

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS**

***PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO PARCIAL,
CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÕES DE
ALFA-AMILASE TERMOESTÁVEL
PRODUZIDA POR BACTÉRIAS***

LUCIANA AFONSO BITTAR TAFFARELLO

Engenheira de Alimentos

Profa. Dra. GLÁUCIA MARIA PASTORE

Orientadora

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da
Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do título de
Mestre em Ciência de Alimentos

Campinas – 2004

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. – UNICAMP

T123p Taffarello, Luciana Afonso Bittar
Produção, purificação parcial, caracterização e
aplicações de alfa-amilase termoestável produzida por
bactérias / Luciana Afonso Bittar Taffarello.—Campinas,
SP: [s.n.], 2004.

Orientador: Gláucia Maria Pastore
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Amilases. 2.Bacillus (Bactéria). 3.Estabilidade. 4.
Hidrólise. 5.Amido. I.Pastore, Gláucia Maria.
II.Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de
Engenharia de Alimentos. III.Título.

Banca Examinadora

Tese defendida e aprovada em de fevereiro de 2004

pela banca examinadora constituída pelos professores:

Profa. Dra. Gláucia Maria Pastore
(DCA – FEA – Unicamp)
(Orientadora)

Profa. Dra. Hilary Castle de Menezes
(DTA – FEA – Unicamp)
(Membro)

Profa. Dra. Gabriela Alves de Macedo
(DCA – FEA – Unicamp)
(Membro)

Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho
(DEA – FEA – Unicamp)
(Membro)

**Aos Bittar,
aos Taffarello,
e,
especialmente
e tanto,
e sempre
ao André,**

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Inicialmente, gostaria de agradecer a Deus por tudo o que eu consegui realizar na minha vida, especialmente, pela finalização de mais este trabalho.

Agradeço ao André. Agradeço muito por tudo, e tanto... desde o amor e a imensa paciência pela minha ausência até a ajuda inesquecível na lavagem das vidrarias... o que dizer??

Agradeço à minha grande e linda família mais do que eu poderia escrever sucintamente. Espero que vocês entendam isso ao saber que *nada* seria possível sem vocês!

À professora Gláucia pela orientação, pelo apoio permanente, pela atenção e, claro, pelo indiscutível astral, fundamental na realização do trabalho!

Às professoras Hilary e Gabriela pela gentileza e pela presteza na correção da tese.

Agradeço de coração à Flaviana, Janaína e Clarissa, minhas grandes amigas, pelo incentivo e apoio certos, além do carinho inesquecível!

Não posso deixar de agradecer, com especial carinho, à toda atenção, disposição à ajudar e carinho dispensados pela Luciana Ferracini, Márcia, Fábio (Sorriso), Julian (Rolha), Gisele, Fernanda, Beatriz e Guilherme. Muito do meu trabalho só foi possível com ajuda de vocês! Não tenho como agradecer, mas de qualquer modo, muito obrigada!

Agradeço a todo pessoal do laboratório de Bioquímica (certamente o mais divertido e “gostoso” da FEA!), a Eliane, Haroldo, Alice, Luciana Fleuri, Cláudio e

Júlio por terem transformado meus anos de mestranda em uma delícia!!!
(literalmente!)

Aos funcionários do laboratório de Bioquímica, da secretaria do Departamento de Ciência de Alimentos e da Secretaria de Pós-Graduação da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Unicamp pela presteza, atenção e disposição para atender as inúmeras necessidades... muito obrigada!

Agradeço à Karla, do Laboratório de Química de Alimentos, pela ajuda na análise das amostras no HPLC.

Agradeço ao CNPq pelo financiamento do projeto de pesquisa.

ÍNDICE

RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
3.1. Alfa-amilase.....	5
3.1.1. Nomenclatura, classificação e obtenção.....	6
3.1.2. Caracterização físico-química da alfa-amilase.....	13
3.1.3. Estrutura da alfa-amilase	16
3.1.4. Microrganismos produtores de alfa-amilase.....	21
3.2. Hidrólise enzimática do amido.....	22
3.2.1. Substrato: o amido.....	22
3.2.2. Processo de gelatinização e hidrólise do amido.....	32
3.2.3. Processo de sacarificação do amido.....	37
3.3. Produtos da hidrólise do amido.....	38
3.3.1. Maltodextrinas.....	40
3.3.2. Xaropes de açúcares.....	41
3.3.3. Bebidas fermentadas e panificação.....	64
4. MATERIAL E EQUIPAMENTOS.....	67
4.1. Materiais.....	67
4.2. Equipamentos.....	68
5. METODOLOGIA.....	69
5.1. Isolamento e seleção de microrganismos produtores de enzimas amilolíticas.....	69
5.1.1. Coleta de amostras.....	69
5.1.2. Isolamento de microrganismos.....	69
5.1.3. Seleção preliminar de microrganismos produtores de alfa-amilases.....	70
5.1.4. Produção inicial de alfa-amilase.....	71

5.1.5.	Determinação da atividade da alfa-amilase.....	71
5.2.	Identificação e conservação da linhagem melhor produtora da enzima....	75
5.3.	Produção da alfa-amilase pelo microrganismo selecionado.....	75
5.3.1.	Padronização do pré-inóculo.....	75
5.3.2.	Estudo do meio de fermentação.....	76
5.3.3.	Otimização dos parâmetros de fermentação.....	76
5.3.4.	Produção de alfa-amilase.....	77
5.3.5.	Cinética de crescimento bacteriano no meio de produção de alfa-amilase.....	77
5.4.	Fracionamento da alfa-amilase.....	78
5.5.	Purificação de alfa-amilase	78
5.5.1.	FPLC – cromatografia de troca iônica.....	79
5.5.2.	FPLC – cromatografia líquida com fase apolar ligada.....	79
5.5.3.	Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	80
5.6.	Caracterização bioquímica da alfa-amilase	82
5.6.1.	Determinação do teor de proteínas	83
5.6.2.	Efeito da temperatura e do ph sobre a atividade enzimática.....	83
5.6.3.	Efeito da presença de íons Ca^{2+} sobre a atividade enzimática.....	84
5.6.4.	Determinação da termoestabilidade da enzima.....	84
5.6.5.	Estimativa do peso molecular da enzima purificada.....	85
5.7.	Produtos da ação hidrolítica da alfa-amilase sobre o amido.....	85
5.7.1.	Liquefação da solução amilolítica em presença da alfa-amilase.....	85
5.7.2.	Metodologia analítica dos produtos de hidrólise.....	86
6.	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	89
6.1.	Isolamento e seleção de microrganismos produtores de alfa-amilase termoestável	89
6.2.	Identificação e conservação da linhagem melhor produtora da enzima....	91
6.2.1.	Caracterização morfo-fisiológica.....	91
6.2.2.	Caracterização bioquímica.....	95
6.3.	Produção da alfa-amilase pela linhagem selecionada.....	98
6.3.1.	Padronização do pré-inóculo.....	98

6.3.2.	Estudo básico do meio de fermentação.....	99
6.3.3.	Otimização dos parâmetros de fermentação.....	100
6.3.4.	Produção de alfa-amilase (enzima bruta).....	115
6.4.	Purificação de alfa-amilase.....	121
6.4.1.	Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	125
6.5.	Caracterização da alfa-amilase bruta e parcialmente purificada produzida pelo <i>Bacillus subtilis</i>	130
6.5.1.	Caracterização da alfa-amilase bruta produzida pelo <i>Bacillus subtilis</i>	130
6.5.2.	Caracterização da alfa-amilase parcialmente purificada produzida pelo <i>Bacillus subtilis</i>	133
6.5.3.	Efeito da presença de íons Ca^{2+} sobre a atividade enzimática	135
6.5.4.	Determinação da termoestabilidade da enzima.....	136
6.6.	Produtos da ação hidrolítica da alfa-amilase sobre o amido.....	150
6.6.1.	Cromatografia dos produtos de hidrólise do amido pela alfa-amilase produzida pelo <i>Bacillus subtilis</i>	153
7.	CONCLUSÕES.....	173
8.	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	175
9.	BIBLIOGRAFIA.....	177

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Microrganismos produtores de alfa-amilase.....	21
Tabela 2: Características de diversas fontes de amido.....	31
Tabela 3: Características dos grânulos de amido comercialmente explorados.....	33
Tabela 4: Variação das propriedades funcionais dos xaropes em função do índice de Dextrose Equivalente.....	42
Tabela 5: Principais xaropes de maltose e suas aplicações.....	44
Tabela 6: Comparação entre o efeito edulcorante de diferentes compostos.....	46
Tabela 7: Características dos xaropes de frutose comercialmente explorados.....	46
Tabela 8: Composição dos principais xaropes de glicose usados em processos fermentativos.....	48
Tabela 9: Principais aplicações dos xaropes de glicose.....	49
Tabela 10: Acidulantes e suas aplicações.....	51
Tabela 11: Aminoácidos usados na indústria de alimentos.....	60
Tabela 12: Processo de seleção da linhagem bacteriana.....	89
Tabela 13: Utilização de carboidratos pela linhagem selecionada 45-2B.....	95
Tabela 14: Fermentação de carboidratos pela linhagem selecionada 45-2B.....	96
Tabela 15: Características bioquímicas da linhagem selecionada 45-2B.....	97
Tabela 16: Planejamento experimental composto central codificado para estudo da otimização dos parâmetros de fermentação.....	101
Tabela 17: Níveis e valores decodificados dos parâmetros de fermentação estudados no planejamento experimental.....	102
Tabela 18: Análise da variância no estudo das condições de fermentação.....	102
Tabela 19: Efeito das variáveis na produção enzimática, dada em função do número de unidades de atividade dextrinizante (UAD/ml de enzima).....	103
Tabela 20: Coeficientes de regressão, desvio padrão e limites de confiança no estudo do delineamento estatístico proposto.....	104
Tabela 21: Etapas na purificação da alfa-amilase produzida pela linhagem 45-2B.....	129

Tabela 22: Caracterização das alfa-amilases produzidas pelos microrganismos do gênero <i>Bacillus</i>	149
Tabela 23: Análise quantitativa da hidrólise do amido pela Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	155

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Árvore evolutiva da alfa-amilase.....	11
Figura 2: Modelo proposto para a estrutura química da alfa-amilase.....	19
Figura 3: Resíduos de aminoácidos envolvidos nas ligações entre os íons metálicos e a alfa-amilase.....	19
Figura 4: Microscopia eletrônica dos grânulos de amido.....	23
Figura 5: Diagrama da estrutura do grânulo do amido.....	29
Figura 6: Esquema estrutural das frações componentes do amido.....	29
Figura 7: Passos da conversão enzimática do amido.....	37
Figura 8: Obtenção de ácidos orgânicos através da via glicolítica.....	53
Figura 9: Hidrogenação de xarope de maltose para produção de xarope de maltitol.....	57
Figura 10: Via glicolítica para produção de aminoácidos.....	61
Figura 11: Placa de crescimento da linhagem 45,2B, identificada como <i>Bacillus subtilis</i>	93
Figura 12: Curva de crescimento microbiano durante fermentação do pré-inóculo.....	98
Figura 13: Valores observados experimentalmente x Valores previstos pelo modelo proposto.....	105
Figura 14: Efeito dos parâmetros volume do meio de fermentação (ml) e agitação na atividade hidrolítica da enzima produzida a 35°C.....	109
Figura 15: Efeito dos parâmetros temperatura (°C) e volume de meio de fermentação (ml) na atividade hidrolítica da enzima produzida sob agitação de 150 rpm.....	111
Figura 16: Efeito dos parâmetros temperatura (°C) e agitação (rpm) na atividade hidrolítica da enzima produzida em 50 ml de meio de fermentação.....	113
Figura 17: Cinética de crescimento e produção enzimática.....	117
Figura 18: Fluxograma de produção, purificação e aplicação da alfa-amilase produzida pela linhagem 45-2B – <i>Bacillus subtilis</i>	119

Figura 19: Cromatografia líquida de fase apolar ligada (Butil) da alfa-amilase produzida pela linhagem 45-2B.....	123
Figura 20: Gel de eletroforese.....	125
Figura 21: Efeito da temperatura e pH sobre a atividade dextrinizante da alfa-amilase bruta produzida pelo <i>Bacillus subtilis</i> – sem adição de CaCl ₂	131
Figura 22: Efeito da temperatura e pH sobre a atividade dextrinizante da alfa-amilase parcialmente purificada produzida pelo <i>Bacillus subtilis</i> – sem adição de CaCl ₂	133
Figura 23: Efeito da temperatura e pH sobre a atividade hidrolítica da alfa-amilase bruta produzida pelo <i>Bacillus subtilis</i> – com adição de CaCl ₂	137
Figura 24: Efeito da temperatura e pH sobre a atividade hidrolítica da alfa-amilase parcialmente purificada produzida pelo <i>Bacillus subtilis</i> – com adição de CaCl ₂	139
Figura 25: Comparação da atividade hidrolítica entre as alfa-amilases bruta e parcialmente purificada, em pH 6, sem adição de CaCl ₂	141
Figura 26: Comparação da atividade hidrolítica entre as alfa-amilases bruta e parcialmente purificada, em pH 6, com adição de CaCl ₂	141
Figura 27: Comparação da atividade hidrolítica entre as alfa-amilases bruta e parcialmente purificada, na temperatura de 70°C, sem adição de CaCl ₂	143
Figura 28: Comparação da atividade hidrolítica entre as alfa-amilases bruta e parcialmente purificada, na temperatura de 70°C, com adição de CaCl ₂	143
Figura 29: Efeito da presença/ausência de 20mM de CaCl ₂ na alfa-amilase bruta e parcialmente purificada produzida pelo <i>Bacillus subtilis</i> , em pH 6, em termos de atividade sacarificante.....	145
Figura 30: Efeito da temperatura sobre a atividade hidrolítica da alfa-amilase bruta produzida pelo <i>Bacillus subtilis</i> em função do tempo de incubação, sem adição de CaCl ₂	147
Figura 31: Efeito da temperatura sobre a atividade hidrolítica da alfa-amilase bruta produzida pelo <i>Bacillus subtilis</i> em função do tempo de incubação, com adição de CaCl ₂	147

Figura 32: Comparação da ação hidrolítica da alfa-amilase produzida pelo <i>Bacillus subtilis</i> nos diferentes tipos de amido, nos tempos de 4, 6, 8 e 12 horas.....	151
Figura 33: Cromatografia descendente em papel em tempo de reação de 4 horas.....	157
Figura 34: Cromatografia descendente em papel em tempo de reação de 8 horas.....	159
Figura 35: Cromatografia descendente em papel em tempo de reação de 12 horas.....	161
Figura 36: Curva padrão de glicose.....	163
Figura 37: Curva padrão de maltose.....	163
Figura 38: Cromatograma dos produtos de hidrólise do amido de batata, após 12 horas de reação enzimática.....	165
Figura 39: Cromatograma dos produtos de hidrólise do amido de mandioca, após 12 horas de reação enzimática.....	167
Figura 40: Cromatograma dos produtos de hidrólise do amido de milho, após 12 horas de reação enzimática.....	169
Figura 41: Cromatograma dos produtos de hidrólise do amido de trigo, após 12 horas de reação enzimática.....	171

RESUMO

Os produtos da hidrólise do amido são, certamente, os ingredientes mais versáteis utilizados nas indústrias de alimentos, reconhecidos tanto pelas suas características tecnológicas e nutricionais quanto pela variedade de produtos deles obtidos. Dentre estes produtos, encontram-se os xaropes de açúcares e seus derivados, empregados tanto em processos fermentativos, quanto na produção de bebidas, de produtos dietéticos e sorvetes, na produção de gomas, sendo ainda aplicados nas indústrias farmacêuticas e químicas. Tendo as mesmas origens, estes produtos são diferenciados em função do processamento aplicado durante a liquefação do amido, sendo sua qualidade dependente da fonte de amido, das condições de processamento e das enzimas aplicadas. Entretanto, as enzimas apresentam como limitação a temperatura ótima de operação, sendo desnaturadas em altas temperaturas sem que ocorra a hidrólise do amido, o que representa um decréscimo na rentabilidade e conseqüente desperdício de material. Por esta razão, intensificaram-se as pesquisas para produção de alfa-amilase termoestável, capaz de manter sua atividade hidrolítica em processos industriais que utilizem altas temperaturas. Diversas linhagens do gênero *Bacillus* têm sido utilizadas para a síntese de alfa-amilase com ótimas atividades a altas temperaturas, mas estas enzimas ainda requerem a presença de íons cálcio (Ca^{2+}) adicionados ao meio, o que significa mais uma etapa no processamento e um entrave na etapa subseqüente de refinação dos xaropes obtidos. O presente trabalho isolou uma linhagem identificada como *Bacillus subtilis* produtora de alfa-amilase termoestável, extracelular e com pH e temperaturas máximos de operação de 6 e 80°C. A enzima foi parcialmente purificada em coluna com resina

butil, apresentando peso molecular estimado em 21,7 KDa. Os produtos de hidrólise de quatro diferentes tipos de amido (batata, milho, mandioca e trigo) foram analisados por cromatografia líquida e em papel e revelaram tratar-se de uma enzima sacarificante por produzir, majoritariamente, glicose, maltose e maltotriose em 12 horas de processo.

