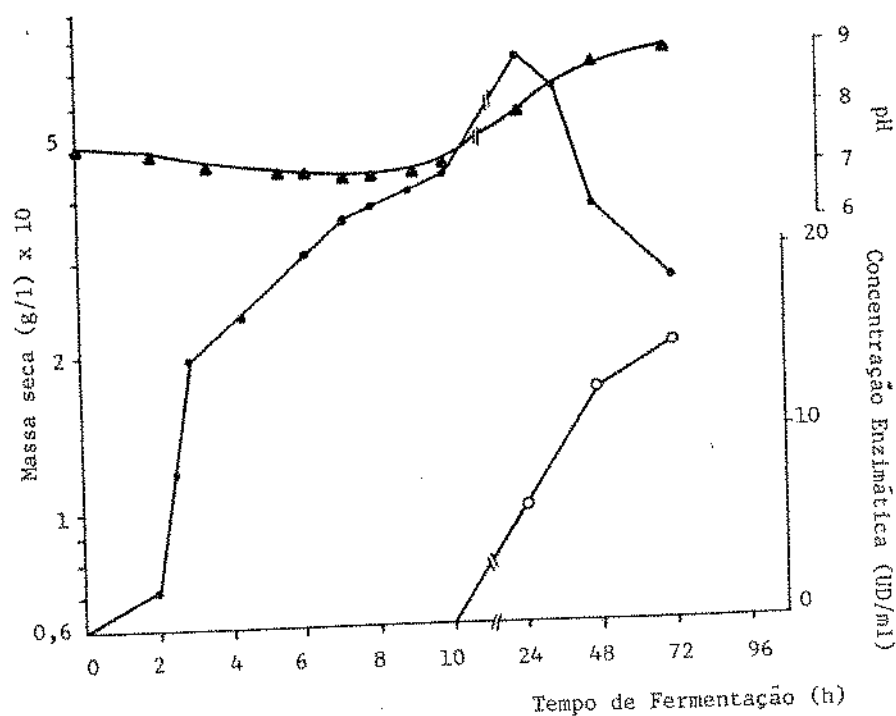


FIGURA 67. Variação do pH (▲), da concentração celular (●) e da concentração enzimática (○) com o tempo de fermentação em meio de cultura básico contendo dextrina 4,0g/l, peptona 10,0g/l e extrato de levedura 5,0g/l com pH ajustado a 8,0 antes da esterilização.

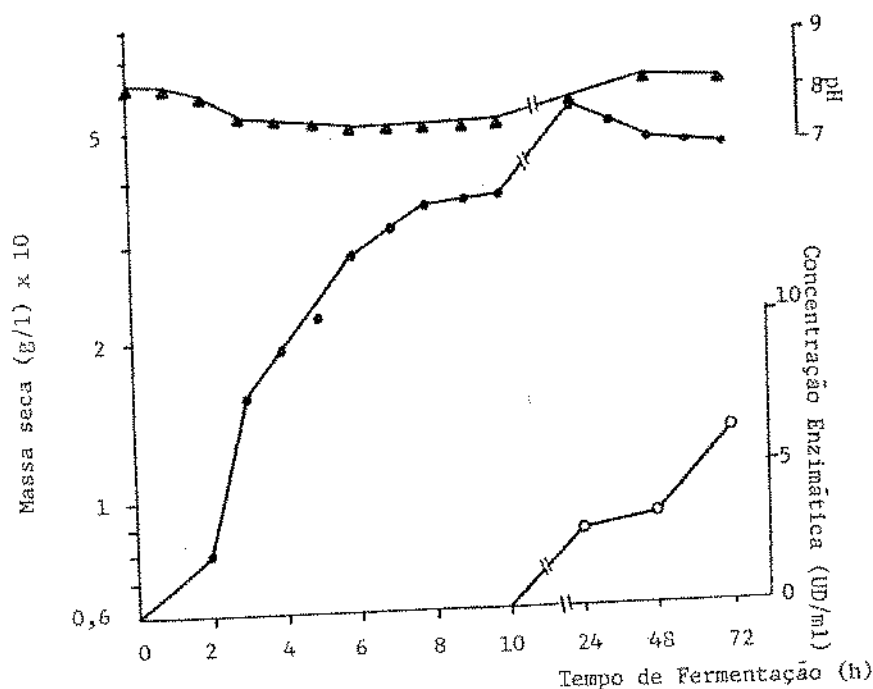


FIGURA 68. Variação do pH (▲), da concentração celular (●) e da concentração enzimática (○) com o tempo de fermentação em meio de cultura básico contendo dextrina 4,0g/l, peptona 10,0g/l e extrato de levedura 5,0g/l com pH ajustado a 8,5 antes da esterilização.

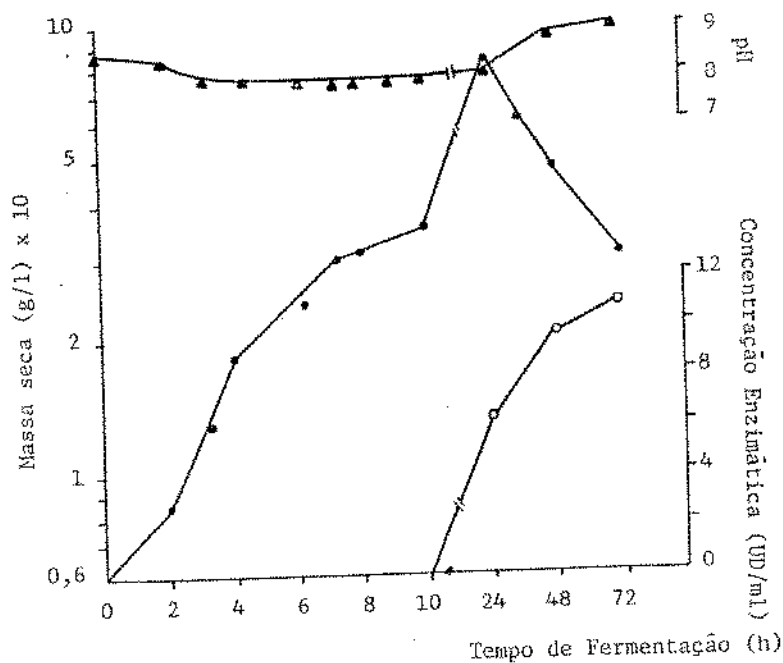


FIGURA 69. Variação do pH (▲), da concentração celular (●) e da concentração enzimática (○) com o tempo de fermentação em meio de cultura básico contendo dextrina 4,0g/l, peptona 10,0g/l e extrato de levedura 5,0g/l com pH ajustado a 9,0 antes da esterilização.