Palavras- chave: alfa-amilase, termoestável, *Bacillus*, hidrólise, amido

ABSTRACT

The products of starch hydrolysis are certainly the most versatile ingredients in use in the food industry, being recognized for their technological and nutritional features and for the variety of products derived from a simple raw material such as starch. These products include the sugar syrup and their derivatives, used in fermentative processes, in the production of soft drinks, dietary products, ice cream and gums, in addition to their application in the pharmaceutical and chemistry industries. These products have the same origin, being differentiated as a function of the processing applied during the liquefaction of starch. The quality depends on the starch source, the conditions of processing and the enzyme employed. However, all enzymes usually applied are limited by the operational temperature, being denatured by high processing temperature without completely hydrolyzing the starch, which may represent a decrease in the yield and consequent loss of material. Therefore, the search for thermo-stable alpha-amylase has been intensified, in order to find an enzyme capable of maintaining its hydrolytic activity during process that use high temperature. Some bacteria of the genus *Bacillus* have been used to synthesize alpha-amylase with excellent activity at high temperatures, but these enzymes require the presence of calcium ions (Ca^{2+}), which means an additional processing step and subsequent refinement step of the final products. This research have isolated a bacteria identified as *Bacillus subtilis* that produces a thermo-stable alpha-amylase. The enzyme, showing maximum values for activity at pH and temperature of 6 and 80°C, was partially purified in a butyl-resin column and showed a molecular weight of 21,7KDa by filtration in

Sephadex G-200 gel. The hydrolysis products from four different types of starch (potato, maize, cassava and wheat) were analyzed by both liquid and paper chromatography, showing the enzyme to be a saccharifying one, producing, mainly, glucose, maltose and maltotriose after 12 hours of process.

Key-word: alpha-amylase, thermo-stable, *Bacillus*, hydrolysis, starch

1. INTRODUÇÃO

A produção mundial de amido como matéria prima atingiu, em 2000, um total de 48,5 milhões de toneladas considerando-se, principalmente, a produção de milho, trigo e batata (EU, 2002). Além do consumo regular como alimento nutricional, o amido também é utilizado para a obtenção de produtos como a glicose, maltose e maltooligossacarídeos, largamente utilizados nas indústrias de alimentos, farmacêutica e de papel. Estes produtos são oriundos do processo de hidrólise do amido, desenvolvido com grande eficiência quando utilizadas enzimas amilolíticas, especialmente a alfa-amilase, atuante na primeira etapa do processamento do amido, a liquefação.

As enzimas amilolíticas representam o grupo enzimático de grande aplicação industrial e, conseqüentemente, de alta importância econômica. Isso principalmente devido à versatilidade dos produtos obtidos da hidrólise do amido, reconhecidos tanto pelas suas características tecnológicas e nutricionais quanto pelo seu amplo espectro de aplicações.

Por essa razão, a descoberta de novas fontes de enzimas amilolíticas termoestáveis, assim como a caracterização e a viabilização de sua aplicação industrial têm sido o foco de diversas pesquisas, em todo o mundo, visando a obtenção de produtos específicos a cada necessidade (*tailor made products*) e à redução da formação de subprodutos indesejáveis – possíveis com a utilização de enzimas estáveis em ampla faixa de temperatura e pH.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivos:

- a. Isolamento, seleção e identificação de linhagem altamente produtora de alfa-amilase termoestável;
- b. Estudo das características bioquímicas da enzima bruta e parcialmente purificada;
- c. Estudo da aplicação da enzima bruta na hidrólise de amidos de batata, milho, mandioca e trigo.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Alfa-amilase

Em uma análise básica, as enzimas são proteínas com estrutura química e finalidades biológicas específicas, podendo ser encontradas tanto em procariotos quanto em eucariotos. Para qualquer um dos reinos, são as unidades funcionais do metabolismo, sendo sintetizadas e utilizadas com a intenção da manutenção da vida do organismo produtor, favorecendo tanto a obtenção de elementos essenciais quanto a utilização de compostos externos como fonte de carbono e de energia (Bobbio *et al*, 1992; Lehninger, 1976; Dixon *et al*, 1979).

A aplicação de enzimas em processos industriais é uma importante ramificação da biotecnologia, permitindo um controle fino em processos de transformação de compostos naturais, em substituição a processos químicos convencionais, geralmente requerentes de condições tecnológicas (equipamentos, reagentes químicos etc.) mais sofisticados.

A alfa-amilase é uma enzima produzida por diversos organismos, desde plantas, microrganismos, até animais superiores como o homem (Kruger *et al*, 1987; Lehninger, 1976; Dixon *et al*, 1979). Entre os microrganismos, encontram-se diferenças na produção enzimática e as enzimas obtidas diferem também entre si, em função de suas características físico-químicas e modos de atuação sobre diferentes substratos (Kruger *et al.*, 1987).

Segundo Beynum *et al.* (1985) e Kearsley *et al.* (1995), durante décadas, a alfa-amilase teve aplicação restrita a processos de panificação, sempre utilizada na forma não purificada. Nos últimos 20 anos, essa enzima foi extensivamente

estudada e, em consequência disto, encontram-se hoje, no mercado, formas diversas de alfa-amilases, com diferentes características e aplicações.

Apesar de ser encontrada em muitos organismos, apenas as alfa-amilases produzidas por algumas linhagens de bactérias, fungos e leveduras são comercializadas. Em geral, são diferenciadas em função da sua atividade, termoestabilidade e faixas ótimas de pH de atuação, fatores que determinam sua adequação aos processos industriais.

3.1.1. Nomenclatura, classificação e obtenção

3.1.1.1. Nomenclatura

Alfa-amilase, 1,4-alfa-D-glucan-glucanohidrolase, EC 3.2.1.1, de acordo com a classificação mencionada por Salzman (1991), é uma endoenzima carboidrase com atividade hidrolítica das ligações glicosídicas α -1,4 em polissacarídeos dispersos em meio aquoso, contendo, pelo menos, três resíduos de glicose na cadeia. Algumas alfa-amilases apresentaram atividade de hidrólise das ligações glicosídicas α -1,6, mas com eficiência de reação reduzida (Christophersen *et al.*, 1998; Fitter *et al.*, 2001; Pandey *et al.*, 2000; Kuriki *et al.*, 1993; Salzman, 1991; Lévêque *et al.*, 2000; Salva, 1990; Kwak *et al.*, 1998; Lehninger, 1976; Suvd *et al.*, 2001; Dixon *et al.*, 1979).

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

3.1.1.2. Classificação

Segundo Salva (1990), Lévêque *et al.* (2000) e Cho *et al.* (2000), as alfa-amilases podem ser classificadas de acordo com a origem de extração ou fonte de obtenção:

- microbiana: produzida por bactérias, fungos e leveduras, de forma intra ou extracelular, em condições diversas de aeração, temperaturas, meios de cultivos, pH, concentração de íons, etc.;
- animal: produzida por animais mamíferos e vertebrados como, por exemplo, as alfa-amilases humanas (pâncreas e saliva);
- vegetal: produzida em sementes, raízes, tubérculos e cereais;

Segundo Lévêque (2000), Pandey *et al.* (2000), Kim *et al.* (1994), Nebesny *et al.* (1993), Odibo *et al.* (2001), Kichakova *et al.* (1998), Dobрева *et al.* (1994), Christophersen *et al.* (1998), Lee *et al.* (1996), Uguru *et al.* (1997), Mamo *et al.* (1999), Hamilton *et al.* (1999), Kwak *et al.* (1998), Fogarty *et al.* (1993), Doyle *et al.* (1999) e Nishimura *et al.* (1994) podem ainda ser classificadas, de acordo com a forma de ação, em:

- Sacarificante: enzima que hidrolisa o amido produzindo, majoritariamente, sacarídeos de baixo peso molecular, como glicose, maltose e maltotriose.
- Liquidificante: enzima que hidrolisa o amido produzindo, majoritariamente, maltodextrinas de variados pesos moleculares, com grau de polimerização acima de 4, ou seja, sem grande produção de monômeros ou dímeros.

Urge ressaltar, entretanto, que essas enzimas encontram-se no mercado diferenciadas prioritariamente em função das condições ótimas de atuação, em geral temperatura e pH, e em termos do binômio concentração/produto final, sempre visando à obtenção de polissacarídeos de composição específica (tailor-made products) (Beynum et al., 1985; Kearsley et al, 1995).

3.1.1.3. Produção de alfa-amilase por microrganismo

Comercialmente são encontradas alfa-amilases produzidas por diversos gêneros de microrganismos. A produção de alfa-amilase indica a necessidade de adaptação e sobrevivência desses microrganismos em ambientes ricos em polissacarídeos disponíveis para utilização como fonte de carbono e energia (Cho *et al*, 2000; Salva, 1990; Lehninger, 1976; Dixon *et al*, 1979).

Segundo Salva (1990), quando um microrganismo sintetiza alfa-amilase em meio de cultura composto por glicose como única fonte de carbono, essa enzima é considerada constitutiva para a linhagem, diferenciada das enzimas indutivas, obtidas quando há o crescimento do microrganismo em meio de cultura composto por carboidratos com ligações glicosídicas α -1,4. No caso das linhagens produtoras de alfa-amilase a presença destes compostos não induzem um crescimento padronizado das linhagens, nem à certeza da produção da enzima. Essas indefinições decorrem basicamente da quantidade de microrganismos diferentes produtores da alfa-amilase e pelas diferentes respostas obtidas por organismos pertencentes à mesma espécie.

Quanto aos mecanismos de controle da síntese e da secreção da enzima, segundo Salva (1990), há evidências de que sua síntese seja regulada por um processo de repressão catabólica, o que explicaria o fato de a síntese e de a secreção ocorrerem após o final da fase de crescimento exponencial, já na fase de diminuição do crescimento/início da fase estacionária. Existem outras teorias a respeito dos mecanismos de síntese enzimática e sua correlação com o crescimento microbiano, mas essas não serão abordadas neste trabalho. Entretanto, mesmo sem completo esclarecimento do mecanismo de produção da alfa-amilase, é consenso, segundo Salva (1990) e Mamo *et al.* (1999), ser síntese *de novo* visando à adaptação ao meio.

Os fatores extrínsecos e intrínsecos pertinentes ao crescimento microbiano e à produção de alfa-amilase são tão variáveis quanto aos microrganismos produtores de tal enzima. Assim, não se pode generalizar a determinação de condições ideais de temperatura, umidade relativa, composição gasosa do meio ambiente, pH, atividade de água e disponibilidade de nutrientes, visto que estes microrganismos podem ser encontrados desde ambientes acessíveis como em raspas de cascas de tubérculos até em solos submarinos e vulcânicos. A alfa-amilase é encontrada em diversas espécies, desde archaeobactérias como *Thermococcale sp.*, *Sulfolobus sp.* e *Pyrococcus sp.* até espécies largamente estudadas como *Bacillus sp.*, *Aspergillus sp.*, *Candida sp.*, *Clostridium sp.*, *Lactobacillus sp.*, entre outros (Kearsley *et al.*, 1995; Deweer, 1997; Salzmann, 1991; Lévêque *et al.*, 2000; Salva, 1990; Cho *et al.*, 2000; Kato, 1999; Kwak *et al.*, 1998; Kindle *et al.*, 1984; Nagodawithana *et al.*, 1993).

Apesar de microrganismos bastante diferentes produzirem a mesma enzima, estudos realizados por Lévêque *et al.* (2000) de seqüenciamento dos aminoácidos e caracterização molecular das alfa-amilases obtidas em diferentes organismos revelaram a proximidade/distanciamento entre esses metabólitos. Esses trabalhos mostraram similaridades entre as estruturas primárias, com algumas seqüências altamente conservadas, revelando proximidade evolutiva entre as alfa-amilases obtidas de diversas fontes, como animal, vegetal e microbiológica. A figura 1 esquematiza a árvore evolutiva da enzima. O distanciamento entre as ramificações é proporcional à divergência evolutiva entre as enzimas.

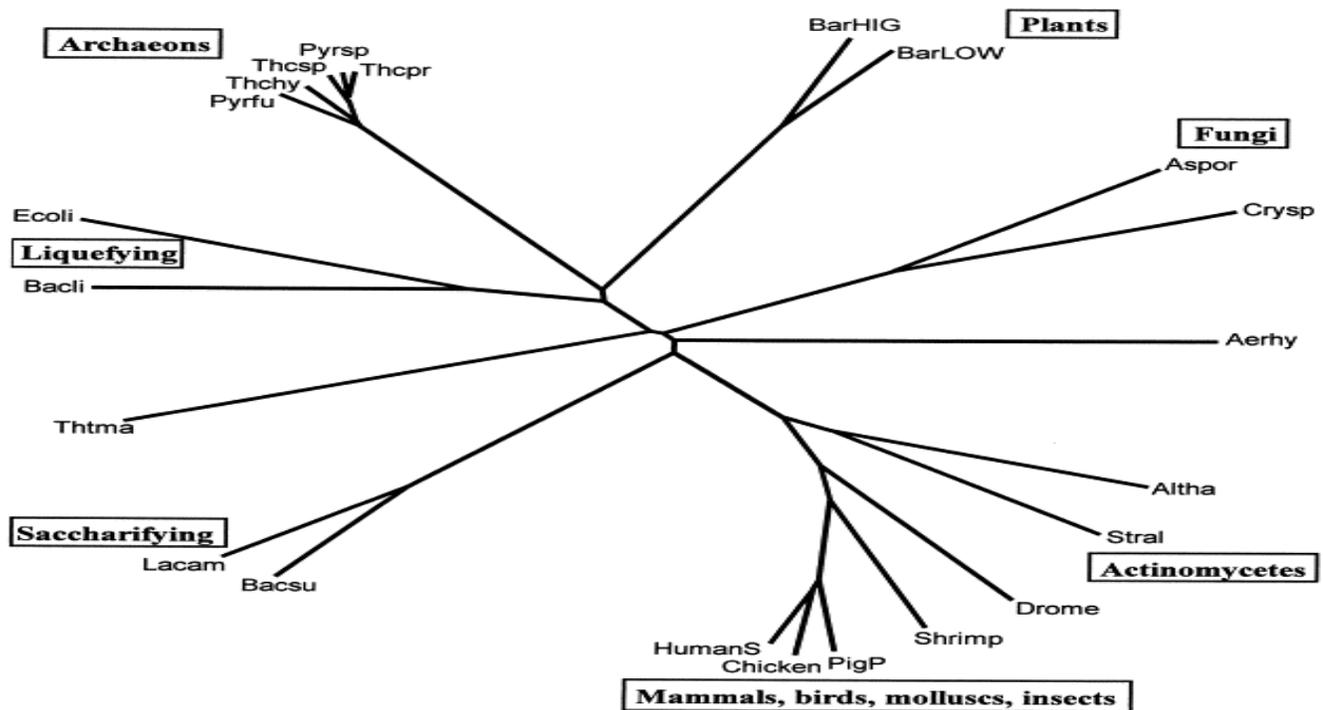


Figura 1: Árvore evolutiva da alfa-amilase

Representada para enzimas produzidas por eucariotos, eubactérias e archaeobactérias.

Notação utilizada: BarHIG e BarLOW, cevada; Aspor, *Aspergillus oryzae*;

Stral, *Streptomyces albidoflavus*; HumanS, humana (saliva) e PigP, pâncreas;

Bacsu, *Bacillus subtilis*; Bacli, *Bacillus licheniformis*

(Lévêque *et al.*, 2000)

3.1.2. Caracterização físico-química da alfa-amilase

A maioria das alfa-amilases pesquisadas e disponíveis no mercado podem ser agrupadas sob o mesmo modelo estrutural, apesar de apresentarem as características bioquímicas variantes analisadas a seguir.

3.1.2.1. Peso molecular

As alfa-amilases produzidas por microrganismos apresentam pesos moleculares variando de 22.500 a 140.000 Da, dependendo da linhagem produtora. As linhagens microbianas podem produzir diferentes alfa-amilases, com pesos moleculares diferentes, apresentando a mesma atividade hidrolítica (Salva, 1990; Lévêque *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 1994; Uguru *et al.*, 1997; Kichakova *et al.*, 1998; Ikawa *et al.* 1998; Nishimura *et al.*, 1994; Hayashida *et al.*, 1988, Hamilton *et al.*, 1998).

3.1.2.2. Efeitos da temperatura sobre a atividade hidrolítica

Os efeitos da temperatura sobre a atividade hidrolítica da alfa-amilase variam em função da fonte de obtenção (Kearsley *et al.*, 1995; Kruger *et al.*, 1987; Bobbio *et al.* 1992; Salzmann, 1991; Salva, 1990; Lehninger, 1976; Dixon *et al.*, 1979). A origem da enzima está diretamente relacionada com a configuração da estrutura primária da molécula, influenciando a configuração quaternária e, como consequência, a atividade enzimática.

Os efeitos da temperatura sobre a alfa-amilase não diferem daqueles em outras enzimas. Segundo Bobbio *et al.* (1992), em toda reação bioquímica, o aumento inicial da temperatura implica o aumento da atividade molecular,

umentando a velocidade da reação. No entanto, o contínuo aumento da temperatura leva ao rompimento de ligações químicas constituintes e estabilizadoras da estrutura, ocasionando a desnaturação e conseqüente perda da atividade. Para enzimas em geral, a inativação pelo calor é iniciada aos 45°C, mas esse valor é intrinsecamente relacionado com o pH, atividade de água e presença/ausência de ativadores/inibidores enzimáticos.

Kruger *et al.* (1987) afirma que, genericamente, as alfa-amilases produzidas por cereais apresentam maior termoestabilidade do que as fúngicas, e menores do que as bacterianas. Entretanto, esta termoestabilidade é variável entre variedades produtoras dentro de uma mesma espécie, permitindo atividade em temperaturas na ampla faixa de 36 a 110°C.

Da mesma forma que as características bioquímicas das alfa-amilases variam enormemente, os processos que envolvem sua aplicação também variam. Alguns processos exigem a presença de enzimas com temperaturas de inativação na faixa de 30 a 45°C, com é o caso da panificação, on'de a desnaturação da alfa-amilase durante cozimento de pães garante a qualidade do produto final (Beynum *et al.*, 1985; Kruger *et al.*, 1987; Salva, 1990; Nagodawithana *et al.*, 1993). Ao contrário, a enzima seria resistente ao aquecimento, mantendo a hidrólise do amido com o produto pronto, causando problemas organolépticos que serão analisados posteriormente. Já na produção de xaropes de açúcares, por exemplo, a aplicação de enzimas com termoestabilidade na faixa dos 90°C é indicada por propiciar a manutenção da atividade hidrolítica nestas condições de temperatura, permitindo maior hidrólise do amido, o que representa melhoria na qualidade final do produto e na rentabilidade da processo (Beynum *et al.*, 1985; Kearsley *et al.*,

1995; Salva, 1990; Deweer, 1997; Salzmann, 1991; Lévêque *et al.*, 2000; Malhotra *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 1989; Kindle *et al.*, 1984; Nagodawithana *et al.*, 1993; Kanno, 1986).

A termoestabilidade da alfa-amilase está provavelmente relacionada com a presença de íons metálicos, como ativadores enzimáticos, e com a configuração da estrutura química da enzima, tema abordado posteriormente.

3.1.2.3. Ativadores e inibidores

Até poucos anos, era acreditado que todas as alfa-amilases possuíam íons cálcio ligados à molécula, mas a presença de tais elementos não era relacionada com a variação da atividade da enzima ou da resistência desta à altas temperaturas. A partir de estudos realizados, citados por Kearsley *et al.* (1995) e Salzmann (1991), pode-se comprovar tal relação e verificar que íons metálicos agiam ou como estabilizadores protéicos ou como agentes desnaturantes.

A maioria das alfa-amilase responde da mesma forma à presença de íons, ora ativando ou inibindo a sua atividade. Em geral, são atribuídas funções de ativadores para os seguintes íons: cálcio (Ca^{2+}), bário (Ba^{2+}), manganês (Mn^{2+}), prata (Ag^+), ferro (Fe^{2+}), cobalto (Co^{2+}) e zinco (Zn^{2+}). De forma inversa, são atribuídas funções de inibidores para os seguintes íons: mercúrio (Hg^{2+}), prata (Ag^+), cobre (Cu^{2+}), chumbo (Pb^{2+}), magnésio (Mg^{2+}), cobalto (Co^{2+}), rubídio (Rb^{2+}), ferro (Fe^{3+} e Fe^{2+}) e bário (Ba^{2+}). Pode-se notar a repetição de certos íons citados como ativadores e inibidores e isso acontece em função da variedade de enzimas alfa-amilase disponíveis (Kearsley *et al.*, 1995; Salzmann, 1991; Salva,

1990). É conhecido ainda o efeito de grupos prostéticos (histidina, diotiotreitol e mercaptoetanol) como ativadores da atividade hidrolítica (Salzmann, 1991).

3.1.3. Estrutura da alfa-amilase

Embora as diferentes origens de obtenção da alfa-amilase indiquem particularidades em suas características bioquímicas, todas essas enzimas apresentam uma estrutura química conservada sob condições normais, isto é, quando se encontram em seus pontos normais de temperatura e pH (Beynum *et al.*, 1985; Shetty *et al.*, 1988; Salzmann, 1991; Lévêque *et al.*, 2000; Malhotra *et al.*, 2000; Suvd *et al.*, 2001; Fitter *et al.*, 2001; Dixon *et al.*, 1979).

A alfa-amilase é formada por uma cadeia polipeptídica simples, distribuída em três domínios diferentes, A, B e C. O domínio A representa um cerne compacto formado por barras (α/β)₈, tratando-se de uma estrutura de uma barra com oito cadeias β , paralelas, rodeadas por 8 cadeias em α -hélice. O domínio B representa a parte variável da molécula, sendo composto, em geral, por uma camada (placa) de quatro cadeias β , em sentido antiparalelo, com um par de cadeias β antiparalelas formando longos laços sobre esta camada. Neste domínio, encontram-se os íons Ca^{2+} , Na^+ e Ca^{2+} , dispostos em trinca linear, formando uma interface com o domínio A. O domínio C forma uma unidade globular formada por 8 cadeias β dobradas, retendo um terceiro íon Ca^{2+} no local de ligação com o domínio A (Lévêque *et al.*, 2000; Mac Gregor, 1993; Suvd *et al.*, 2001; Fitter *et al.*, 2001). A estrutura encontra-se reproduzida na figura 2.

O sítio ativo da enzima encontra-se no terminal carboxílico da cadeia β pertencente a estrutura de barra do domínio A. Os resíduos de três aminoácidos

formadores do sítio ativo da alfa-amilase são estritamente conservados, quando comparadas diferentes alfa-amilases (Suvd *et al.*, 2001).

A trinca de íons metálicos e o íon Ca^{2+} na interface entre os domínios A e C podem ser detectados durante as etapas de purificação da enzima, mostrando picos de alto nível de densidade eletrônica característicos da alfa-amilase (Lévêque *et al.*, 2000; Fitter *et al.* 2001). Os quatro íons são mostrados esquematicamente nas figuras 2 e 3. Destes, o nomeado, na figura 2, de Ca I é estritamente conservado em todas as alfa-amilases analisadas (Lévêque *et al.*, 2000).

A natureza da termoestabilidade, em função da estrutura química, tem sido largamente pesquisada, entretanto, como somente a estrutura da alfa-amilase produzida pelo *Bacillus stearothermophilus* foi completamente desvendada, todos os modelos propostos para prever a estabilidade térmica entre duas diferentes enzimas ainda necessitam de dados mais expressivos (Fitter *et al.*, 2001).

Algumas teorias foram propostas com essa finalidade, relacionando algumas possibilidades como, por exemplo:

- O efeito das ligações da alfa-amilase com os íons Na^+ e Ca^{2+} , atuantes como estabilizadores da estrutura (figura 3), enquanto algumas enzimas menos estáveis apresentam ligações com moléculas de água (Fitter *et al.*, 2001; Lévêque *et al.*, 2000; Mac Gregor, 1993; Suvd *et al.*, 2001; Saborny *et al.*, 2000). Na mesma linha, a diferente localização de três aminoácidos na cadeia polipeptídica também é considerada como possível fator, pelo fato de um destes aminoácidos ligarem-se ao íon Ca^{2+} ;

- Presença de maior número de ligações do tipo pontes de hidrogênio em enzimas mais estáveis, mostrando a tendência a maior compactação da estrutura (Suvd *et al.*, 2001; Fitter *et al.*, 2001), gerando uma menor superfície de contato do cerne da estrutura com o meio.

Em geral, atribui-se a presença de íons Ca^{2+} na solução enzimática à estabilidade a altas temperaturas, fato comprovado por testes termodinâmicos (Beynum *et al.*, 1985; Kearsley *et al.*, 1995; Shetty *et al.*, 1988; Salva, 1990; Deweer, 1997; Salzmann, 1991; Lévêque *et al.*, 2000; Malhotra *et al.*, 2000; Kindle *et al.*, 1984; Suvd *et al.*, 2001; Mac Gregor, 1993; Fitter *et al.*, 2001; Dixon *et al.*, 1979; Saborny *et al.*, 2000; Kanno, 1986).

Entretanto, como já mencionado, ainda não foi estabelecido um modelo definitivo correlacionando a termoestabilidade e a estrutura química dessa enzima.

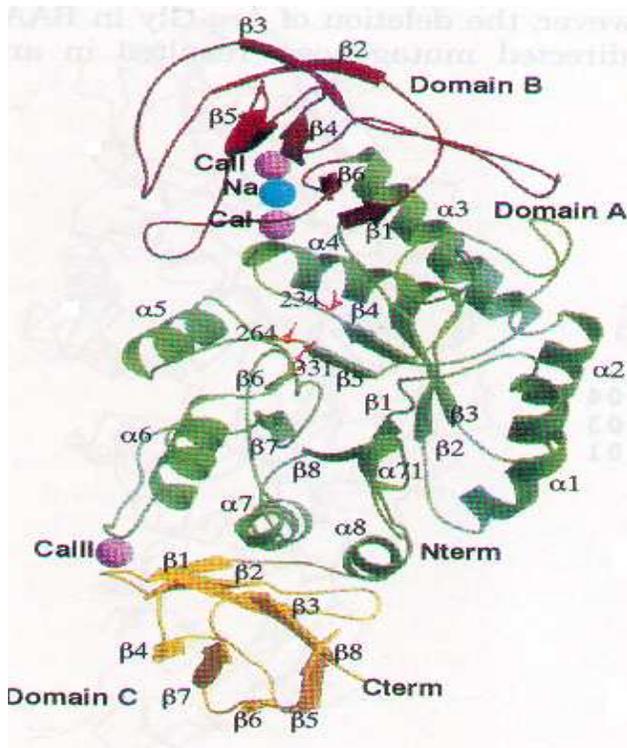


Figura 2: Modelo proposto para a estrutura química da alfa-amilase. Os três domínios formadores em diferentes cores, os íons metálicos representados por esferas e o sítio ativo no terminal carboxílico (Suvd *et al.*, 2001)

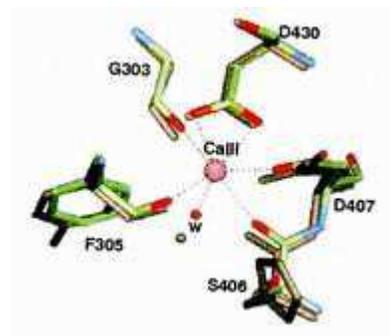
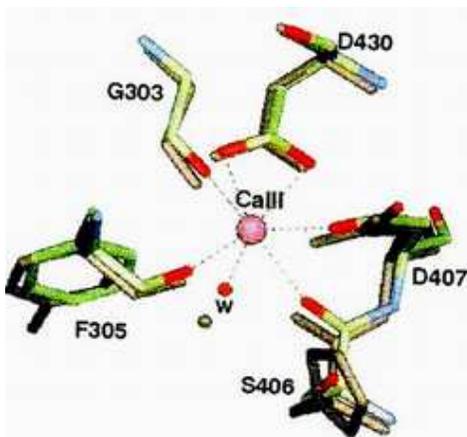


Figura 3: Resíduos de aminoácidos envolvidos nas ligações entre os íons metálicos e a alfa-amilase.

Os átomos são coloridos: carbono (verde), nitrogênio (azul) e oxigênio (vermelho). As moléculas de água são representadas por pequenas esferas. A figura (a) mostra a interface entre os domínios B e A com a trinca de íons e (b) mostra a interface entre A e C (Suvd *et al.*, 2001).

3.1.4. Microrganismos produtores de alfa-amilase

Gênero e espécie		Habitat do microrganismo	Temperatura de atividade (°C)	pH ótimo de atividade	Localização da enzima	Referência
<i>Aspergillus sp.</i>	<i>A. oryzae</i> <i>A. niger</i>	Solo	30 – 60	5,0 – 5,5	Extracelular	Sarikaya, 2000 Shetty, 1988
<i>Bacillus sp.</i>	<i>B. acidocaldarius</i> <i>B. licheniformis</i> <i>B. stearothermophilus</i> <i>B. amyloliquefaciens</i> <i>B. subtilis</i> <i>B. thermooleovorans</i>	Solo	60 – até 110 ^{*2}	5,5 – 8,0	Extracelular	Darias, 2002 Sarikaya, 2000 Marchal, 1999 Ali, 1999 Hamilton, 1999 Lévêque, 2000 Suvd, 2001 Fitter, 2001 Malhotra, 2000
<i>Pyrococcus sp</i>	<i>P. furiosus</i> <i>P. woesei</i>	Marinho e solos sulfurosos	100	5,0 – 7,5	Intra e extracelular	Kwak, 1998 Lévêque, 2000
<i>Staphylococcus marinus</i>		Solos marinhos	100	5,0	nd ^{*1}	Lévêque, 2000
<i>Clostridium sp</i>	<i>C. butyricum T-7</i>	nd ^{*1}	37	5,0	Extracelular	Tanaka, 1987 Pandey, 2000
<i>Sulfolobus sp</i>	<i>S. solfataricus</i> <i>S. acidocaldairus</i>	solos vulcânicos	70 – 80	5,0 – 6,0	Extracelular	Lévêque, 2000 Kato, 1999
<i>Thermococcus sp</i>	<i>T. celer</i> <i>T. profundus</i>	Solos marinhos (deep sea)	75 – 100	5,0 – 6,0	Extracelular	Lévêque, 2000 Kawk, 1998

Tabela 1: Microrganismos produtores de alfa-amilase

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

3.2. Hidrólise enzimática do amido

3.2.1. Substrato: o amido

O amido é produzido em plantas como reserva energética, permitindo a sobrevivência em períodos críticos como, por exemplo, a germinação, o crescimento e a propagação (Beynum *et al.*, 1985, Kearsley *et al.*, 1995). Análogo ao glicogênio reservado em animais, o amido exerce a função energética em vegetais. Composto basicamente por moléculas de glicose sintetizadas nos cloroplastos durante a fotossíntese, a polimerização das moléculas de amido realiza-se em organelas especializadas em reserva, sob condições de temperatura, pressão osmótica, disponibilidade de nutrientes, entre outras, peculiares a cada espécie produtora. Por essa razão, diferenças estruturais são encontradas entre variadas espécies vegetais (Sarikaya *et al.*, 2000; Kearsley *et al.*, 1995; Oates, 1997; Bobbio *et al.*, 1992; Beynum *et al.*, 1985; Lehninger, 1976).

Amido está presente em diversos tecidos vegetais, sendo depositado tanto na forma amorfa quanto na granular. Comercialmente, é extraído na forma granular e as características de tamanho e formato do grânulo são específicos para cada espécie utilizada (figura 4). Pode ser encontrado em sementes (milho, trigo, sorgo e arroz), tubérculos e raízes (batata, mandioca e batata doce) e frutas (banana), apresentando basicamente a mesma composição (Sarikaya *et al.*, 2000, Kearsley *et al.*, 1995). Teoricamente seria possível obter-se industrialmente o amido a partir de qualquer vegetal, entretanto apenas o milho, trigo, batata e mandioca são comercialmente explorados (Sarikaya *et al.*, 2000; Kearsley *et al.*, 1995). Isso é devido tanto a fatores econômicos de disponibilidade de produção quanto à viabilidade das técnicas industriais de extração (Kearsley *et al.*, 1995).

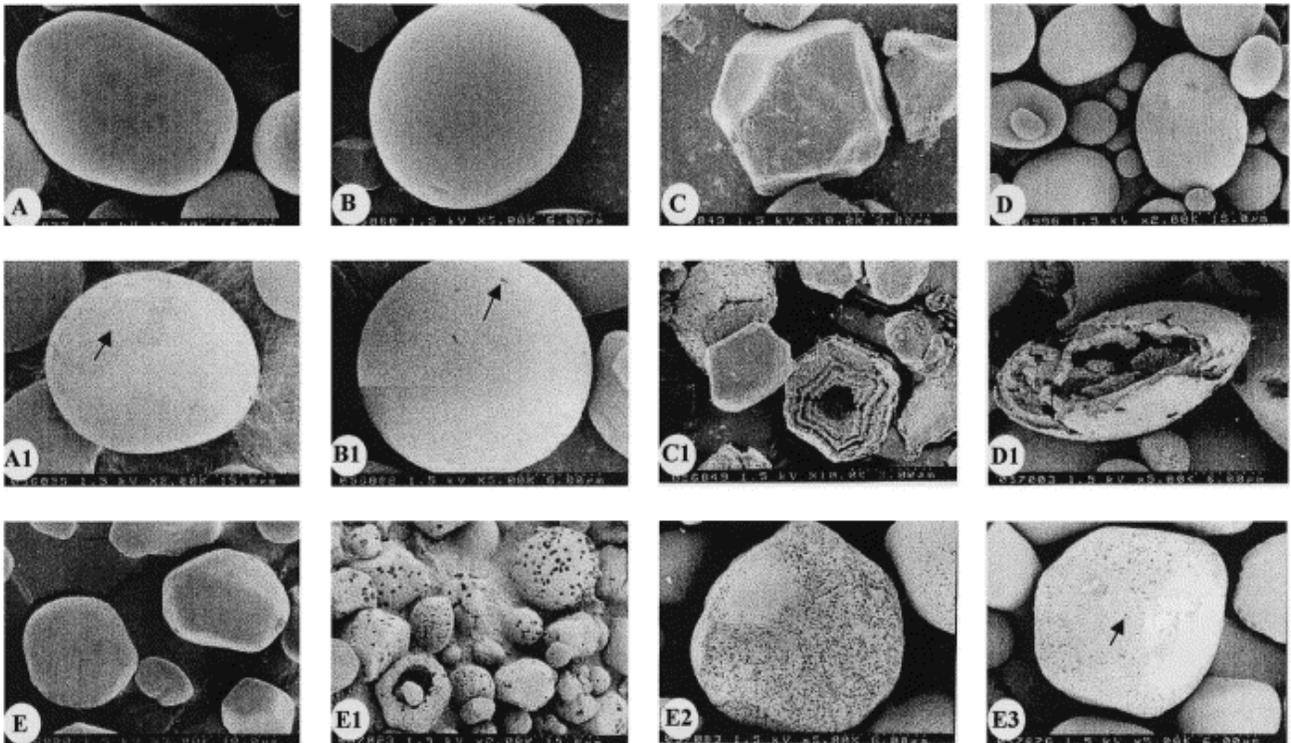


Figura 4:Microscopia eletrônica dos grânulos de amido

As figuras são referentes a: (A) batata; (B) batata doce; (C) arroz; (D) trigo; (E) milho. As figuras (A1), (B1), (C1), (D1) e (E1) são referentes a estes grânulos de amido tratados com alfa-amilase obtida de linhagem de *Bacillus amiloliquefaciens*. As figuras (E2) e (E3) mostram estes grânulos após tratamento com duas enzimas beta-amilase obtidas de linhagem de *Bacillus cereus* e de sementes de soja (enzima de cereal), respectivamente (Sarıkaya *et al.*, 2000)

3.2.1.1. História do uso do amido

As origens do uso industrial do amido remontam ao Egito antigo, quando era utilizado na manufatura de papiros e pergaminhos, sendo ainda usado na confecção de roupas durante o império romano (Kearsley *et al.*, 1995). Na Europa dos séculos seguintes, a extração de amido era feita a partir de batatas e visava basicamente atender a indústria têxtil. A “descoberta” da aplicação do amido para fins alimentícios como matéria prima na produção de “xaropes de glicose” foi feita durante as guerras napoleônicas, quando a Europa encontrava-se sob o bloqueio continental imposto pela Inglaterra. A falta do açúcar importado da Índia levou à pesquisa de fontes alternativas de síntese e obtenção de açúcar. Nesse contexto, o cientista alemão G. Kirchoff demonstrou, em 1811, a obtenção de um xarope doce a partir do aquecimento de soluções de amido de trigo com ácido sulfúrico diluído. Em poucos anos, o processo estava esclarecido e era praticado em larga escala, utilizando, para tanto, o amido extraído de batatas, o ácido clorídrico e o aquecimento indireto em trocadores de calor. Esse processo de hidrólise do amido, conhecido como hidrólise ácida, permaneceu ativo por muitos anos, sendo caracterizado pela necessidade de altas temperaturas no tratamento térmico e emprego de ácidos fortes (Kearsley *et al.*, 1995; Saha *et al.*, 1987; Shetty *et al.*, 1988).