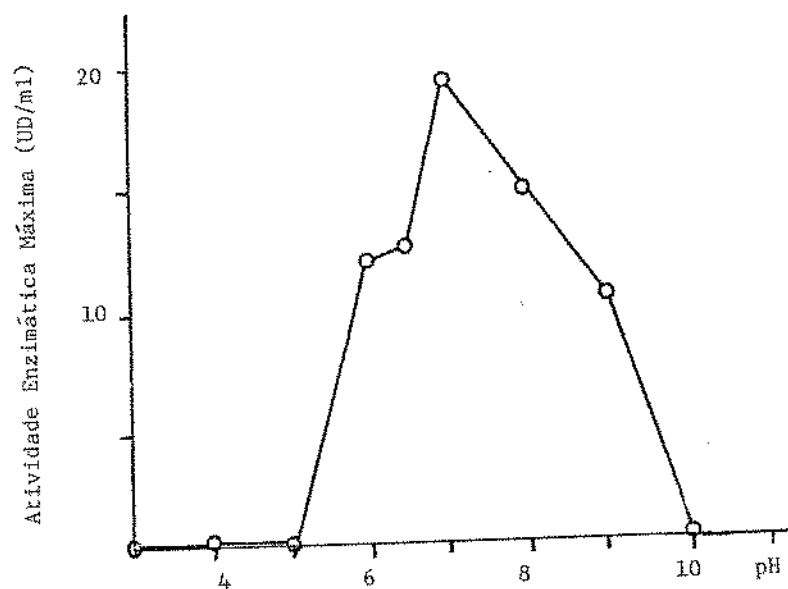


FIGURA 70. Variação da concentração enzimática máxima em função do pH inicial do meio de cultura.

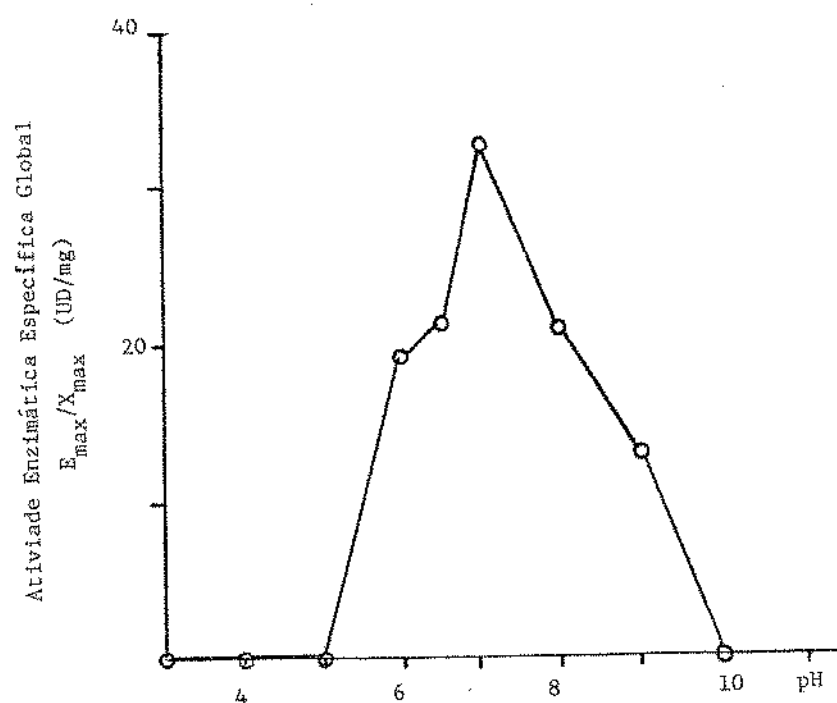


FIGURA 71. Variação da atividade enzimática específica global em função do pH inicial do meio de cultura.

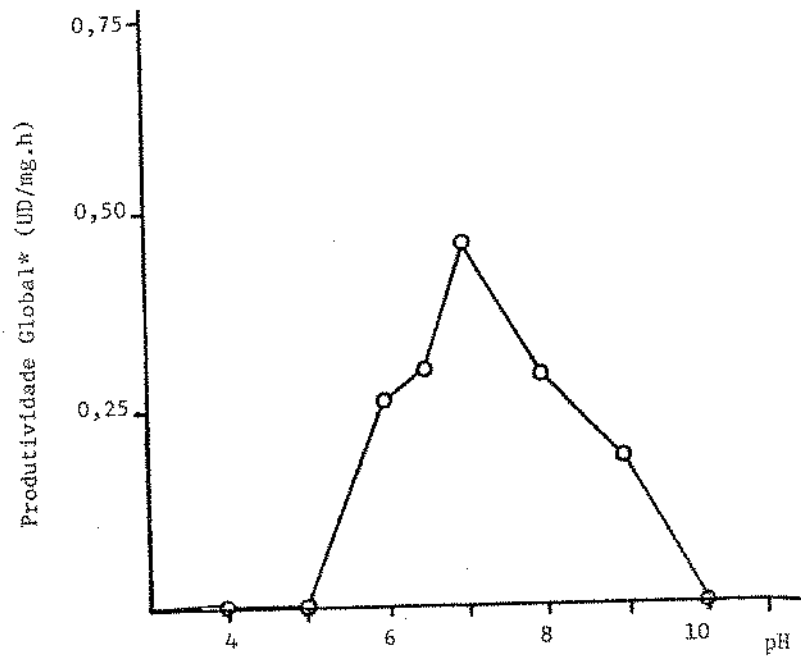


FIGURA 72. Variação da produtividade global em função do pH inicial do meio de cultura.

* Considerando a concentração enzimática máxima, a concentração celular máxima atingida no meio de cultura e o tempo necessário para ocorrer a concentração enzimática máxima.

4.7. Estabilidade térmica da α -amilase bruta

A α -amilase na solução enzimática não dialisada mantém 100% da sua atividade inicial após 25 horas de aquecimento a 37°C (Figura 73). A estabilidade da enzima na solução dialisada, submetida ao mesmo tratamento térmico, é bastante inferior à sua estabilidade na solução não dialisada. Há na solução enzimática dialisada submetida ao mesmo tratamento térmico uma perda de atividade inicial da ordem de 35% (Figura 73). Um dos fatores que, provavelmente, contribuem para a maior estabilidade da α -amilase na solução não dialisada é a presença de íons Ca^{+2} e Mg^{+2} , inicialmente adicionamos ao meio de cultura e extraídos no processo de diálise.

A α -amilase na solução enzimática não dialisada mantém cerca de 84% da sua atividade inicial quando aquecida a 60°C por 30 minutos (Figura 74) ou 96% quando aquecida por 30 minutos a 50°C (Figura 73). A enzima na solução enzimática não dialisada é mais resistente à destruição térmica do que a α -amilase cristalizada de *Bacillus subtilis* estudada por OGASAHARA *et alii* (50). Esses pesquisadores observaram que a α -amilase cristalizada, em solução a pH 7,9, perde 50% da atividade inicial quando aquecida por 30 minutos a 60°C ou 25% quando aquecida por 30 minutos a 50°C. É possível, porém, que a maior estabilidade da α -amilase na solução não dialisada se deva somente à presença de íons Ca^{+2} adicionados inicialmente ao meio de cultura e não adicionados à solução da enzima cristalizada.