Para atender à demanda, a produção de batatas cresceu vertiginosamente nas porções central e oeste da Europa, entretanto, ao ser transferida a tecnologia para os EUA, houve a adaptação e o rápido aperfeiçoamento do processo de hidrólise do amido do milho. Após a Segunda Guerra Mundial, os países da Europa foram obrigados a comprar, dos EUA, a tecnologia para a produção

economicamente competitiva de xarope de glicose a partir do amido (Kearsley *et al.*, 1995).

3.2.1.2. Composição do amido

O grânulo de amido é inerte, estruturalmente estável, densamente condensado e insolúvel em água, sendo rompido na presença de enzimas de origem vegetal e microbiana (Kearsley *et al.*, 1995; Beynum *et al.*, 1985; Oates, 1997; Bobbio *et al.*, 1992). Por essa razão, a análise do processo de sua quebra visando à hidrólise das suas ligações químicas requer um prévio estudo sobre sua estrutura, assim como da ação da temperatura e das enzimas adotadas no processo.

Como mencionado anteriormente, o amido apresenta basicamente a mesma composição entre as diferentes origens. Genericamente, trata-se de um carboidrato formado de moléculas de carbono, hidrogênio, oxigênio, nas proporções de $(C_6H_{10}O_5)_n$, considerado um polímero de condensação de moléculas de glicose. O amido, na verdade, é formado pela combinação de dois polissacarídeos, amilose e amilopectina, em quantidades médias de 15-30% e 70-85%, respectivamente (Kearsley *et al.*, 1995; Beynum *et al.*, 1985; Oates, 1997; Bobbio *et al.*, 1992; Lehninger, 1976; Luallen, 1988). Ambas cadeias são formadas exclusivamente por moléculas de glicose, entretanto diferem em relação ao tamanho de cadeia e disposição das moléculas componentes.

Em seu estado nativo, ou cru, trata-se de uma estrutura semi-cristalina. O material interno do grânulo está disposto na forma de anéis concêntricos. Essa estrutura pode ser visualizada em microscópio em todos os grânulos de amido e

sugere o processo biológico de deposição de polissacarídeo a partir de um centro (chamado “hilum”), seguindo periodicamente, camada a camada, aumentando o tamanho do grânulo (Oates, 1997). O centro do anel possui a maior parte dos grupos redutores das moléculas do amido e é usualmente menos organizado que o restante da molécula (figura 5).

O primeiro nível de arranjo estrutural do grânulo refere-se ao polissacarídeo amilopectina disposto em “cluster”, ou cachos. Esse arranjo descreve uma estrutura caracterizada por alternância entre regiões de cadeias de glicose paralelas, ordenadas e firmemente condensadas, chamada de lamela cristalina e regiões compostas pela maioria dos pontos de ramificações, de forma menos ordenada, chamada lamela amorfa (Oates, 1997). Dessa forma, a amilopectina pode ser considerada formadora destas duas regiões, a lamela amorfa e a lamela cristalina, integradas na composição e no cerne da estrutura do amido, conforme mostra a figura 6. O grânulo do amido contém de 15 a 45% de material cristalino (Oates, 1997).

3.2.1.2.1. Amilopectina

Amilopectina é um polissacarídeo ramificado formado por moléculas de glicose em cadeias curtas unidas por ligações glicosídicas α -1,4 e estas cadeias são ligadas entre si por ligações α -1,6 (figura 6). É a maior fração de polissacarídeo no amido (10^7 - 10^9 Da), sendo altamente ramificado. Os modelos aceitos para a estrutura da amilopectina sugerem a presença destas duas cadeias, chamadas de A e B; a cadeia A é linear e ligada apenas a uma cadeia

por simples ligações, enquanto a B é ramificada e conectada a duas ou mais cadeias. Essas cadeias apresentam-se fisicamente dispostas em “clusters”, ou “em cachos” (Oates, 1997; Luallen, 1988). Estruturalmente e, em alguns casos também funcionalmente, a amilopectina é a fração mais importante do grânulo, responsável pela sua rigidez.

3.2.1.2.2. Amilose

Amilose é um polissacarídeo linear de cadeia longa, formada por moléculas de glicose unidas por ligações glicosídicas na posição α -1,4 (figura 6). As ligações glicosídicas são estáveis em condições alcalinas e hidrolisáveis em ácidas. A unidade de glicose no final da cadeia apresenta um grupo aldeído e por esta razão é chamado de grupo redutor (Oates, 1997; Bobbio *et al.*, 1992).

Sendo a menor dentre as duas frações componentes do amido (10^5 - 10^6 Da), a amilose é um polissacarídeo pouco ramificado. A relação estrutural entre amilopectina e amilose ainda não está completamente esclarecida, mas é aceito que ambos polissacarídeos encontrem-se separados entre si, independentes um do outro. Vários estudos revelaram que a amilose forma uma estrutura helicoidal que pode ser encontrada entre as cadeias de amilopectina (os “clusters”), em ambas regiões amorfa e cristalina do grânulo, apesar de ser majoritariamente encontrada na região amorfa. Essa estrutura helicoidal tem a habilidade de reter moléculas de iodo, formando complexos amilose-iodo caracterizados pela coloração azul proporcional ao tamanho da cadeia de amilose (Oates, 1997).

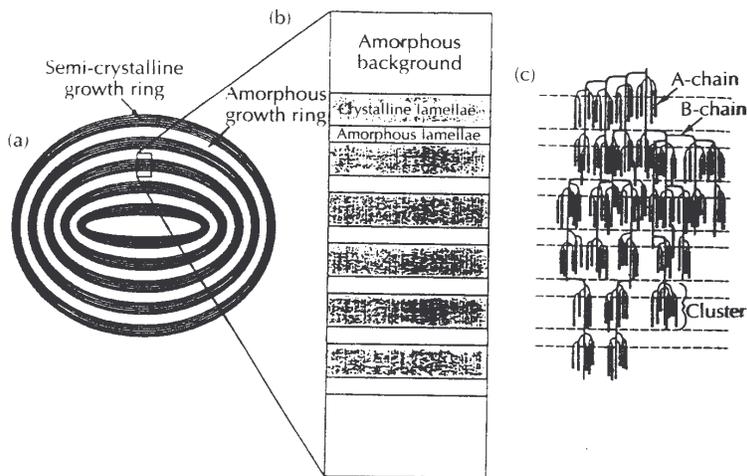
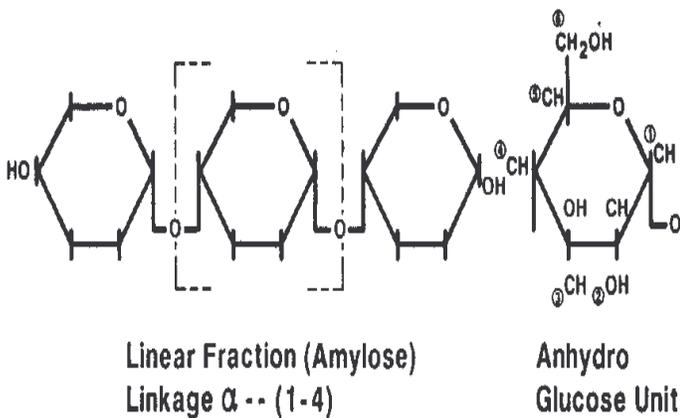
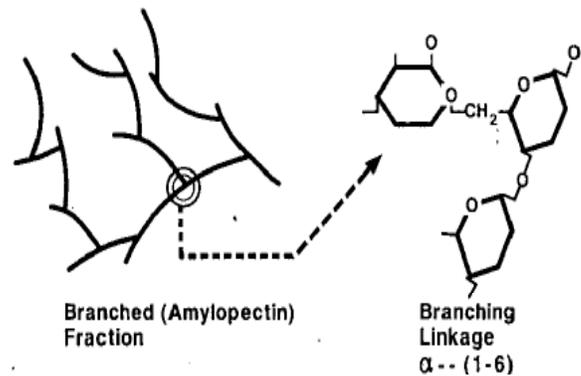


Figura 5. Diagrama da estrutura do grânulo de amido

- (a) Grânulo formado de anéis concêntricos, todos contendo as lamelas cristalina e amorfa;
- (b) Lamelas cristalina e amorfa;
- (c) Arranjo de cachos, ou "clusters" das cadeias de amilopectina (Oates, 1997).



(ã)



(b)

Figura 6. Esquema estrutural das frações componentes do amido

- (a) – Polissacarídeos Amilose
- (b) – Polissacarídeo Amilopectina (Luallen, 1988)

A localização da amilose entre as lamelas constituintes do grânulo é dependente da origem do amido, variando entre as espécies, da mesma forma que a fração destinada a cada cadeia (amilose e amilopectina), seus respectivos pesos moleculares e graus de polimerização variam entre as diversas espécies produtoras de amido, tornando-se uma característica intrínseca do produto (Beynum et al., 1985, Oates, 1997).

A tabela 2 mostra a composição das variedades comercialmente exploradas. A quantidade de amilose está relacionada com a densidade de condensação do grânulo e o grau de polimerização (DP) relacionado com a viscosidade do amido em solução, sendo alterado com o processo de liquefação, que é a quebra das ligações glicosídicas.

Amido	Amilose (%) ^{*1}	Amilopectina (%) ^{*1}	Grau de polimerização da amilose (DP) ^{*1}	Grau de polimerização da amilopectina (DP) ^{*1}	Propriedades
Milho	27-28	72	800	2.000.000	Gel firme, pasta opaca, textura de massa amanteigada ^{*2}
Batata	21	79	3000	2.000.000	-
Trigo	28	72	800	2.000.000	-
Mandioca	17	83	-	2.000.000	-

Tabela 2. Características de diversas fontes de amido

^{*1} – Beynum *et al.*, 1985.

^{*2} – Kearsley *et al.*, 1995.

3.2.2. Processo de gelatinização e hidrólise do amido

Esquemáticamente, o processo de hidrólise enzimática do amido é realizado em duas etapas: a liquefação e a sacarificação. Como o amido é uma estrutura rígida, inicia-se o processo com a gelatinização visando facilitar a ação enzimática, o que reduz o tempo de processamento e melhora a qualidade final dos produtos.

3.2.2.1. Gelatinização do amido

No processo de liquefação, os grânulos de amido são dispersos em solução aquosa, aquecidos (causando a gelatinização) e hidrolisados parcial e irreversivelmente, com auxílio de enzima alfa-amilase (Beynum *et al.*, 1985; Kearsley *et al.*, 1995; Deweer, 1997; Shetty *et al.*, 1988; Salva, 1990; Lévêque *et al.*, 2000; Kindle *et al.*, 1984; Dixon *et al.*, 1979; Kruger *et al.*, 1987; Oates, 1997; Nagodawithana *et al.*, 1993). A temperatura de gelatinização varia bastante, oscilando da faixa de 65 a 105°C (tabela 3); para a maioria dos amidos utilizados comercialmente, há a necessidade de emprego de temperaturas altas, entre 105-110°C, visando à total gelatinização (Beynum *et al.*, 1985; Kearsley *et al.*, 1995, Deweer, 1997; Kindle *et al.*, 1984).

O aquecimento de uma solução de amido em tais temperaturas resulta no inchaço da região amorfa do grânulo, causando a ruptura das ligações químicas mantenedoras da estrutura ordenada e a abertura da lamela cristalina, tornando o amido altamente hidratado e vulnerável a reações químicas, como a ação de enzimas amilolíticas (Kearsley *et al.*, 1995, Oates, 1997; Kruger *et al.*, 1987; Dixon *et al.*, 1979; Nagodawithana *et al.*, 1993). Esse primeiro passo é adotado em todos

os processos industriais de produção de derivados do amido. Mesmo sem o processo de gelatinização, é possível ocorrer a ação de enzimas amilolíticas, como ocorre naturalmente em vegetais, entretanto esse processo é menos eficiente em níveis industriais.

	Milho			Batata	Mandioca	Trigo
	Normal	Ceroso	Alto teor de amilose			
Grânulo (µm)	2-30	2-30	2-24	5-100	4-35	2-55
% Amilose	28	<2	50-85	21	17	28
T _{gelatinização} (°C)	62-80	63-72	66-170	58-65	52-65	52-85
Viscosidade	Média	Média alta	Muito baixa	Muito alta	Alta	Baixa
Claridade	Opaca	Opaca	Opaca	Translúcida	Translúcida	Opaca
Tendência a retrogradação	Alta	Muito baixa	Muito alta	Média baixa	Média	Alta

Tabela 3. Características dos grânulos de amido comercialmente explorados Beynum *et al.*, 1985.

3.2.2.2. Hidrólise do amido

Por muitos anos, a hidrólise do amido foi realizada com tratamento térmico e uso de ácidos fortes. O controle do processo e da qualidade dos produtos finais era feito principalmente em função da temperatura, da concentração dos ácidos e do tipo e quantidade de amido utilizado (Shetty *et al.*, 1988). As condições de processamento eram extremas, usando ácidos em solução de pH entre 1,5 – 2, 0 e temperaturas mantidas por 10 minutos na faixa de 140 - 150°C (Saha *et al.*, 1987; Shetty *et al.*, 1988). As desvantagens eram inúmeras, iniciando-se na

necessidade de utilização de equipamentos caros e altamente resistentes. Como resultado final, tinha-se um processo menos eficiente, menos rentável e gerador de produtos de menor qualidade, se comparado com o processo enzimático atualmente utilizado.

Devido a tais limitações, desenvolveu-se a hidrólise enzimática do amido, pesquisada desde a década de 50, tratada inicialmente como uma complementação da hidrólise ácida e, após, substituindo-a completamente (Shetty *et al.*, 1998).

Para a aplicação de enzimas amilolíticas na hidrólise do amido encontrou-se, entretanto, uma barreira tecnológica devido à incompatibilidade entre as temperaturas de gelatinização (entre 90-110°C) e a estabilidade térmica das enzimas adotadas (Shetty *et al.*, 1998). A solução inicialmente aceita foi a variação de temperaturas durante o processo: a solução de amido seria aquecida em um *jet cooker*, aumentando rapidamente a temperatura para a faixa de 90-110°C, e após alguns minutos a temperatura seria reduzida para a faixa de 85-95°C e assim mantida por pelo menos 1 hora. Ainda assim era imprescindível a presença de íons de cálcio (100 a 150 mg Ca⁺² por Kg de amido) visando aumentar a estabilidade térmica da enzima. Esse processo ocasionava perdas com retrogradação do amido e a reação ainda era muito demorada (Shetty *et al.*, 1998, Deweer, 1997).

Outro entrave para a utilização das alfa-amilases convencionais na liquefação do amido era a necessidade de ajustar o pH, visto que a solução de amido liquefeito apresenta um pH natural entre 4 - 5,5 e, nessa faixa, as enzimas

utilizadas na época apresentavam baixa atividade (pH ótimo de 5,5 – 6,5), sendo, portanto, relativamente instáveis (Shetty *et al.*, 1998; Deweer, 1997; Lévêque *et al.*, 2000; Mikami *et al.*, 1997; Kanno, 1986; Bajpai *et al.*, 1989).

Por essas razões, foram pesquisadas fontes de obtenção e caracterização de enzimas alfa-amilase termoestáveis, com boa atividade em valores de pH abaixo do seu ideal. A partir dos anos 70, começou a ser comercializada a alfa-amilase produzida pelo *Bacillus licheniformis*, estável tanto a altas temperaturas como a pH baixos e com menor dependência de íons cálcio, facilitando extremamente o processo de liquefação do amido (Deweer, 1997; Salzman, 1991; Salva, 1990; Malhotra *et al.*, 2000; Kindle *et al.*, 1984; Suvd *et al.*, 2001; Nagodawithana *et al.*, 1993; Saborny *et al.*, 2000).