A Figura 74 mostra que um aumento na temperatura de aquecimento de 50°C para 60°C implica numa redução bastante acentuada na estabilidade da α -amilase. A enzima em solução não dialisada aquecida durante 40 minutos a 50°C perde cerca de 5% da

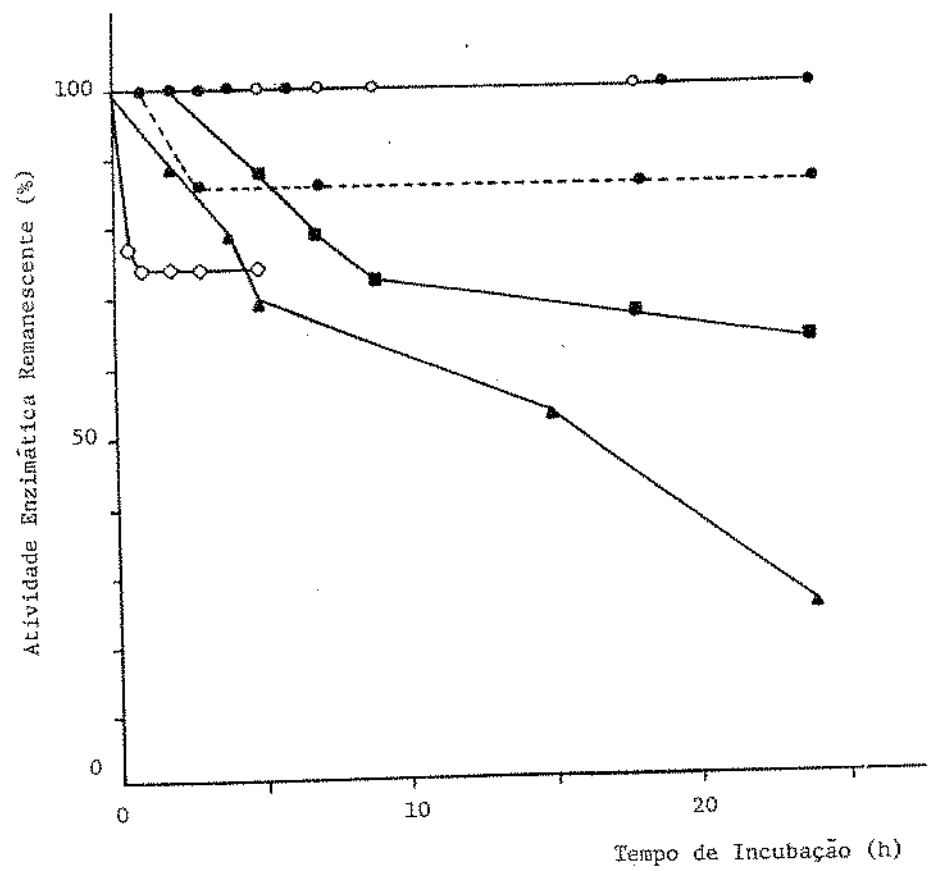


FIGURA 73. Estabilidade térmica da α -amilase. ●● 37°C, ●--● 37°C caído dialisado, ▲ 50°C, ■ 50°C com 10mM Ca^{+2} , ○ 50°C com 20mM Ca^{+2} , ◇ 50°C com 1,3% de amido.

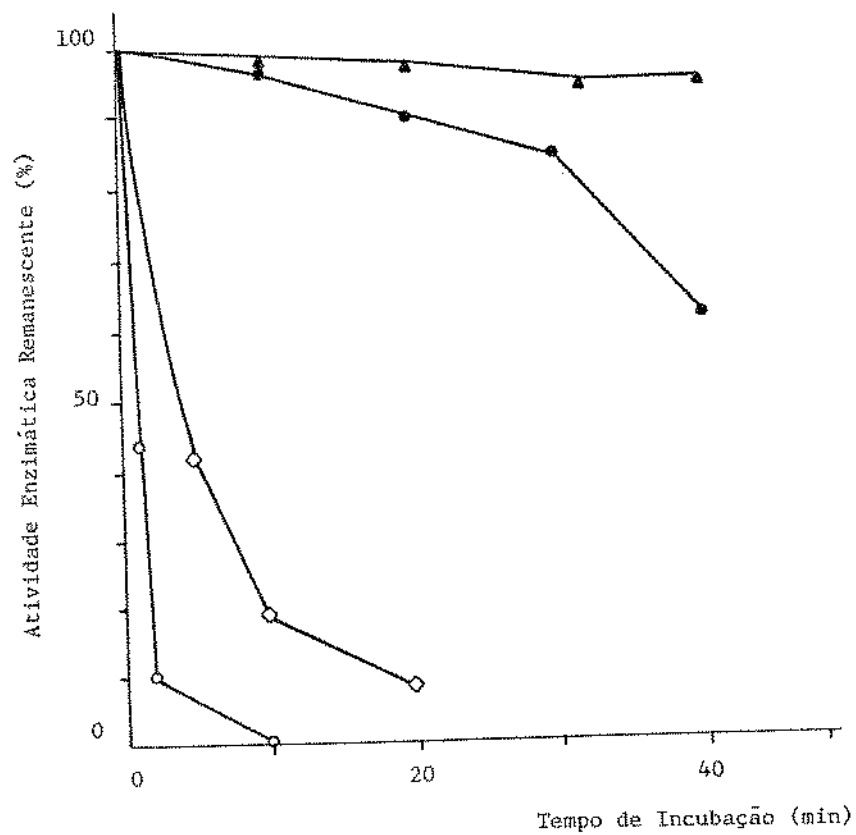


FIGURA 74. Estabilidade térmica da α -amilase. ●● 60°C, ▲▲ 50°C, ◇◇ 50°C EDTA, ○○ 80°C

sua atividade inicial, enquanto que quando aquecida a 60°C perde 40% no mesmo intervalo de tempo. Um efeito semelhante da variação desses 10°C sobre a estabilidade de α -amilase produzida por *Bacillus subtilis* foi observada por TODA *et alii* (59). Esses pesquisadores observaram uma perda de 10% e 70% da atividade da enzima tratada com EDTA a 50°C e 60°C respectivamente.

A α -amilase na solução enzimática não dialisada perde 100% da sua atividade quando aquecida durante 10 minutos a 80°C (Figura 74).

A estabilidade térmica da α -amilase produzida por *Bacillus subtilis* ATCC 601B na solução enzimática não dialisada é maior na presença de amido do que na sua ausência. Após 5 horas de aquecimento a 50°C a atividade enzimática remanescente é de 73% na presença do carboidrato e de 69% na sua ausência (Figura 73). As curvas da Figura 74 mostram que na presença de amido ocorre uma estabilização da enzima após 1 hora de aquecimento. Assim, embora no início do tratamento térmico a atividade enzimática remanescente na solução sem amido seja maior do que com ele, com o decorrer do tempo de aquecimento a situação se inverte com uma maior atividade remanescente na solução contendo o polissacarídeo. É possível que esse também seja o comportamento da solução enzimática em outras temperaturas, o que possibilitaria, o seu emprego na hidrólise de material amiláceo em processos a temperaturas elevadas.

A adição de cálcio à solução enzimática não dialisada aumenta a resistência térmica da α -amilase conforme mostram os resultados da Figura 73. Após 24 horas de aquecimento a 50°C a enzima mantém apenas 25% da sua atividade inicial na solução não dialisada. A adição de 10mM ou 20mM de Ca^{+2} elevará essa por

centagem para 64% e 100% respectivamente. KENNEDY *et alii* (29) também estudaram o efeito do íon Ca^{+2} sobre a estabilidade térmica de uma enzima bruta de *Bacillus subtilis* (Ref. JFK) e observaram igualmente que o íon em solução estabiliza acentuadamente a enzima. Nesse caso foi observado que enquanto o aquecimento por 24 horas a 60°C na presença, de 10mM Ca^{+2} causava uma redução da ordem de 5% na atividade enzimática, o mesmo tratamento na ausência do íon causava uma redução de 30% no mesmo intervalo de tempo e na mesma temperatura.

Resultados que comprovam a importância do íon Ca^{+2} na estabilidade térmica da α -amilase foram obtidos quando se adicionou 10mM de EDTA à solução enzimática não dialisada. Pode-se observar na Figura 74 que a adição dessa quantidade do quelante à solução enzimática fez com que o comportamento da enzima aquecida a 50°C se assemelhasse ao observado a 80°C . Na ausência de EDTA a enzima mantém, por exemplo, 89% da sua atividade inicial após 1 hora de aquecimento a 50°C . Na presença do quelante a enzima mantém apenas 9% da atividade inicial após 20 minutos de aquecimento à mesma temperatura.

A α -amilase produzida por *Bacillus subtilis* ATCC 601B se mostrou menos sensível ao tratamento térmico com EDTA do que a α -amilase cristalina de *Bacillus subtilis* estudada por OGASAHARA *et alii* (50). Essa enzima foi completamente inativada quando sua solução a pH 6,5 foi aquecida a 50°C durante 15 minutos na presença de 10mM do quelante. A enzima bruta de *Bacillus subtilis* ATCC 601B mantém, sob as mesmas condições, cerca de 12% da sua atividade inicial. Provavelmente, ao menos em parte, a menor sensibilidade dessa enzima ao tratamento com EDTA se deve também aos íons Ca^{+2} livres na solução enzimática não dialisada. Possivelmente neste caso, parte do quelante se combinaria

com esses íons resultando numa menor quantidade disponível para complexar os íons da molécula enzimática.

4.8. Efeito da temperatura sobre a atividade da α -amilase bruta

A α -amilase em solução não dialisada mostrou uma atividade crescente entre 30°C e 50°C, onde atinge o seu valor máximo. Entre 50°C e 80°C ocorre uma redução da atividade enzimática numa taxa de 25% para cada acréscimo de 10°C na temperatura de hidrólise (Figura 75). A temperatura ótima ao redor de 50°C é inferior à temperatura ótima de outras α -amilases de *Bacillus subtilis* brutas (29, 38) ou purificadas (2, 64). Para estas enzimas a temperatura ótima de atividade amilolítica está na faixa de 60-70°C a pH 5,8-6,0.

4.9. Efeito do pH sobre a atividade da α -amilase bruta

A Figura 76 mostra o perfil da atividade da α -amilase em solução não dialisada com o pH do meio de hidrólise. Em solução tampão de ácido cítrico - fosfato de sódio o pH ótimo da enzima é 6,4. Há uma redução da atividade da ordem de 15% a valores de pH iguais a 5,0 ou 7,0. Essa faixa de pH compreendida entre 5,0 e 7,0 coincide na literatura (2). WELKER *et alii* (64) obtiveram para a α -amilase de *Bacillus subtilis* purificada pH ótimo igual a 6,3, por exemplo.

KENNEDY *et alii* (29) trabalhando com α -amilase bruta de *Bacillus subtilis* obtiveram valores ótimos de pH iguais a 5,8 e 5,0 em tampão acetato e Tris-ácido-acético respectivamente.

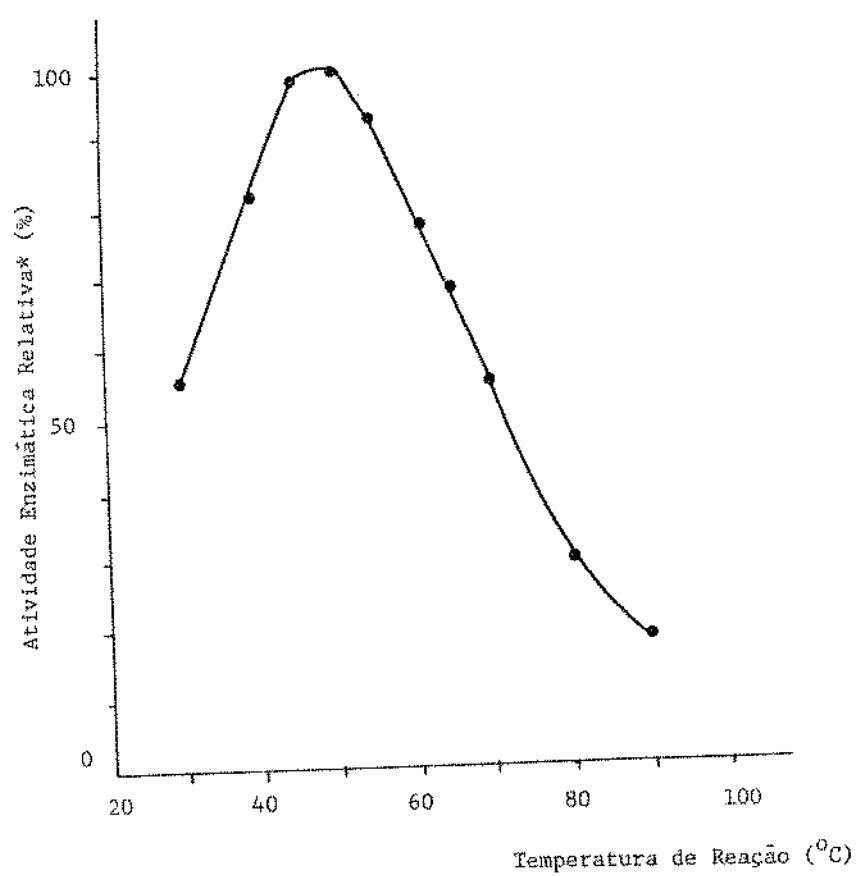


FIGURA 75. Efeito da temperatura sobre a atividade da α -amilase.

* Atividade enzimática máxima foi considerada como 100%.