A hidrólise enzimática e, em especial, a hidrólise utilizando enzimas termoestáveis, aumentou a performance do processo, aumentando seu rendimento e reduzindo a necessidade de compostos químicos, a formação de subprodutos indesejáveis e a formação de cor, além de aumentar a produção e a qualidade da glicose obtida.

A hidrólise enzimática foi uma grande contribuição ao processo industrial visto que, concomitantemente ao seu desenvolvimento, houve um grande aumento do consumo do xarope de açúcares como os de maltose, glicose e frutose (e derivados), obtidos a partir de fontes de amido como o milho. Esses processos, realizados hoje a altas temperaturas, e a utilização de enzimas termoestáveis citadas anteriormente, representaram uma melhora na qualidade final do produto e significativa diminuição do tempo de processamento (Deweer, 1997).

Industrialmente, a hidrólise do amido é um processo contínuo que desenvolve, em uma única etapa, o aquecimento (à 105-110°C), gelatinização e a liquefação do amido e, em uma segunda etapa, a sacarificação (Beynum *et al.*, 1985; Kearsley *et al.*, 1995; Shetty *et al.*, 1998; Deweer, 1997).

A liquefação é realizada, em geral, com enzimas microbianas termoestáveis com atividade hidrolítica das ligações glicosídicas α -1,4, que são as alfa-amilases termoestáveis. Entretanto, conforme descrito no item 3.1.1.2., o emprego de enzimas alfa-amilases tipo sacarificante, possibilitaria produzir xaropes de alta concentração de glicose ou maltose (produtos de baixo peso molecular) em apenas uma etapa, com apenas uma enzima.

Como a gelatinização do amido gera uma solução altamente viscosa, o tratamento enzimático tem como objetivos reduzir bruscamente a viscosidade da solução e obter produtos com características de composição definidas (Beynum *et al.*, 1985; Kearsley *et al.*, 1995; Shetty *et al.*, 1998; Salva, 1990; Kindle *et al.*, 1984). Os produtos obtidos dependem do tipo da enzima utilizada sendo, geralmente, maltose, maltodextrinas de pesos moleculares diversos e pequenas quantidades de glicose.

Na produção de xaropes de maltodextrinas, deve-se salientar que as condições de processo devem ser ajustadas (especialmente tempo, temperaturas e matéria-prima) de forma a obter adequados níveis de DE (dextrose equivalente), propriedades características para esses produtos ($20 < DE < 80$) (Kearsley *et al.*, 1995).

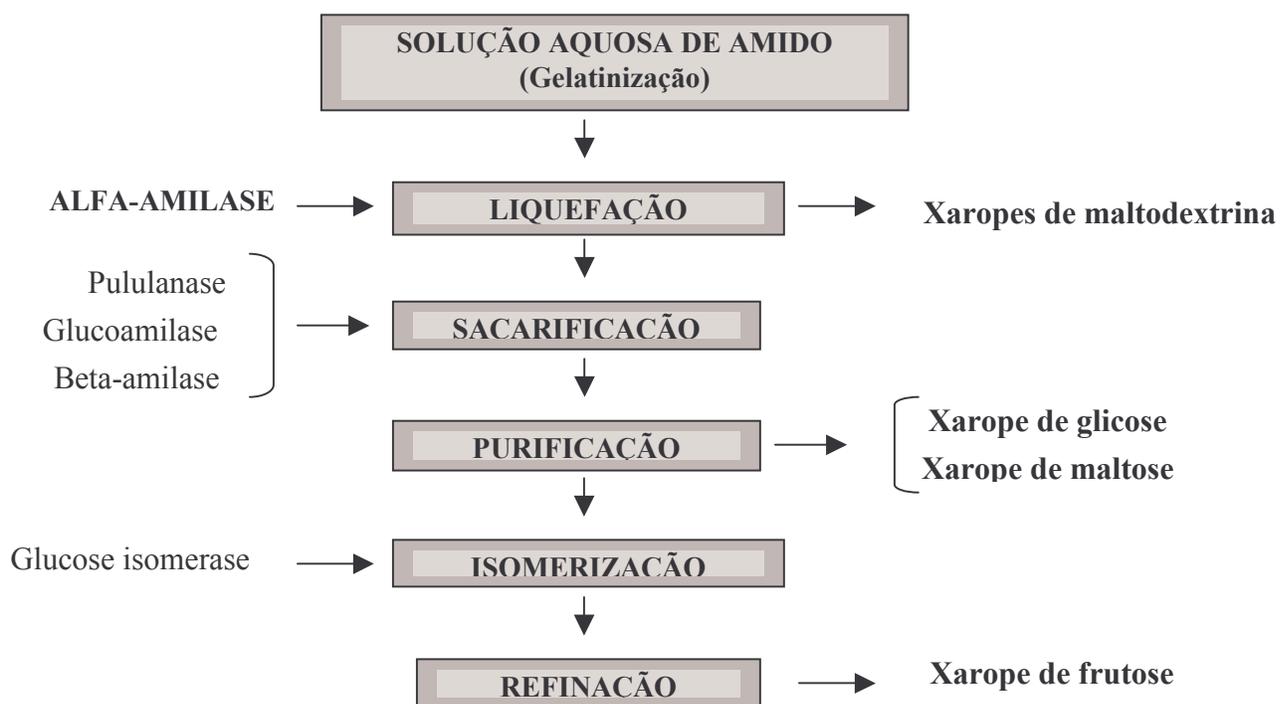


Figura 7. Passos da conversão enzimática de amido
(Kearsley *et al.*, 1995)

3.2.3. Processo de sacarificação do amido

Após a liquefação, a solução de maltodextrina é hidrolisada a glicose por uma enzima desramificante (figura 7), seja endoenzima (isoamilase e pululanase) ou uma exoamilase (β -amilase e glucoamilase), atuando sobre as ligações glicosídicas α -1,6 da amilopectina (Bobbio *et al.*, 1992). Como exemplo, temos a aplicação da enzima glucoamilase que gera um rendimento de até 96% de glicose em peso seco de amido ao final do processo (Shetty *et al.*, 1998). Entretanto, como analisado anteriormente, algumas alfa-amilases têm a capacidade de

hidrolisar ligações glicosídicas em α -1,6, levando à produção de xaropes de glicose, maltose e maltotriose diretamente após a gelatinização (Christophersen *et al.*, 1998; Fitter *et al.*, 2001; Iwata *et al.*, 1990; Fogarty *et al.*, 1993; Doyle *et al.*, 1999; Takasaki, 1985).

O resultado dessa segunda etapa no processamento do amido é uma solução de sacarídeos com baixo peso molecular como, por exemplo, maltose e glicose, componentes dos xaropes de açúcares mais utilizados nas indústrias alimentícias e farmacêuticas.

3.3. Produtos da hidrólise do amido

Os produtos comerciais derivados do amido encontram grande aplicação nas indústrias de alimentos, onde são utilizados como coadjuvantes no processamento e determinam características relevantes dos produtos finais (Beynum *et al.*, 1985; Kearsley *et al.*, 1995; Kruger *et al.*, 1987; Marchal *et al.*, 1999; Hamilton *et al.*, 1998; Godshall, 1988; Kindle *et al.*, 1984; Dixon *et al.*, 1979; Nagodawithana *et al.*, 1993; Omobuwajo, 1994; Pylar, 1973).

Com o aprimoramento das tecnologias fermentativas e das técnicas de imobilização enzimática, os controles dos processos hidrolíticos tornaram-se mais finos, permitindo a obtenção de produtos com composições específicas, de maior qualidade e pureza (Kearsley *et al.*, 1995). Esses produtos são classificados através da adoção de parâmetros como dextrose equivalente (DE), grau de polimerização (DP) e teor de glicose (DX). Geralmente, a fonte de amido utilizado como matéria prima não é citada na composição, exceto em casos de produtos

com valores muito baixos de DE, onde a composição do amido (em especial, a proporção amilose/amilopectina e presença de proteínas e lipídeos) pode determinar o surgimento de compostos de retrogradação e problemas tecnológicos na utilização do xarope.

Dextrose equivalente (DE) é a porcentagem de açúcares redutores totais (em base seca) calculada em função de curva padrão utilizando glicose; com isso, o amido puro apresenta DE mínimo e igual a 0, enquanto a glicose pura apresenta DE máximo e igual a 100. O grau de polimerização (DP) está relacionado com a composição do xarope, especificando os sacarídeos presentes, em termos do número de unidades de glicose contidas em cada fração do xarope. Desta forma, DP1 refere-se à dextrose (1 unidade de glicose), DP2 à maltose, DP3 à maltotriose etc.

Em geral, a caracterização dos produtos obtidos na hidrólise de amido é feita utilizando-se o fator DE (Roussel *et al.*, 1991; Shetty *et al.*, 1988; Kruger *et al.*, 1987). Entretanto, cabe enfatizar que produtos com diferentes composições de sacarídeos (obtidos por diferentes processamentos hidrolíticos) podem apresentar o mesmo DE e serem produtos de diferentes características e aplicações. Esse conflito é resolvido, na prática, pela adoção de critérios de separação como o conteúdo de açúcares de baixo peso molecular (para xaropes com baixos DE), expresso em termos de DP/DE, ou através do teor de glicose (DX), para xaropes com altos DE (Doyle *et al.*, 1999; Roussel *et al.*, 1991; Kruger *et al.*, 1987).

Assim, tem-se que os xaropes com valores de DE inferiores a 20 são referentes aos xaropes de maltodextrinas, os entre 20 e 80 são os diversos

xaropes de açúcares e os superiores a 80 são relativos aos hidrolisados ou hidróis.

3.3.1. Maltodextrinas

Maltodextrinas são os produtos da hidrólise parcial do amido, após a ação da alfa-amilase na liquefação. Tipicamente são compostos por oligo e polissacarídeos de variados tamanhos e pesos moleculares: desde maltotrioses, maltotetroses até cadeias com centenas de unidades de glicose (Wang *et al.*, 2000; Roussel *et al.*, 1991; Beynum *et al.*, 1985; Kearsley *et al.*, 1995; Saha *et al.*, 1987; Marshal *et al.*, 1999; Luallen, 1988; Ali *et al.*, 1999; Nagodawithana *et al.*, 1993; Takasaki, 1985; Nebesny *et al.*, 1990; Doyle *et al.*, 1999).

Maltodextrina é comercialmente caracterizada como xarope com valores de DE inferiores a 20. Sendo um produto não doce, trata-se de um xarope solúvel em água fria, tipicamente claro e com características físico-químicas e funcionais desejáveis: estabilizante (importante durante longa estocagem, por exemplo), resistente ao calor (com grande aplicação em panificação), espessante, atuante na prevenção da formação de cristais de gelo durante o congelamento do alimento, nutritiva e preservativa (evitando processos de oxidação) (Doyle *et al.*, 1999; Godshall, 1988; Marshal, 1999). Estas propriedades são obtidas nos xaropes através do controle fino do processo de hidrólise do amido e estão diretamente relacionadas com o fator DE.

É bastante utilizado nas indústrias de alimentos, principalmente em bebidas energéticas (DP entre 3 e 6), líquidos e bebidas alcoólicas (por exemplo, licores).

Na indústria farmacêutica tem grande aplicação em fluidos e alimentações parentais (Marshall *et al.*, 1999), por tratar-se de um xarope com poder nutritivo.

Maltodextrinas com baixos valores de DE estão sendo utilizadas também como substitutos de gorduras e óleos em alimentos. A solução ou gel substituinte pode ser formada com uma proporção de 1:3 (maltodextrina:água), gerando $\frac{1}{4}$ de kilocalorias das obtidas com gorduras e óleos (por grama de material sólido). As vantagens dessa tecnologia são claras em alimentos, representando extenso campo de aplicações (Kearsley *et al.*, 1995).

3.3.2. Xaropes de açúcares

O termo “xaropes de açúcares” engloba os produtos obtidos da hidrólise do amido inicialmente utilizados como edulcorantes de alimentos. Entretanto, cada um destes produtos apresenta características tecnológicas próprias e variantes especificamente em função de quatro fatores: a) Dextrose Equivalente (DE); b) composição de carboidratos (importante para xaropes de diferentes composições que apresentam os mesmos valores de DE); c) teor de sólidos e d) teor de dióxido de enxofre. Dentre as características referentes aos xaropes de açúcares, as mais importantes são as listadas na tabela 4, dadas em função do índice de dextrose equivalente (DE) (Shetty *et al.*, 1988; Nebesny *et al.*, 1990; Kearsley *et al.*, 1995; Beynum *et al.*, 1985; Saha *et al.*, 1987; Nagodawithana *et al.*, 1993).

Propriedades funcionais	Tipo de xarope de açúcar	
	Baixo DE	Alto DE
Agente de corpo	←	→
Reações de escurecimento	←	→
Estabilizador de emulsões	←	→
Fermentabilidade	←	→
Acentuador de sabor	←	→
Efeito preservativo	←	→
Estabilizador de massa (panificação)	←	→
Abaixador de ponto de congelamento	←	→
Agente de umectância	←	→
Higroscopicidade	←	→
Sólidos nutritivos	←	→
Prevenção da cristalização de açúcar	←	→
Prevenção da formação de cristais de gelo durante o congelamento	←	→
Poder edulcorante	←	→
Viscosidade	←	→

Tabela 4: Variação das propriedades funcionais dos xaropes em função do índice dextrose equivalente (Kearsley *et al.*, 1995; Luallen, 1988).

3.3.2.1. Xaropes de maltose

Os principais xaropes de maltose utilizados industrialmente estão dispostos na tabela 5, relacionados com suas aplicações industriais mais comuns. Cabe lembrar que o processo de obtenção destes xaropes está basicamente esquematizado no fluxograma da figura 7 (Kearsley *et al.*, 1995; Saha *et al.*, 1987). Os xaropes com teores de maltose aumentados são obtidos com variações de processo (algumas inclusive indicadas na tabela 5) e ilustram a variedade de produtos obtidos pela hidrólise do amido. A metodologia de purificação destes xaropes inclui etapas de filtração e de remoção de compostos coloridos e aromáticos, através de tratamento com carvão ativo (Beynum *et al.*, 1985; Kearsley *et al.*, 1995; Saha *et al.*, 1987; Shetty *et al.*, 1998; Cho *et al.*, 2000; Salva, 1990; Luallen, 1988; Godshall *et al.*, 1988; Ali *et al.* 1999; Nagodawithana *et al.*, 1993; Takasaki, 1985).

Produtos da sacarificação	Conteúdo maltose (%)	Conteúdo glicose (%)	Aplicações industriais	
			Indústria	Produtos e propriedades
High Maltose Syrup* ¹	50 – 55	2 – 5	Confeitados	Textura e umidade controlada apropriado para confeitaria leve;
High Maltose Syrup produzido a 65°C	50 – 55	8 – 10	Panificação	Retenção de umidade e controle da cor em produtos finais;
			Sobremesas congeladas	Controle da textura (maciez) e das características de congelamento;
High Maltose Syrup produzido a 60–65°C	55 – 65	8 – 12	Bebidas fermentáveis	Controle da fermentação via spectrum de açúcares fermentáveis;
				Alta porcentagem de açúcares fermentáveis (+97%);
Very High Maltose Syrup	70 – 75	0 – 3	Sorvetes	Controle da textura (maciez) e das características de congelamento
Ultra High Maltose Syrup	82 – 88	5 – 9	Balas e doces	Prevenção da cristalização Baixa higroscopicidade
High Conversion Syrup* ²	30 – 37	35 – 43	Bebidas fermentáveis	Controle da fermentação
			Enlatados	Doçura e firmeza de frutas enlatadas
			Confeitados	Substituição de sucrose em doces
			Panificação	Retenção de umidade e controle da cor
			Bebidas	Estabilização do sabor na estocagem
Xarope de glicose e glicose cristalina	1 – 2	94 – 97	Alimentos infantis e dietéticos	Fonte de energia
			Panificação	Caramelização e propriedades da massa

Tabela 5. Principais xaropes de maltose e aplicações

Kearsley *et al.*, 1995*¹ – Produzida com enzima termoestável comercial

*² – High Conversion Syrup: é um xarope obtido pela ação combinada das enzimas alfa-amilase fúngica e amiloglicosidase sobre o amido, liberando uma solução com a composição expressa na tabela. Deve ser uma solução estável para resistir ao processo de cristalização a temperaturas inferiores a 4°C e DS entre 80 e 83%. O conteúdo de glicose nesses xaropes não deve exceder DS de 43.

3.3.2.2. High Fructose Corn Syrups (HFCS) – Xaropes de frutose

Os xaropes de açúcares mais utilizados nas indústrias de alimentos e farmacêutica são aqueles compostos prioritariamente por frutose e isso devido a uma simples razão: a frutose apresenta maior poder edulcorante quando comparada à glicose (Kier, 1972; Lehninger, 1976; Bobbio *et al.*, 1992). A diferença de doçura entre estes compostos está relacionada com a posição dos seus grupos hidroxil vicinais, com as ligações químicas (ligações tipo pontes de hidrogênio e ligações de van der Waals) estabelecidas entre os seus átomos e com a sua configuração espacial (Kier, 1972; Beynum *et al.*, 1985). A tabela 6 mostra a comparação do efeito edulcorante entre monossacarídeos naturais, dissacarídeos e os compostos sintetizados artificialmente.

Os xaropes de frutose são produzidos a partir da solução de glicose, após a liquefação e sacarificação do amido (Kearsley *et al.*, 1995; Beynum *et al.*, 1985; Saha *et al.*, 1987; Nagodawithana *et al.*, 1993). Esta solução é isomerizada à frutose pela ação de enzima glucose-isomerase, imobilizada em coluna, processo amplamente estudado e conhecido (Kearsley *et al.*, 1995; Saha *et al.*, 1987).