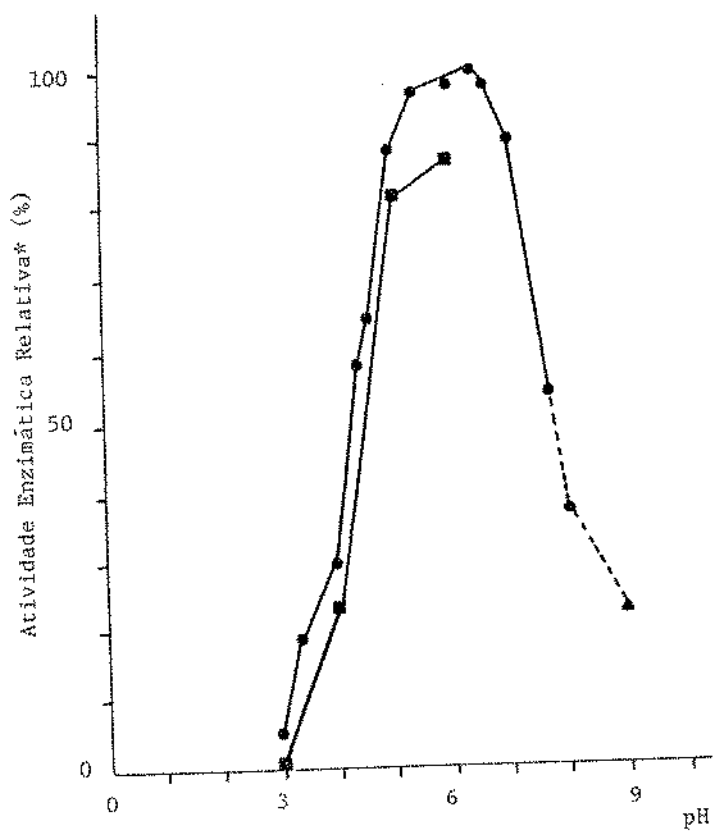


FIGURA 76. Efeito do pH sobre a atividade da α -amilase. ■-■ tampão citrato de sódio - ácido cítrico, ●-● tampão ácido cítrico - fosfato de sódio, ●-●-● tampão fosfato, ●-▲ tampão borato de sódio - HCl.

* A atividade enzimática máxima foi considerada como 100%.

te. A atividade da α -amilase bruta de *Bacillus subtilis* ATCC 601B também varia não apenas com o valor do pH mas também com a composição da solução tampão empregada. A Figura 76 mostra como a composição da solução tampão afeta a atividade da α -amilase produzida por *Bacillus subtilis* ATCC 601B na faixa de pH entre 3,0 e 6,0. Pode-se observar pela Figura que a pH 6,0 em solução tampão de ácido cítrico - fosfato de sódio obtém-se 96% da atividade enzimática máxima e em tampão de ácido cítrico - citrato de sódio obtém-se 86% da atividade.

4.10. Caráter α ou β amilolítico da enzima

A Figura 77 mostra a rotação ótica da mistura de digestão do amido pela amilase produzida por *Bacillus subtilis* ATCC 601B. A rotação ótica do digerido que a pH 6,0 é igual a $+1,38^\circ$ passa a ser $+1,34^\circ$ a pH 10,8. Segundo ROBYT *et alii* (48) e BOYER *et alii* (7), a redução da rotação ótica do digerido sob adição de alcali indica a presença de açúcares com carbono anomérico na posição α , revelando assim que a enzima hidrolítica é uma α -amilase.

4.11. Ação hidrolítica da α -amilase sobre amido

Os produtos da hidrólise do amido pela α -amilase de *Bacillus subtilis* ATCC 601B são mostrados na Figura 78. Não se nota diferença entre os açúcares obtidos com 24 ou 48 horas de hidrólise, provavelmente porque após 24 horas a hidrólise do substrato estava completa. Considera-se pouco possível ter havi

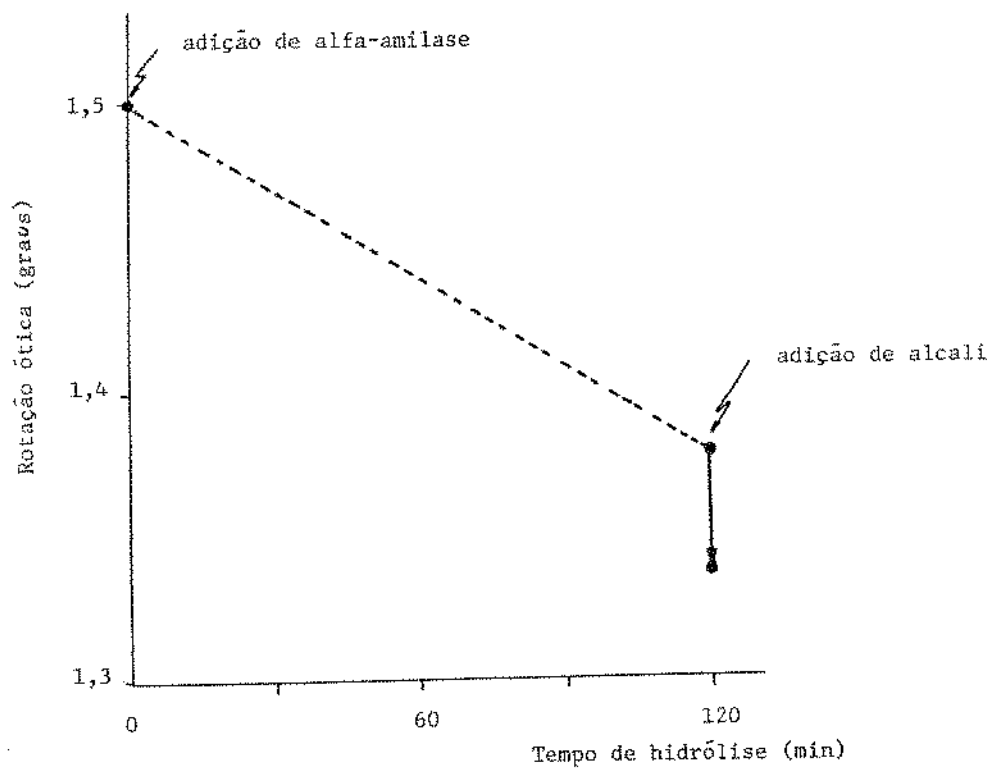


FIGURA 77. Rotação ótica da solução de amido e do hidrolisado de amido pela α -am_ilase antes e depois da adição de alcali.

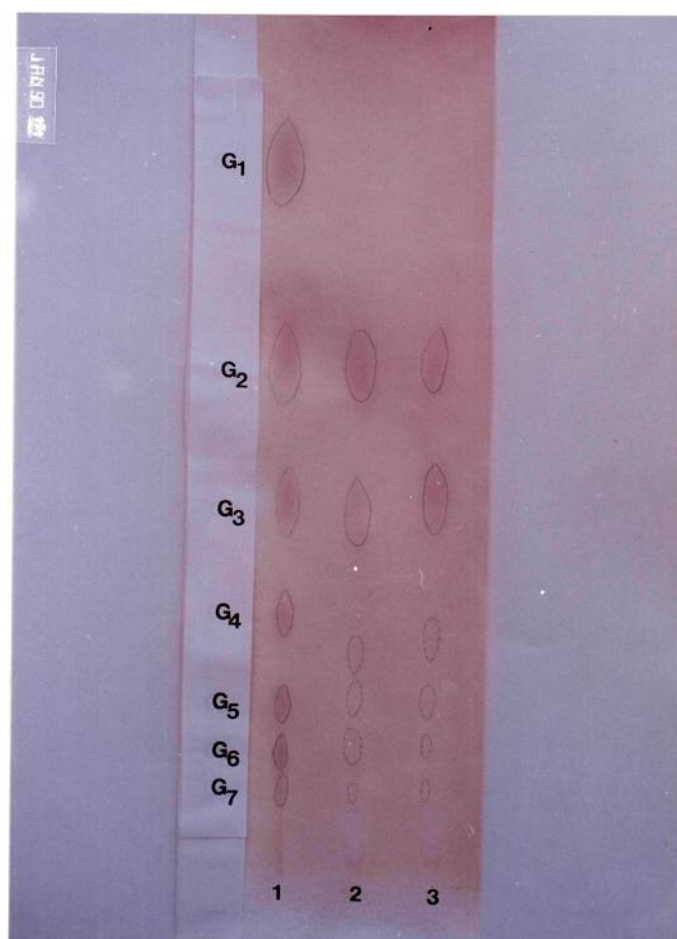


FIGURA 78. Análise cromatográfica dos produtos de hidrólise do amido pela α -amilase de Bacillus subtilis ATCC 601B.

1 - Mistura de padrões: G_1 (glicose), G_2 (maltose), G_3 (maltotriose), G_4 (maltotetraose), G_5 (maltopentaose), G_6 (maltohexaose), G_7 (maltoheptaose).

2 e 3 - Produtos da hidrólise de amido resultantes da ação da enzima por 24 e 48 horas respectivamente.

do uma inativação da enzima porque além de ser naturalmente bastante estável a 37°C, a presença do substrato garante-lhe uma maior resistência ao tratamento térmico (ver item 4.6.). Os açúcares preponderantemente formados são a maltose e a maltotriose. Em menores proporções aparecem também a maltopentaose, maltohexaose e maltoheptaose.

5. CONCLUSÕES

1. A linhagem *Bacillus subtilis* ATCC 601B produz α -amilase em meio de cultura contendo glicose como única fonte de carbono sendo portanto uma enzima constitutiva.
2. A síntese da enzima sofre repressão catabólita em meio de cultura contendo glicose, amido solúvel, dextrina e lactose. A repressão catabólita é tanto mais acentuada quanto maior é a concentração inicial de glicose, dextrina e amido solúvel.
3. As concentrações iniciais mais adequadas de glicose, amido solúvel, dextrina e lactose para a produção de α -amilase são respectivamente, 0,1 ou 30g/l, 20g/l, 10g/l e 10,0g/l.
4. O efeito da fonte de carbono sobre a atividade enzimática específica global ($E_{\max}/X_{\max}$) depende da concentração inicial

do carboidrato. Porém, para as concentrações iniciais de carboidratos compreendidos entre 1,0g/l e 20,0g/l a atividade enzimática específica global é maior para a dextrina, seguida de amido solúvel, lactose e por último a glicose.

5. Os resultados sugerem que a síntese da enzima é estimulada por carboidratos provenientes da hidrólise de amido solúvel e dextrina e/ou por metabólitos formados durante a fermentação em meios de cultura contendo inicialmente dextrina, amido solúvel e glicose.
6. Tanto a glicose quanto a dextrina são boas fontes de carbono para a produção de α -amilase quando empregadas em concentrações iniciais iguais a 0,1g/l e 10,0g/l respectivamente. A primeira por proporcionar uma elevada concentração celular e a segunda por produzir metabólitos ou produtos de hidrólise que estimulam a síntese enzimática.
7. A lactose se mostrou a fonte de carbono menos adequada para a produção de α -amilase quando empregada em concentrações iniciais compreendidas entre 5g/l e 30g/l. O efeito da lactose se deve principalmente ao baixo desenvolvimento do microrganismo no meio de cultura.
8. A produção de α -amilase em meio de cultura contendo glicose como fonte de carbono se dá mesmo durante a fase logarítmica de crescimento. A maior produção da enzima foi, no entanto, observada durante a fase estacionária e de lise celular, coincidindo com a fase em que ocorre a esporulação do microrganismo.

9. Dentre as concentrações iniciais de peptona estudadas a mais adequada para a produção de α -amilase foi 10,0g/l. A adição de peptona ao meio de cultura em concentrações variando entre 0,0g/l e 12,5g/l afeta o crescimento celular e não a síntese enzimática propriamente dita.
10. A concentração de extrato de levedura mais adequada para a produção de α -amilase foi 5,0g/l. O efeito do extrato de levedura se manifesta diretamente sobre a síntese da enzima e não apenas sobre o desenvolvimento do microrganismo.
11. A temperatura de incubação e o pH inicial do meio de cultura mais adequados para a síntese de α -amilase foram 37°C e 7,0 respectivamente.
12. A enzima bruta em solução não dialisada mantém 100% da sua atividade inicial após 25 horas de incubação a 37°C, perdendo totalmente a sua atividade após uma incubação por 10 minutos a 80°C.
13. Amido solúvel e cálcio estabilizam a enzima enquanto que a adição de apenas 10mM de EDTA é suficiente para desestabilizá-la completamente.
14. O pH e a temperatura ótimos da enzima estão ao redor de 6,4 e 50°C respectivamente em solução tampão ácido cítrico - fosfato de sódio.

15. A análise cromatográfica revela que não há formação de glicose quando o amido solúvel é submetido à ação da enzima a 37°C e a pH 6,0. O amido solúvel quando hidrolisado pela enzima produz maltose, maltotriose, maltopentaose, maltohexaose e maltoheptaose.

6. BIBLIOGRAFIA

1. ALAM, S.; HONG, J. & WEIGAND, W.A. Effect of yeast extract on α -amylase synthesis by *Bacillus amyloliquefaciens*. *Biotechnology and Bioengineering*, 33:780-785, 1989.
2. ALLEN, W.G. & SPRADLIN, J.E. Amylases and their properties. *Brewers Digest*, 49(7):48-50, 52, 53, 65, 1974.
3. ANTRANIKIAN, G.; ZABLOWSKI, P. & GOTTSCHALK, G. Conditions for the over production and excretion of thermostable α -amylase and pullulanases from *Clostridium thermohydrosulfuricum* DMS 567. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 27(1): 75, 1987.
4. BAIG, M.A.; PAZLARVNÁ, J. VOTRUBA, J. Kinetics of α -amylase production in a batch and a fed-batch culture of *Bacillus subtilis*. *Folia Microbiologica*, 29:359-364, 1984.