Juntamente à produção de xaropes de frutose, pode-se mencionar os xaropes enriquecidos (com altos teores de frutose) com diferentes aplicações e características tecnológicas e organolépticas (Luallen, 1988).

O “High Fructose Corn Syrup” (HFCS), composto com 42% de frutose, é obtido diretamente da isomerização de xaropes de glicose. Com desenvolvimento da tecnologia de separação da frutose, obtiveram-se dois novos xaropes, ambos enriquecidos e com teores de frutose de 55 e 90% respectivamente, os “Enriched Fructose Corn Syrup” (EFCS) e “Very enriched Fructose Corn Syrup” (VEFCS),

respectivamente (Kearsley *et al.*, 1995; Beynum *et al.*, 1985). A tabela 7 mostra as diferenças entre as características dos 3 xaropes de maior expressão comercial, variantes dos xaropes de frutose.

Efeito edulcorante relativo de açúcares convencionais e adoçantes sintéticos	
D-glicose	0,5 – 0,7
Maltose	0,6
Açúcar invertido (HFCS)	0,9 – 0,95
Sacarose	1,0
D-frutose	1,0 – 1,7
Sorbitol	0,63
Manitol	0,75
Xilitol	0,9
Ciclamato de sódio	30
Sacarina	200 – 700

Tabela 6: Comparação entre o efeito edulcorante de diferentes compostos (Kearsley *et al.*, 1995; Beynum *et al.*, 1985; Lehninger, 1976).

	High Fructose Corn Syrups		
	HFCS	EFCS	VEFCS
Frutose	42	55	90
Glicose	52	42	9
% sólidos	71	77	80
Ferro (ppm)	<1	<1	<1
Cobre (ppm)	<0,05	<0,05	<0,05
Umidade	29	23	20

Tabela 7. Característica dos xaropes de frutose comercialmente explorados (Beynum *et al.*, 1985).

3.3.2.3. Xaropes de glicose

Os termos “xarope de glicose”, “glicose” e “xarope de milho” são todos referentes ao mesmo produto, apesar de nenhuma dessas denominações serem apropriadas para os xaropes compostos de açúcares utilizados industrialmente. O Codex Alimentarius define os xaropes de glicose como “soluções aquosas concentradas e purificadas de sacarídeos nutritivos obtidos da hidrólise do amido”, enquanto que a Comunidade Econômica Européia (CEE) define como “solução aquosa concentrada de D(+)glicose, maltose e outros polímeros de D-glicose obtidos por processo controlado de parcial hidrólise de amido” (Kearsley *et al.*, 1995). Esta última definição está mais próxima da caracterização do produto, entretanto deve-se atentar que “polímeros de D-glicose” podem se referir a produtos com variados DE como, por exemplo, oligo e polissacarídeos.

3.3.2.3.1. Produtos de fermentação de xaropes de glicose

A glicose é considerada como o mais importante produto primário ou intermediário na produção de diversos compostos, obtidos através da aplicação de processos enzimáticos, químicos e/ou fermentativos, em indústrias farmacêuticas, químicas, têxteis etc. Estes produtos apresentam altos valores comerciais no mercado e muitos ainda se encontram em pesquisa como substituintes naturais de equivalentes convencionais, como por exemplo, a biossíntese de penicilina – obtida via fermentação com utilização da glicose como substrato – e a produção de polióis usados como adoçantes de baixo poder calórico – obtido por hidrogenação de xaropes de glicose (Beynum *et al.*, 1985; Kearsley *et al.*, 1995;

Grewal *et al.*, 1995; Goldberg *et al.*, 1991; Lehninger, 1976; Nagodawithana *et al.*, 1993).

Um ponto crítico destes processos é a escolha do xarope de glicose a ser utilizado no processamento. Como analisado anteriormente, os xaropes variam em composição e em características reológicas e organolépticas, podendo influenciar positiva ou negativamente sobre a qualidade do produto final obtido. Os principais xaropes de glicose utilizados em processos fermentativos são analisados na tabela 8, enquanto que, na tabela 9, encontram-se algumas aplicações destes xaropes, processos adotados e referências.

Composição	20 DE	42 DE	63 DE	95 DE	High Maltose syrup	Very high Maltose syrup
Glicose	1.5	19	37	92	3	3
Maltose	7	14	32	5	55	70
Maltotriose	11	11	12	3	15	20
Oligossacarídeos	56	56	19	0	27	7

Tabela 8: Composição dos principais xaropes de glicose usados em processos fermentativos

(Kearsley *et al.*, 1995).

Conversão bioquímica – hidrolisados do amido			
Derivados do amido	Produtos	Processo utilizados	Referência
Hidrolisados do amido	Xaropes de glicose Maltodextrinas Ciclodextrinas Maltose	Hidrólise enzimática: alfa-amilase, amiloglicosidase e glucose-isomerase	Beynum, 1985
Ácidos orgânicos	Ácido acético (vinagre) Ácido cítrico Ácido málico	Fermentação 100% ou fermentação 70% e enzimático 30%	Beynum, 1985 Grewal, 1995 Goldberg, 1991
Álcoois	Etanol Isopropanol Butanol	Processos fermentativos de glicose, frutose em xaropes (fermentação alcoólica)	Beynum, 1985
Polióis	2,3 Butanediol Glicerol Manitol Xilitol	Transformações químicas de hidrogenação de xaropes de açúcares	Beynum, 1985
Aminoácidos	Ácido L-glutâmico L-metionina L-lisina	Regulação da fermentação de amido hidrolisado e glicose	Beynum, 1985
Gomas e biopolímeros	Xantana Pululana Alginato	Processos fermentativos da glicose	Beynum, 1985
Antibióticos e hormônios	Penicilina	Processos fermentativos de amido hidrolisado, glicose e/ou lactose	Beynum, 1985

Tabela 9. Principais aplicações dos xaropes de glicose.

3.3.2.4. Ácidos orgânicos

Ácidos orgânicos são compostos sintetizados por inúmeros microrganismos em seus processos metabólicos de obtenção de energia, tendo a glicose como substrato (Beynum *et al.*, 1985; Kearsley *et al.*, 1995; Grewal *et al.*, 1995; Goldberg *et al.*, 1991; Lehninger, 1976). Dessa forma, realiza-se a produção industrial de ácidos como o acético, cítrico, málico entre outros, utilizados como acidulantes, importantes aditivos nos processamentos de alimentos, como pode ser observado na tabela 10.

A obtenção industrial baseia-se em processos fermentativos realizados com derivados do amido (especialmente a glicose), utilizando-se linhagens de fungos (*Aspergillus sp.* e *Penicillium sp.*), leveduras (*Candida sp.* e *Hansenula sp.*) ou bactérias (*Bacillus sp.*, *Arthrobacter sp.* e *Corynebacterium sp.*) (Grewal *et al.*, 1995).

A via metabólica produtora de ácidos orgânicos encontra-se esquematizada na figura 8, ressaltando-se que a alta concentração de carboidratos no início do processo induz o acúmulo ácido cítrico e a formação de ácido málico (Grewal *et al.*, 1995; Goldberg *et al.*, 1991).

Acidulante	Efeito em alimentos	Aplicação em alimentos
Ácido acético	Acidulante	Uso direto
Ácido cítrico	Acidulante	Sabor ácido em bebidas carbonatadas e/ou sucos de frutas, frutas enlatadas, geléias, balas e confeitos;
	Melhorador de sabor	Sabor ácido agradável em frutas e vegetais e em bebidas a base de limão
	Regulador de pH	Geléias
	Agente quelante e preservativo	Inibe escurecimento enzimático
	Estabilizante (citrato de sódio) e emulsificante	Produtos lácteos e alimentos com queijo
Ácido málico	* ¹	Purês de tomate, sucos e compotas de frutas, doces e confeitos
	Efeito sinérgico com aspartame	Aumenta a doçura em bebidas carbonatadas, reduzindo em 10% adição de adoçantes

Tabela 10: Acidulantes e suas aplicações.

*¹ O ácido málico encontra as mesmas aplicações do ácido cítrico, com a diferença de ser mais concentrado, podendo ser usado em menores concentrações

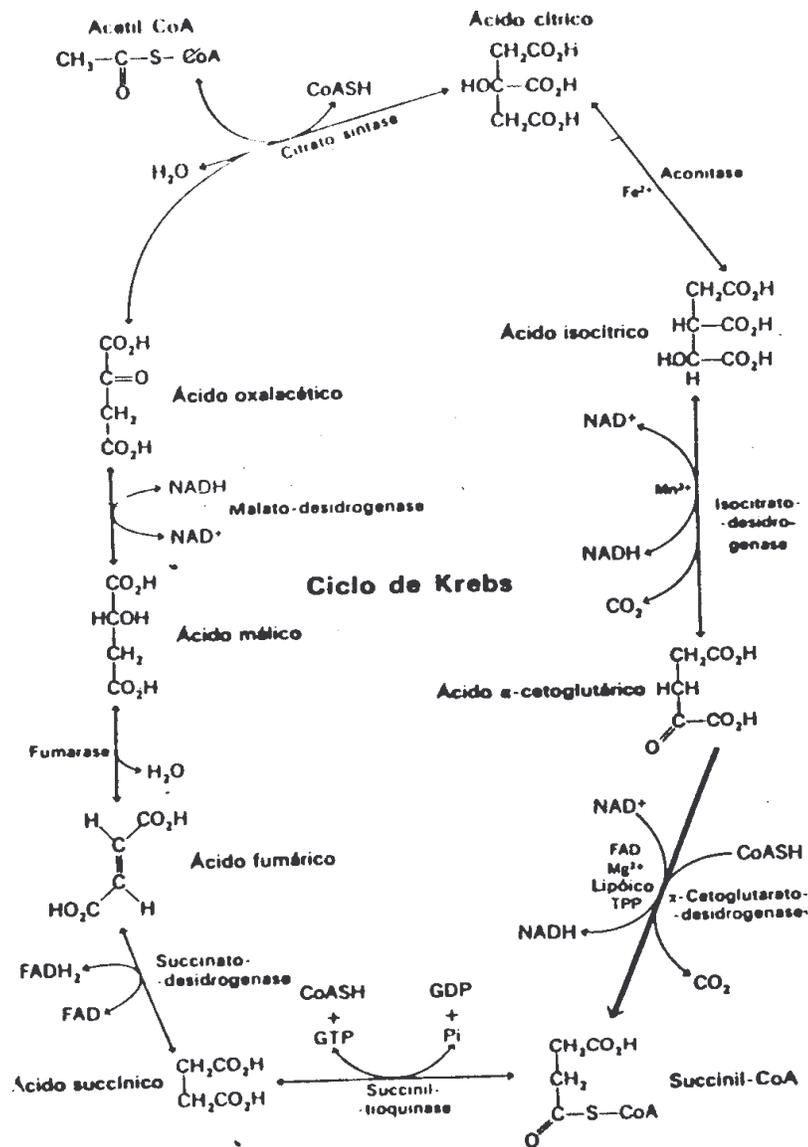


Figura 8: Obtenção de ácidos orgânicos através da via glicolítica (Lehninger, 1976).

3.3.2.5. Polióis

Polióis, também conhecidos como *sugar alcohols*, ou poliálcoois, são pertencentes ao grupo de sacarídeos derivados, onde os grupos aldeídos e cetonas são substituídos por grupos hidroxil (Kearsley *et al.*, 1995).

Podem ser encontrados, consumidos e extraídos de frutas, vegetais e cereais, apesar de estarem presentes em baixas concentrações. Podem também ser produzidos através de processos químicos de hidrogenação catalítica de xaropes de açúcares; nesses processos, os diferentes xaropes usados como substrato geram diferentes produtos: xaropes de glicose produzem sorbitol, xaropes de frutose (HFCS) produzem uma composição (*blend*) de manitol e sorbitol, xaropes de maltose produzem maltitol etc. (Kearsley *et al.*, 1995; Beynum *et al.*, 1985).

Sendo produzidos ou em forma cristalina ou em solução aquosa, estes produtos apresentam grande poder edulcorantes associado com baixo efeito calórico (foi inicialmente desenvolvido como alimentos especiais para diabéticos), são não-cariogênicos, têm propriedades organolépticas e tecnológicas adequadas (atuam como estabilizantes, emulsificantes, umectantes e crioprotetores), além de terem alta flexibilidade, podendo ser aplicados em diversos processos industriais.

A figura 9 apresenta o processo de obtenção de maltitol a partir da hidrogenação do xarope de maltose (High Maltose Syrup).

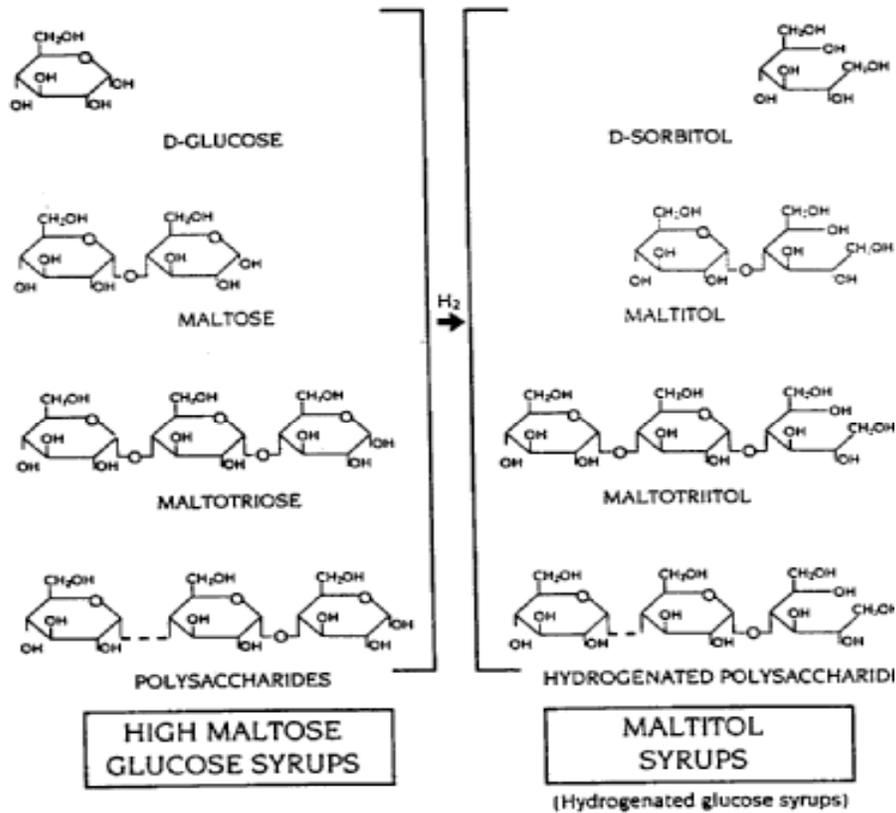


Figura 9: Hidrogenação de xarope de maltose para produção de xarope de maltitol (Kearsley *et al.*, 1995; Beynum *et al.*, 1985).

3.3.2.6. Aminoácidos

A biossíntese industrial de aminoácidos baseia-se, da mesma forma que a biossíntese de ácidos orgânicos, na regulação das etapas do metabolismo de açúcares (glicose, frutose e maltose) (Kearsley *et al.*, 1995; Beynum *et al.*, 1985; Lehninger, 1976; Nagodawithana *et al.*, 1993). Assim, através de processo conhecidos de inibição, retroinibição e acúmulo de metabólitos pode-se produzir aminoácidos com ampla aplicação no mercado de alimentos como, por exemplo, os listados na tabela 11, com suas respectivas finalidades e aplicações.

Os produtos de hidrólise do amido encontram uma aplicação direta na produção de aminoácidos, sendo utilizados por microrganismos como as bactérias *Corynebacterium glutamicum* e *Brevibacterium sp.* em processos fermentativos utilizando vias metabólicas conhecidas (Lehninger, 1976). A via metabólica utilizada encontra-se esquematizada na figura 10, com os precursores dos aminoácidos e os próprios aminoácidos apresentados.