5. BAJPAI, P. & BAJPAI, P.K. High temperature alkaline α -amylase from *Bacillus licheniformis* TCRDC-B13. *Biotechnology and Bioengineering*, 33:72-78, 1989.
6. BERNFELD, B. Amylases, α and β . In: Colowick, S.P. *Methods in Enzymology*, 4^a edição, New York, Academic Press, 1955, Vol. 1, Cap. 17.
7. BOYER, E.W. & INGLE, M.B. Extracellular alkaline amylase from a *Bacillus* species. *Journal of Bacteriology*, 110(3): 992-1000, 1972.
8. BUONOCORE, V.; CAPORALE, C.; ROSA, M. & GAMBACORTA, S. Stable, inducible thermoacidophilic α -amylase from *Bacillus acidocaldarius*. *Journal of Bacteriology*, 128(2):515-521, 1976.
9. CHANDRA, A.K.; MEDDA, S. & BHADRA, A.K. Production of extracellular thermostable α -amylase by *Bacillus licheniformis*. *Journal of Fermentation Technology*, 58(1):1-10, 1980.
10. CHENG, C.Y.; YABLE, I. & TODA, K. Predominant growth of α -amylase regulation mutant in continuous culture of *Bacillus caldolyticus*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 67(3):176-181, 1989.
11. COLEMAN, G. & ELLIOT, W.H. Studies on α -amylase formation by *Bacillus subtilis*. *Biochemical Journal*, 83:256-263, 1962.

12. COLEMAN, G. & GRANT, M.A. Characteristics of α -amylase formation by *Bacillus subtilis*. *Nature*, 211:306-307, 1966.
13. COLEMAN, G. Studies on the regulation of extracellular enzyme formation by *Bacillus subtilis*. *Journal of General Microbiology*, 49:421-431, 1967.
14. COLEMAN, G.; BROWN, S. & STORMONTH, D.A. A model for the regulation of bacterial extracellular enzyme and toxin biosynthesis. *Journal of Theoretical Biology*, 52(1): 143-148, 1975.
15. CORK, D.J. & MCLEMORE, S. Exoenzymes Synthesis Associated with two strains of *Bacillus subtilis*. Proceedings of the Thirtyseventh General Meeting of the Society for Industrial Microbiology, 1980, Cap. 60, p.668-674.
16. DANCER, B.N. & MANDELSTAM, J. Criteria for categorizing early biochemical events occurring during sporulation of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 121(2):411-415, 1975.
17. EMANUILOVA, E.I. & TODA, K. α -amylase production in batch and continuous cultures by *Bacillus caldolyticus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 19(5):301-305, 1984.
18. FOGARTH, W.M. & KELLY, C.T. Amylases, amyloglicosidases and related glucanases. In: ROSE, A.H. *Microbial enzymes and bioconversions*. England, Academic Press, 1980, Vol. 5, Cap. 3.

19. FRANCIS, F.J.; DRAETTA, I.; BALDINI, V. & IADEROZA, M. New anthocyanins from *Tibouclina granulosa*. Journal of the American Society for Horticultural Science, 107(5):789-791, 1983.
20. FUKUMOTO, J.; YAMAMOTO, I. & TSURU, D. Effects of carbon sources and base analogues of nucleic acid on the formation of bacterial amylase. Nature, 180:438-439, 1957.
21. GANDHI, A.P. & KJAERGAARD, L. Effect of carbon dioxide on the formation of α -amylase by *Bacillus subtilis* growing in continuous and batch cultures. Biotechnology and Bioengineering, 17:1109-1118, 1975.
22. GLENN, A.R.; BOTH, G.W.; MCINNES, J.L.; MAY, B.K. & ELLIOT, W.H. Dynamic state of the messenger RNA pool specific for extracellular protease in *Bacillus amyloliquefaciens*: its relevance to the mechanism of enzyme secretion. Journal of Molecular Biology, 73:221-230, 1973.
23. GRUENINGER, H.; SONNL, B. & FIECHTER, A. Bacterial diversity in thermophilic aerobic sewage sludge. III. A source of organisms producing heat stable industrial useful enzymes, e.g. α -amylase. Applied Microbiology and Biotechnology, 19(6):414-422, 1984.
24. HAYASHI, T.; ABIBA, T. & HORIKOSHI, K. Properties of new alkaline maltohexaose forming amylases. Applied Microbiology and Biotechnology, 28(3):281-285, 1988.

25. HEINEKEN, F.G. & O'CONNOR, R.J. Continuous culture studies on the biosynthesis of alkaline protease, neutral protease and α -amylase by *Bacillus subtilis* NRRL-B 3411. *Journal of General Microbiology*, 73:35-44, 1972.
26. HORIKOSHI, K. Production of alkaline enzymes by alkalophilic microorganisms. Part II. Alkaline amylases produced by *Bacillus* N^o A-40-2. *Agricultural and Biological Chemistry*, 35(11):1783-1791, 1971.
27. INGLE, M.B. & ERICKSON, R.J. Bacterial α -amylases. *Advances in Applied Microbiology*, 24:257-279, 1978.
28. JUNGE, J.M.; STEIN, E.A.; NEURATH, H. & FISHER, E.H. The amino acid composition of α -amylase from *Bacillus subtilis*. *Journal of Biological Chemistry*, 234:556-561, 1989.
29. KENNEDY, F. & WHITE, C.A. Characteristics of α -amylase K, a novel amylase from a strain of *Bacillus subtilis*. *Starch*, 31(3):93-99, 1979.
30. KINOSHITA, S.; OKADA, H. & TERUI, G. On the nature of α -amylase forming system in *Bacillus subtilis* - stability of the mRNA for α -amylase. *Journal of Fermentation Technology*, 46(6):427-436, 1968.
31. KOKOBU, T.; KARUBE, I. & SUZUKI, S. α -Amylase production by immobilized whole cells of *Bacillus subtilis*. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 5(4):233-240, 1978.

32. KRISHNAN, T. & CHANDRA, A.K. Purification and characterization of α -amylase from *Bacillus licheniformis* CUM 305. Applied and Environmental Microbiology, 46:430-437, 1983.
33. LAMPEN, J.O. In: Function and structure in microorganisms. Ed. POLLOCK, M.R. & RICHMOND, M.H. Cambridge University Press, London, N.Y., pp.115-133, 1975.
34. MANNING, G.B.; CAMPLELL, L.L. & FOSTER, R.J. Thermostable α -amylase of *Bacillus stearothermophilus*. III. Physical properties and molecular weight. Journal of Biological Chemistry, 236(11):2958-2961, 1961.
35. MAZZA, L.A. & ERTOLA, R.J. Influence of pH and aeration on bacterial formation of α -amylase. Applied Microbiology, 19:535, 1970.
36. MEDDA, S. & CHANDRA, K. New strains of *Bacillus licheniformis* and *Bacillus coagulans* producing thermostable α -amylase active at alkaline pH. Journal of Applied Bacteriology, 48:47-58, 1980.
37. MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry, 31: 426-428, 1959.
38. MOSELEY, M. & KEAY, L. Purification and characterization of the amylase of *Bacillus subtilis* NRRL B 3411. Biotechnology and Bioengineering, 12:251-271, 1970.