Aminoácido	Finalidade	Aplicação em alimentos
L-glutamato de sódio	Realçador de sabor	Sopas, molhos de carnes, condimentos, bolachas salgadas
Aspartato e alanina	Melhorador de sabor	Sucos de frutas
Glicina	Melhorador de sabor	Alimentos doces
Cisteína	Melhorador de qualidade	Panificação
Triptofano + Histidina	Antioxidante	Sucos de frutas
Aspartame: fenilalanina + ác. aspártico	Composto edulcorante de baixo conteúdo calórico	Bebidas carbonatadas
Lisina	Valor nutricional	Panificação (Japão)
Metionina	Valor nutricional	Produtos a base de soja

Tabela 11. Aminoácidos usados na indústria de alimentos

Beynum *et al.*, 1985

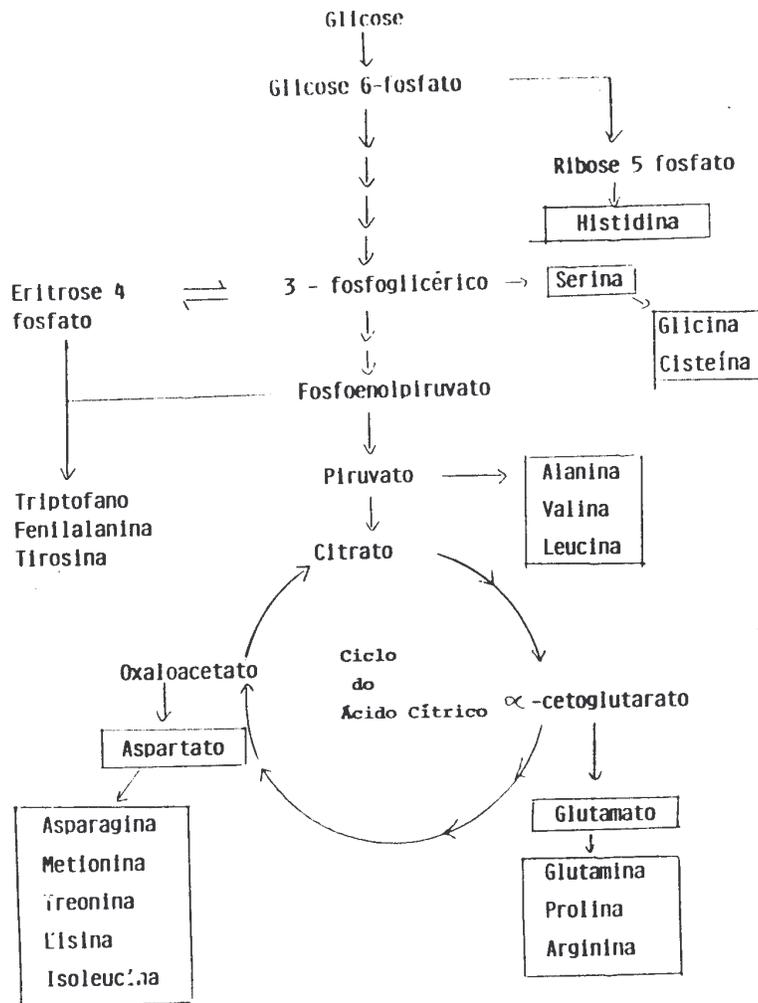


Figura 10: Via glicolítica na produção de aminoácidos (Lehninger, 1976).

3.3.2.7. Gomas

As gomas são utilizadas há milhares de anos, principalmente as extraídas de plantas e algas marinhas. Entretanto, o aprimoramento dos processos fermentativos ampliou as fontes de obtenção e, conseqüentemente, as possibilidades tecnológicas e características dos produtos obtidos. Entre as gomas produzidas por processos fermentativos, destaca-se a xantana, obtida da fermentação do xarope de glicose (Bobbio *et al.*, 1992).

Goma de maior importância comercial, a xantana é produzida em larga escala pela fermentação de D-glicose, pelo microrganismo *Xantomonas campestris*. Trata-se de um heteropolissacarídeo composto por unidades de D-glicose, D-manose, ácido D-glucorônico, grupos acetílicos e ácido pirúvico. Apresenta elevado peso molecular, é solúvel em água (tanto em frio quanto em quente), forma soluções viscosas resistentes ao calor e a mudanças de pH, mesmo em baixas concentrações (Kearsley *et al.*, 1995; Beynum *et al.*, 1985; Bobbio *et al.*, 1992).

O tipo de xarope de glicose usado na fermentação aeróbica depende da especificidade da linhagem de *Xantomonas sp.* utilizada, do preço e da disponibilidade local; geralmente é utilizado o xarope 42 DE, podendo ainda ser substituído pelo 63 DE e pelo HFCS (Kearsley *et al.*, 1995).

É empregada como espessantes e gelificantes em alimentos desde a década de 60 e, devido a sua resistência a baixos pHs, é comumente aplicado a molhos de saladas.

3.3.3. Bebidas fermentadas e panificação

A aplicação clássica de alfa-amilase é a produção de açúcares fermentáveis em processos de fermentação de bebidas e panificação. Em ambos os processos, a alfa-amilase é adicionada à fonte de amido (trigo, batata, cevada etc.) com intenção de produzir açúcares fermentáveis, utilizados por microrganismos para a produção de gases através da fermentação (Kearsley *et al.*, 1995; Beynum *et al.*, Beynum *et al.*, 1985; Pylar, 1973; Kruger *et al.*, 1987; Lehninger, 1976; Godshall *et al.*, 1988; Nagodawithana *et al.*, 1993).

A produção de bebidas fermentadas inclui duas etapas básicas: a conversão enzimática de amido em açúcares fermentáveis, realizada pela alfa-amilase, e a fermentação destes açúcares com liberação de álcool, realizada por leveduras. A presença destes açúcares também está relacionada com a produção do *flavour* característico do produto (Pylar, 1973).

A indústria de panificação utiliza alfa-amilase como aditivo no processo, permitindo o controle das propriedades reológicas das massas produzidas.

A fabricação de pães e derivados pode ser realizada por métodos diferentes, geralmente com as seguintes etapas: 1) A massa é feita pela mistura de farinha, água, sal, leveduras prensadas (ou fermento) e demais aditivos; 2) A massa é fermentada, dividida e moldada – durante esse período, a temperatura é mantida em cerca de 25°C e ocorrem a formação da rede de glúten e a produção de gás carbônico (CO₂). 3) A massa é cozida a cerca de 180°C e, durante essa etapa, a estrutura porosa do miolo é fixada e é desenvolvida a coloração da casca (reações de Maillard). 4) Resfriamento (Kruger *et al.*, 1987).

Historicamente não há necessidade de adição de alfa-amilase, pois ela está presente na fonte de amido utilizada, ou seja, boa quantidade de alfa-amilase vem junto ao grão e à farinha utilizados. Entretanto, como essa quantidade é variável e dependente de safras, tipos de sementes, tipos de grãos etc. usa-se a suplementação com tal enzima. Esta adição é vantajosa porque permite uma dosagem exata, com características de atividade e temperatura conhecidas. Outras vantagens tecnológicas desta adição estão relacionadas com a estabilidade da massa e do produto final, melhoria no volume e cor, na estrutura do miolo e no *flavour* (Pylar, 1973) .

Por outro lado, ou o excesso de alfa-amilase ou o uso desta enzima estável às altas temperaturas atingidas no cozimento podem ocasionar sérios danos ao produto final, como pães com miolo úmido, pegajoso e aspecto rançoso. Estes efeitos são devidos à continuidade da atividade hidrolítica sobre o amido durante as etapas de resfriamento e estoque do pão podendo, além de comprometer as características organolépticas do produto, levar ao apodrecimento da massa (Pylar, 1973; Salva, 1990).

4. Material e Equipamentos

4.1. Materiais

- ✓ Reagentes e materiais específicos:
 - Meios de cultura: Agar nutriente (Difco ou Synth), Peptona (Biobrás), Extrato de carne (Biobrás), Extrato de levedura (gentilmente cedido pela empresa Prodesa), Amido solúvel (Biobrás);
 - Reagentes químicos: ácidos, bases, sais minerais e solventes utilizados das marcas Merck, Biobrás, Ecibra ou Synth;
 - Reagentes específicos: Acrilamida-Bis, acrilamida e corante comassie blue G250 da marca Merck;
- ✓ Colunas previamente empacotadas de purificação enzimática de Fast Purification Liquid Chromatography (FPLC): resina do trocador aniônico (DEAE-celulose) e resina de hidrofobicidade (Butil), fornecidas pela Amershal Pharmacia do Brasil;
- ✓ Coluna previamente empacotada de filtração em gel de Sephadex G-200 (60 cm – 120 ml), fornecida pela Amershal Pharmacia do Brasil;
- ✓ Padrões de proteína para determinação da curva de calibração de peso molecular por filtração em gel de Sephadex G-200: proteínas fosforilase B (94 KDa), albumina bovina (67 KDa), albumina de ovo (43 KDa), anidrase carbônica (30 KDa) e inibidor de tripsina (20,1 KDa);
- ✓ Padrões de proteína: Kit para SDS-Eletroforese composto por solução liofilizada das proteínas fosforilase B (97,0 KDa), albumina bovina (66 KDa), albumina de ovo (45 KDa), anidrase carbônica (30 KDa), inibidor de tripsina

(20,1 KDa) e α -lactalbumina (14,4 KDa), fornecido pela Amershal Pharmacia do Brasil;

- ✓ Amido comercial: Amido de milho (Maizena), Farinha de mandioca (Yoki), Farinha de trigo (Dona Benta), Fécula de batata (Yoki);
- ✓ Papel de cromatografia e de filtro: papel Whatman no. 1 de 46x20 cm; filtros Milipore 0,22 e 0,45 μ m;
- ✓ Padrões de açúcares para cromatografia: glicose e maltose (Merck);
- ✓ Coluna de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC): Polyspher CH CA (strong cation exchanger on polystyrene/divenylbenzene in calcium form), 10 μ m; dimensões: 300mm x 6,5mm; marca Merck.

4.2. Equipamentos

- ✓ Agitador rotatório New Brunswick Scientific;
- ✓ Estufas bacteriológicas, Fanem;
- ✓ Geladeira, Consul;
- ✓ Espectômetro Beckman DU-70;
- ✓ Banhos termostatizados de água, Fanem;
- ✓ Câmera de fluxo de ar horizontal
- ✓ Fast Purification Liquid Chromatography (FPLC)
- ✓ Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (HPLC), marca Shimadzu, modelo LC10A;
- ✓ Detector: Refractive Index Detector, marca Shimadzu, modelo RID-6A;
- ✓ Sistema Mini-Protean II com fonte PS 500 XT, Tecnal;

5. METODOLOGIA

5.1. Isolamento e seleção de microrganismos produtores de enzimas amilolíticas

Foram coletados e testados diversos microrganismos, oriundos de variados ambientes, seguindo a metodologia descrita a seguir. O objetivo inicial era selecionar cepas bacterianas produtoras de enzimas amilolíticas termoestáveis e testá-las quanto à produção de alfa-amilase. O critério para seleção da cepa para estudo completo foi a produção de alfa-amilase com maior atividade hidrolítica em temperaturas altas.

5.1.1. Coleta de amostras

As amostras foram coletadas de diferentes localidades do Estado de São Paulo.

As amostras de solo foram coletadas no interior de campos de produção de tubérculos e raízes, após a remoção dos resíduos vegetais, em uma profundidade máxima de 10 cm e acondicionadas em potes e sacos plásticos.

Foram também coletados tubérculos e raízes comercializados na região de Campinas. Estes foram acondicionados em sacos plásticos e as raspas de suas cascas foram utilizadas segundo metodologia descrita a seguir.

5.1.2. Isolamento de microrganismos

Cerca de 1 grama de amostras de solo e de raspas de tubérculos e raízes foi adicionado a tubos de ensaio de 25x250 mm contendo 5 ml de água destilada.

Após agitação, os tubos receberam tratamento térmico (85°C) por 5 minutos e uma alçada do líquido sobrenadante foi inoculado em placas de agar nutriente acrescidas de 0,5% de amido solúvel. As placas foram incubadas a 35°C durante 48 horas para o desenvolvimento das bactérias.

As colônias foram isoladas e repicadas em placas e tubos de ensaio contendo agar nutriente acrescido de 0,5% de amido solúvel e incubadas a 35°C, em um período de 4 a 5 dias.

5.1.3. Seleção preliminar de microrganismos produtores de alfa-amilases

As cepas bacterianas isoladas e plaqueadas de acordo com o item 5.1.2. foram testadas inicialmente quanto à capacidade de utilização do amido como fonte de energia através do teste da solução de iodo-KI 0,01N (solução lugol). Essa solução foi adicionada às placas de Petri e as colônias que apresentaram halo azul ao seu redor, indicativo da ausência de amido em decorrência presença de enzima amilolítica, foram testadas quanto à produção específica de alfa-amilase, de acordo com o método descrito no item 5.1.4.

Visando ao isolamento das diferentes cepas desenvolvidas na placa, uma alçada de cada colônia selecionada foi passada para tubo com 5 ml de água destilada estéril (para diluição) e inoculada novamente em placa de agar nutriente contendo 0,5% de amido e incubada por 48 horas a 35°C. Tal procedimento foi repetido até a verificação de ausência de contaminantes em cada cepa testada.

5.1.4. Produção inicial de alfa-amilase

Os microrganismos selecionados no item 5.1.3. foram inoculados diretamente em frascos de Erlenmeyer de 250 ml, contendo 50 ml do meio de cultura composto de Caldo Nutriente e amido solúvel. A incubação dos frascos para fermentação foi feita em agitador rotatório a 150 rpm, a 35°C, em períodos de 72 horas. Após esse período, o meio de cultura foi centrifugado a 10.000 rpm durante 15 minutos a 5°C. A atividade de alfa-amilase foi determinada no líquido sobrenadante, de acordo com a metodologia descrita no item 5.1.5.1.

O meio de fermentação utilizado – produto comercial Caldo nutriente (Synth) – tinha como composição 5 g/L de peptona e 3 g/L de extrato de carne, sendo ainda acrescido de 5 g/L de amido solúvel (Biobrás). Posteriormente, no item 5.3.2., no estudo do meio de fermentação, este produto deixou de ser utilizado devido à priorização do uso de seus componentes em separado, seguindo, entretanto, as mesmas concentrações propostas.

5.1.5. Determinação da atividade da alfa-amilase

A metodologia de determinação de atividade de alfa-amilase baseia-se na reação de hidrólise do amido, reação que produz compostos com características conhecidas como, por exemplo, açúcares redutores.

Visando à otimização do tempo na seleção de grande número de microrganismos produtores da enzima, foi adotada uma análise qualitativa quanto à presença de alfa-amilase no meio de fermentação (presente ou ausente) e uma

análise quantitativa para aferição da atividade enzimática, realizada apenas nas cepas previamente consideradas positivas.

5.1.5.1. Determinação qualitativa da atividade de alfa-amilase

A determinação qualitativa de atividade de alfa-amilase baseia-se no método de SKB (Sandsted, Keen e Blish), citado por Sato (1991), modificado.

Esse método utiliza a capacidade de a amilose, polissacarídeo componente do amido e principal substrato da alfa-amilase, formar o complexo colorido em presença de solução de iodo. Com a presença da alfa-amilase atuante sobre a amilose, haverá diferenciação na coloração final obtida, quando comparado com a coloração de uma solução padrão.

Uma solução de 4 ml composta por 1% de amido solúvel em tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 6 foi incubada em banhos de água termostatizados a 60°C durante 10 minutos para equilibrar a temperatura. A esta, foi adicionado 1 ml do sobrenadante enzimático obtido após centrifugação do caldo de fermentação e, após 30 minutos, retirou-se uma amostra de 1 ml da mistura de reação, adicionando-a a 5 ml de solução diluída de iodo-KI. A coloração obtida foi comparada com a cor da solução padrão, indicando a presença ou ausência da enzima alfa-amilase.

A solução diluída de iodo-iodeto de potássio ($I_2 - KI$) foi preparada pela mistura de 2 ml de solução estoque (5,5 g I_2 e 11 g KI em 250 ml de água destilada) e 20 g de KI dissolvido em 500 ml de água destilada. A solução padrão

era constituída de 25 g de $(\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O})$ e 3,84 g de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ em 100 ml de HCl 0,01 N.

5.1.5.2. Determinação quantitativa da atividade hidrolítica da alfa-amilase

Foram adotadas duas metodologias para medida da atividade hidrolítica da enzima. Ambas metodologias são adotadas internacionalmente para caracterização da atividade da alfa-amilase e, por essa razão, ambas foram utilizadas.

5.1.5.2.1. Determinação da atividade dextrinizante da alfa-amilase

A metodologia de determinação da atividade dextrinizante da alfa-amilase baseia-se no método de Smith & Roe, citado por Medda *et al.* (1980).

À 0,5 ml de uma solução de amido solúvel 1% foi adicionada 0,4 ml de solução tampão fosfato de sódio 0,05M, pH 6. Esta solução foi incubada em banho termostaticado em diferentes temperaturas (60, 75, 85 e 95°C) por 10 minutos, até atingir o equilíbrio térmico. Adicionou-se, então, 0,1 ml do sobrenadante do caldo de fermentação centrifugado a 10.000 rpm, por 15 minutos, a 5°C. Após 5 minutos de incubação, a reação enzimática foi interrompida pela adição de 0,5 ml de solução de HCl 0,1N. O mesmo procedimento foi seguido para o tubo de controle onde, em lugar de adicionar-se a solução enzimática, foi adicionado 0,1 ml de

água destilada. Ambos os tubos, de controle e de amostra, tiveram o volume final completado para 15 ml com água destilada.

A quantidade de amido hidrolisado pode ser calculada através da diferença entre as medidas de absorvância da solução de controle e das amostras, medidas a 620 nm, após a adição de 0,1 ml de solução de iodo (0,3% I₂ em solução de KI 3%).

Uma unidade de atividade dextrinizante (UAD) foi definida como a quantidade de amido hidrolisado (mg) por minuto, nas condições adotadas no ensaio. O cálculo da atividade foi realizado através da seguinte expressão:

$$\text{UAD} = \frac{(\text{Abs. controle} - \text{Abs. Amostra})}{\text{Abs. controle} \times 0,1\text{ml enzima}}$$

5.1.5.2.2. Determinação da atividade sacarificante da alfa-amilase

A atividade sacarificante da alfa-amilase foi determinada segundo o método de Bernfeld, citado por Medda *et al.* (1980), modificado, e utilizado também por Takasaki *et al.* (1985). Tal método baseia-se no aumento do caráter redutor de uma solução de amido, evidenciando o aumento da concentração de açúcares redutores, produtos da hidrólise enzimática.