39. NAGATA, Y.; YAMAUCHI, H. & MARUO, B. Assay of messenger activity of RNA from *Bacillus subtilis* in heterologous cell-free system and its relation to α -amylase productivity. *Agricultural and Biological Chemistry*, 44(6): 1283-1289, 1980.
40. NAGATA, Y.; YAMAGUCHI, K. & MARUO, B. Genetic and biochemical studies on cell-bound α -amylase in *Bacillus subtilis* Marburg. *Journal of Bacteriology*, 119(2):425-430, 1974.
41. NICHOLSON, W.L. & CHAMBLISS, G.H. Isolation and characterization of a cis-activity mutation conferring catabolite repression resistance to α -amylase synthesis in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 161(3):875-881, 1985.
42. NICHOLSON, W.L.; PARK, Y.K.; HENKIN, T.M.; WON, M.; WEIKERT, M.J.; GASBELL, J.A. & CHAMBLISS, G.H. Catabolite repression resistant mutations of the *Bacillus subtilis* α -amylase promoter affect transcription levels and are in a operator-like sequence. *Journal of Molecular Biology*, 198:609-618, 1987.
43. OGASAHARA, K.; IMANISHI, A. & ISEMURA, T. Studies on thermophilic α -amylase from *Bacillus stearothermophilus*. II. Thermal stability of thermophilic α -amylase. *The Journal of Biochemistry*, 67(1):77-82, 1970.
44. OISHI, M.; TAKAHASHI, H. & MARUO, B. Intracellular α -amylase in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 85: 246-248, 1963.

45. OKADA, S.; KITAHATA, S.; HIGASHIHARA, M. & FUKUMATO, J.
Classification of α -amylases by the action patterns on
maltodigosaccharides. *Agricultural and Biological Chemistry*, 33(6):900-906, 1969.
46. PFUELLER, S.I. & ELLIOT, W.H. The extracellular α -amylase
of *Bacillus stearothermophilus*. *Journal of Biological
Chemistry*, 244:48-54, 1969.
47. PRIEST, F.G. Extracellular enzyme synthesis in the genus
Bacillus. *Bacteriological Review*, 41(3):711-753, 1977.
48. ROBYT, J. & FRENCH, D. Purification and action pattern of
an amylase from *Bacillus polymyxa*. *Archives of Biochemistry
and Biophysics*, 104:338-345, 1964.
49. ROYCHOUDHURY, S.; PARULEKAR, S.J. & WEIGARD, W. Cell growth
and α -amylase production characteristics of *Bacillus
amyloliquefaciens*. *Biotechnology and Bioengineering*,
33:197-206, 1989.
50. SAITO, N. A thermophilic extracellular α -amylase from
Bacillus licheniformis. *Archives of Biochemistry and
Biophysics*, 155:290-298, 1973.
51. SAITO, N. & YAMAMOTO, K. Regulatory factors affecting α -amy
lase production in *Bacillus licheniformis*. *Journal of
Bacteriology*, 121(3):848-856, 1975.

52. SCHAEFFER, P. Asporogenous mutants of *Bacillus subtilis* Marburg. *Folia Microbiologica*, 12:291-296, 1967.
53. SEKIGUCHI, J. & OKADA, H. Regulation of α -amylase production in a *Bacillus subtilis* Marburg strain I. Isolation of mutants which produce high levels of α -amylase and analysis. *Journal of Fermentation Technology*, 50(12): 801-809, 1972.
54. SHINMYO, A.; KIMURA, H. & OKADA, H. Physiology of α -amylase production by immobilized *Bacillus amyloliquefaciens*. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 14:7-12, 1982.
55. SMITH, B.W. & ROE, J.H. A photometric method for the determination of α -amylase in blood and urine, with use of the starch-iodine color. *Journal of Biological Chemistry*, 179:53-59, 1949.
56. STEIN, E.A. & FISHER, E.H. The resistance of α -amylase towards proteolytic attack. *Journal of Biological Chemistry*, 232:867-879, 1958.
57. TSAO, G.T. & HARRISON, T.P. Extended Monod equation for batch cultures with multiple exponential phases. *Biotechnology and Bioengineering*, 17:1591-1598, 1975.
58. TSUCHIYA, K.; SHINJO, A.; SHIMOYAMA, K.; OKAZAKI, M. & MIURA, Y. Characteristics of α -amylase production by *Bacillus subtilis* KYA 741. *Journal of Fermentation Technology*, 53(4):199-206, 1975.

59. TODA, H. & NARITA, K. Correlation of the sulfhydryl group with the essential calcium in *Bacillus subtilis* saccharifying α -amylase. The Journal of Biochemistry, 63(3): 302-307, 1968.
60. UMEKI, K. & YAMAMOTO, T. Structures of branched dextrins produced by saccharifying α -amylase of *Bacillus subtilis*. Journal of Biochemistry, 72:1219-1226, 1972.
61. VALLEE, B.; SUMERWELL, W.N. & FISHER, E. Metal content of α -amylase of various origins. Journal of Biological Chemistry, 234(11):2901-2905, 1959.
62. WELKER, N.E. & CAMPBELL, L.L. Effect of carbon sources on formation of α -amylase by *Bacillus stearothermophilus*. Journal of Bacteriology, 86:681-686, 1963.
63. WELKER, N.E. & CAMPBELL, L.L. Preferential synthesis of α -amylase by *Bacillus stearothermophilus* in the presence of 5-methylthryptophane. Journal of Bacteriology, 87:828-831, 1964.
64. WELKER, N.E. & CAMPBELL, L.L. Comparison of the α -amylase of *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens*. Journal of Bacteriology, 94(4):1131-1135, 1967.
65. WOODS, D.D. The biochemical mode of action of the sulpho-
namide drugs. Journal of General Microbiology, 29:687-
-702, 1962.

66. YAMAGUCHI, K.; NAGATA, Y. & MARUO, B. Genetic control of the rate of α -amylase synthesis in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 119(2):410-415, 1974.
67. YAMANE, K. & MARUO, B. Properties of thermosensitive extracellular α -amylase of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 120(2):792-798, 1974.
68. YONEDA, Y.; YAMANE, K.; YAMAGUCHI, K.; NAGATA, Y. & MARUO, B. Transformation of *Bacillus subtilis* in α -amylase productivity by deoxyribonucleic acid from *B. subtilis* var. *amylosacchariticus*. *Journal of Bacteriology*, 120(3):1144-1150, 1974.
69. YONEDA, Y. & MARUO, B. Mutation of *Bacillus subtilis* causing hyperproduction of α -amylase and protease and its synergistic effect. *Journal of Bacteriology*, 124(1):48-54, 1975.
70. YOO, Y.J.; CADMAN, T.W.; HONG, J. & HATCH, R. Kinetics of α -amylase synthesis from *Bacillus amyloliquefaciens*. *Biotechnology and Bioengineering*, 31:357-365, 1988.