À 0,5 ml de uma solução de amido solúvel 1% adicionou-se 0,4 ml de solução tampão fosfato de sódio 0,05M, pH 6. Esta solução foi incubada em banho termostático em diferentes temperaturas (60, 75, 85 e 95°C) por 10 minutos, até atingir o equilíbrio térmico. Adicionou-se, então, 0,1 ml do sobrenadante do caldo

de fermentação centrifugado a 10.000 rpm, por 15 minutos, a 5°C. Após 10 minutos de incubação, a reação enzimática foi interrompida pela adição de 0,5 ml de solução de HCl 0,1N. O mesmo procedimento foi seguido para o tubo de controle onde, em lugar de adicionar-se a solução enzimática, foi adicionado 0,1 ml de água destilada.

A concentração de açúcares redutores formados foi calculada através da metodologia de Somogyi (1952) e Nelson (1944), em função de duas curvas de calibração preparadas com soluções de maltose. Uma unidade de atividade sacarificante (UAS) foi definida como a quantidade de mg de maltose formada por mg de proteína, por minuto, nas condições propostas no ensaio.

5.2. Identificação e conservação da linhagem melhor produtora da enzima

O microrganismo melhor produtor da alfa-amilase termoestável foi identificado através de características microscópicas, bioquímicas e fisiológicas, de acordo com Krieg (1984).

O microrganismo foi mantido em tubos inclinados de agar nutriente acrescido de 0,5% de amido solúvel. Após incubação de 48 horas a 35°C, a cultura foi mantida a 5°C, com repicagem a cada 2 a 3 meses.

5.3. Produção da alfa-amilase pelo microrganismo selecionado

5.3.1. Padronização do pré-inóculo

A cultura bacteriana cultivada por 24 horas em placas de Petri com agar nutriente e 0,5% de amido solúvel foi transferida, com alça metálica, para os

frascos de Erlenmeyer de 250 ml, contendo 50 ml do meio de cultura (5 g/L de peptona, 3 g/L de extrato de carne e 5 g/L de amido solúvel), com pH ajustado para 7, com HCl 1M ou NaOH 1M. Os frascos foram incubados em agitador rotatório a 150 rpm e 35°C.

Para determinação do tempo mínimo de fermentação do pré-inóculo foi realizada a análise da cinética de crescimento bacteriano, em período de 72 horas. O crescimento bacteriano foi monitorado utilizando-se a metodologia de Miles *et al.* (1938) para contagem de unidades formadoras de colônia por volume (UFC/ml).

5.3.2. Estudo do meio de fermentação

O meio de fermentação teve sua composição testada quanto à fonte de nitrogênio (peptona, extrato de carne, extrato de levedura) e fonte de carbono (amido solúvel). A melhor combinação de componentes foi determinada em função da produção de alfa-amilase, evidenciada pelos índices de atividade hidrolítica, determinados de acordo com o item 5.1.5.2.1.

5.3.3. Otimização dos parâmetros de fermentação

A otimização dos parâmetros de fermentação: temperatura de incubação, número de rotações por minuto no agitador rotatório e volume de meio de fermentação foi realizada com a aplicação de métodos de superfície de resposta e as análises utilizando o software Statistica 5.5.

5.3.4. Produção de alfa-amilase

Para produção de alfa-amilase utilizou-se o pré-inóculo obtido de acordo com o item 5.3.1. Determinou-se a utilização de um volume de pré-inóculo igual a 10% do volume final do meio de fermentação, sendo este otimizado de acordo com o item 5.3.

A produção de alfa-amilase realizou-se em frascos de Erlenmeyer de 500 ml, com meio e condições (volume de meio, temperatura, agitação) de fermentação, determinados segundo itens 5.3.2. e 5.3.3.

Após a fermentação, o meio de cultura foi centrifugado a 10.000 rpm durante 15 minutos a 5°C. A atividade da alfa-amilase no sobrenadante foi determinada de acordo com a metodologia descrita no item 5.1.5.2.1. A fração obtida foi chamada de enzima bruta.

5.3.5. Cinética de crescimento bacteriano no meio de produção de alfa-amilase

O estudo da cinética de crescimento do microrganismo no meio de fermentação foi realizado pela determinação do tempo de fermentação em função das variáveis: atividade hidrolítica da alfa-amilase (em UAD/ml, segundo item 5.1.5.2.1.), pH e crescimento bacteriano (unidades formadoras de colônia/ml, segundo item 5.3.1.).

5.4. Fracionamento da alfa-amilase

Em determinado volume de extrato bruto, obtido de acordo com o item 5.3.4., foi adicionado sulfato de amônio em quantidade suficiente para perfazer 80% de saturação. O sal foi adicionado lentamente com agitação branda e a mistura permaneceu em repouso por 24 horas sob refrigeração para precipitação protéica.

A mistura foi centrifugada a 10.000 rpm por 15 minutos a 5°C e o precipitado dialisado contra água destilada até completa eliminação do sal, evidenciada pelo teste de cloreto de bário.

Após a diálise, a amostra foi congelada e liofilizada. O material obtido ao final da liofilização foi pesado, resuspenso e teve sua atividade hidrolítica medida de acordo com a metodologia descrita no item 5.1.5.2.1., sendo então chamado de enzima precipitada.

5.5. Purificação de alfa-amilase

O preparado enzimático precipitado e posteriormente liofilizado, obtido de acordo com o item 5.4, de atividade hidrolítica conhecida, foi aplicado nas colunas componentes do equipamento FPLC (Fast Purification Liquid Chromatography). Foram utilizadas as colunas contendo as resinas de DEAE-Sephadex (troca iônica) e butil (hidrofobicidade).

Após essa etapa, a solução obtida foi novamente dialisada por 48-72 horas, contra água destilada a 5°C, visando à eliminação do sal utilizado durante a eluição na coluna cromatográfica. A solução dialisada foi congelada a -18°C,

liofilizada e resuspensa ou em solução tampão adequada à realização da eletroforese, ou em tampão fosfato de sódio 0,05M, de pH adequado à metodologia proposta no item 5.6.1. para imediata caracterização bioquímica.

5.5.1. FPLC – Cromatografia de troca iônica

Aproximadamente 70 mg de enzima precipitada e liofilizada, contendo 250 UAD (Unidades de Atividade Dextrinizante), foram resuspensos em solução tampão fosfato de sódio 0,05M pH 6, perfazendo a concentração de 2,5 g/l. Essa solução foi filtrada e aplicada em cromatografia de troca iônica utilizando-se a coluna DEAE-Sephadex (Pharmacia).

No fracionamento da preparação enzimática, a coluna de DEAE-Sephadex foi equilibrada com solução tampão fosfato de sódio 0,05 M pH 6 e a enzima adsorvida na resina foi eluída com tampão fosfato de sódio 0,05M pH 6 acrescido de NaCl 1M, de forma a gerar um gradiente de concentração salina crescente de 0,2 a 1M. Frações de 2 ml foram coletadas a cada minuto e analisadas em relação à presença de alfa-amilase, segundo metodologia descrita no item 5.1.5.2.1.

A determinação da utilização do pH 6 tanto na dissolução da enzima liofilizada, quanto na eluição cromatográfica, decorreu de sua caracterização como o de maior atividade hidrolítica – segundo metodologia do item 5.6.1.

5.5.2. FPLC – Cromatografia líquida com fase apolar ligada

Aproximadamente 600 mg de enzima precipitada e liofilizada, contendo 2160 UAD, foi resuspensa em solução tampão fosfato de sódio 0,05M pH 7 acrescida de sulfato de amônio 1M, perfazendo a concentração de 2,5 g/l. Esta

solução foi filtrada e aplicada em coluna cromatográfica pré-empacotada com resina Butyl FF (Pharmacia).

No fracionamento da preparação enzimática, a coluna de resina butil foi equilibrada com solução tampão fosfato de sódio 0,05M pH 7 acrescida de sulfato de amônio 1M. A enzima adsorvida na resina foi eluída com tampão fosfato de sódio 0,05M pH 7, de forma a gerar um gradiente de concentração salina decrescente de 1M a 0. Frações de 1 ml foram coletadas a cada minuto e analisadas em relação a presença de alfa-amilase, segundo metodologia descrita no item 5.1.5.2.1.

5.5.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida

A alfa-amilase purificada segundo o item 5.5.2. foi submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), preparado de acordo com a metodologia de Shapiro, 1967, citada por Macedo (1995), modificada.

5.5.3.1. Tratamento da amostra protéica

A solução enzimática obtida de acordo com item 5.5.2, com 9,94 unidades de atividade dextrinizante (UAD/ml), foi resuspensa em solução tamponante composta por 1 ml de tampão Tris pH 6,8 e 0,5M, acrescida de 1,6 ml de solução 10% de dodecil sulfato de sódio (SDS), 1,6 ml de solução 20% de glicerol, 0,4 ml de β -mercaptoetanol e 3,4 ml de água deionizada. Esta solução foi aquecida em banho maria à temperatura de ebulição por 3 minutos.

5.5.3.2. Preparo da placa de eletroforese em gel vertical

As placas de eletroforese foram montadas utilizando-se um espaçador de 1,5 mm de espessura e vedadas com vaselina, evitando o vazamento do gel.

5.5.3.3. Preparo do gel de separação

Em béquer de 50 ml foram misturados 3,35 ml de água deionizada, 4 ml de solução Acrilamida/Bis (composta por 29,2 g de acrilamida e 0,8 g de N,N'-metileno-bis-acrilamida em 100 ml de água deionizada), 2,5 ml de solução tampão Tris-HCl (pH 8,8 e 1,5M), 0,1 ml de solução 10% de dodecil sulfato de sódio (SDS), 10µl de solução TEMED (tetra – metil – etileno – diamino) e 50µl de solução 10% de persulfato de amônia (p/v).

Essa solução foi despejada entre as placas previamente vedadas e, completando o espaçamento das placas, foi despejada uma solução isopropanol-água (1:1) visando ao alinhamento e à proteção do gel contra desidratação. Esse gel aparato ficou em repouso até a completa polimerização do gel (cerca de 30 minutos). Após esse tempo, a solução isopropanol-água foi retirada com papel absorvente.

5.5.3.4. Preparo do gel de empacotamento

Em béquer de 50 ml foram misturados 3,05 ml de água deionizada, 0,65 ml de solução Acrilamida/Bis (composta por 29,2 g de acrilamida e 0,8 g de N,N'-metileno-bis- acrilamida em 100 ml de água deionizada), 1,25 ml de solução tampão Tris-HCl (0,5M, pH 6,8), 0,1 ml de solução 10% de dodecil sulfato de sódio

(SDS), 5µl de solução TEMED (tetra-metil-etileno-diamino) e 50µl de solução 10% de persulfato de amônia.

5.5.3.5. Corrida da amostra

As amostras preparadas foram colocadas em cada orifício do gel superior da placa em quantidades de aproximadas de 15µl, com auxílio de uma microseringa de 50µl. A cuba para eletroforese vertical contendo a placa foi então conectada à fonte PS 500 XT. A corrida eletroforética foi realizada com corrente de 70 V. O tempo de corrida foi de, aproximadamente, 1 hora.

5.5.3.6. Revelação do gel

O gel foi cuidadosamente removido das placas e mantido, por aproximadamente 12 horas, em solução corante composta por Comassie Blue G-250 0,1%, 40% de metanol, 10% de ácido acético, completando o volume com água destilada. Após esse tempo, o gel foi transferido para solução descorante composta de 40% de metanol, 10% de ácido acético e água destilada, com lavagens sucessivas, até completa descoloração. A placa foi fixada em papel celofane, para melhor conservação.

5.6. Caracterização bioquímica da alfa-amilase

A caracterização bioquímica da alfa-amilase realizou-se na enzima bruta, enzima precipitada e na enzima purificada. As análises comparativas foram basicamente a relação ao teor de proteínas e da atividade hidrolítica em função da temperatura e do pH.

5.6.1. Determinação do teor de proteínas

A determinação do teor de proteínas na enzima bruta (obtida de acordo com item 5.3.4.) e na enzima precipitada (obtida de acordo com item 5.4.) foi realizada de acordo com o método de biureto, enquanto que a mesma determinação, na enzima purificada (obtida de acordo com item 5.5.2.), foi realizada de acordo com o método de Lowry *et al.* (1951). Todas aferições utilizaram a albumina de ovo como padrão de proteína.

5.6.2. Efeito da temperatura e do pH sobre a atividade enzimática

A caracterização do efeito da temperatura e do pH sobre a atividade enzimática foi realizada adotando-se as temperaturas de incubação da enzima de 50°C, 60°C, 70°C, 80°C, 90°C, 100°C e 110°C, o pHs de 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9. As enzimas precipitada e purificada, originalmente obtidas em pó (após liofilização), foram resuspensas em solução tamponante apropriada e imediatamente analisadas.

As frações enzimáticas foram analisadas quanto à atividade hidrolítica segundo metodologia descrita no item 5.1.5.2.1., referente à atividade dextrinizante (dada em UAD/ml) e no item 5.1.5.2.2., referente à atividade sacarificante (dada em mg maltose/minuto/mg proteína).

As análises foram realizadas em triplicata.

5.6.3. Efeito da presença de íons Ca^{2+} sobre a atividade enzimática

O estudo do efeito da presença de íons cálcio sobre a atividade enzimática foi realizado nas frações enzimáticas bruta e purificada. Foram adotadas as temperaturas de incubação da enzima de 50°C, 60°C, 70°C, 80°C, 90°C, 100°C e 110°C, o pHs de 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9 e a presença/ausência de 20 mM de CaCl_2 adicionado à solução enzimática, fatores estes combinados entre si. A enzima purificada, originalmente obtida em pó (após liofilização), foi resuspensa em solução tamponante apropriada e imediatamente analisada.

As frações enzimáticas foram analisadas quanto à atividade hidrolítica segundo metodologia descrita no item 5.1.5.2.1., referente à atividade dextrinizante (dada em UAD/ml) e no item 5.1.5.2.2., referente à atividade sacarificante (dada em mg maltose/minuto/mg proteína).

As análises foram realizadas em triplicata.

5.6.4. Determinação da termoestabilidade da enzima

O estudo da estabilidade térmica da enzima foi realizado na enzima bruta. Uma alíquota de 6 ml desta enzima foi incubada em banhos termostatizados nas temperaturas de 50, 60, 70, 80, 90 e 100°C e teve amostras coletadas nos intervalos de tempo de 10, 20, 30, 40, 50 minutos e de hora em hora, até 8 horas, para aferição da atividade hidrolítica, medida de acordo com as metodologias descritas no item 5.1.5.2.1.

O mesmo procedimento foi adotado para análise das alíquotas enzimáticas quando suplementada com 20mM de íons cálcio (CaCl_2).

5.6.5. Estimativa do peso molecular da enzima purificada

O peso molecular da enzima purificada (obtida segundo item 5.5.2.) foi estimado por filtração em gel de Sephadex G-200. As proteínas fosforilase B (94 KDa), albumina bovina (67 KDa), albumina de ovo (43 KDa), anidrase carbônica (30 KDa) e inibidor de tripsina (20,1 KDa) foram usadas para determinação da curva de calibração.

A coluna empacotada com o gel Sephadex G-200 foi equilibrada com solução tampão fosfato de sódio 0,05M pH 6 contendo NaCl 0,15M. Foram injetadas na coluna alíquotas de 2 ml da enzima purificada, resuspensa em concentração igual a 2,5 g/L, com 9,94 unidades de atividade dextrinizante (UAD/ml). Frações de 2,4 ml foram coletadas a cada 4 minutos e a atividade hidrolítica analisada conforme metodologia descrita no item 5.1.5.2.1.

5.7. Produtos da ação hidrolítica da alfa-amilase sobre o amido

A determinação dos produtos de hidrólise de diferentes fontes de amido (batata, milho, trigo e mandioca), quando em presença da alfa-amilase estudada, foi realizada de acordo com a metodologia descrita a seguir.

5.7.1. Liquefação da solução amilolítica em presença da alfa-amilase

A 3 g de amido comercial, originados de diferentes fontes (batata, mandioca, milho e trigo), em 5ml de água destilada, foram adicionados à 4 ml solução tampão fosfato de sódio 0,05M em pH definido como ótimo, de acordo

com item 5.6.2. Em seguida, foi adicionado 1 ml de enzima bruta, obtida segundo item 5.3.4., contendo 9,84 UAD, de forma a perfazer a concentração de 30% de amido.

Essa solução foi incubada na temperatura de 70°C – definida como a temperatura de maior atividade hidrolítica, segundo item 5.6.1. – no intervalo de tempo de 12 horas, com amostragens periódicas de 4 em 4 horas. Ao final de cada intervalo de reação, retirou-se uma alíquota de 1 ml e acrescentou-se 0,5 ml de HCl 1N, paralisando a reação.

5.7.2. Metodologia analítica dos produtos de hidrólise

As amostras foram analisadas por cromatografia descendente em papel e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

A alfa-amilase rompe as ligações glicosídicas em polímeros componente do amido (amilose e amilopectina), causando ou liquefação ou sacarificação desses compostos. Os produtos de hidrólise oriundos da ação de alfa-amilases liquidificantes são maltodextrinas de variados pesos moleculares, com grau de polimerização acima de 4, ou seja, não há grande produção de monômeros ou dímeros. Já os produtos de ação de alfa-amilases sacarificantes são, majoritariamente, sacarídeos de baixo peso molecular, como glicose, maltose e maltotriose. Conforme analisado no item 3.1.1.2., a análise dos produtos de hidrólise do amido obtidos sob a ação da alfa-amilase permite avaliar sua ação liquidificante ou sacarificante.

Sendo assim, esta foi a análise inicial realizada nos produtos de hidrólise do amido, revelados pelas cromatografias em papel e líquida.

5.7.2.1. Cromatografia descendente em papel

A cromatografia de açúcares descendente em papel foi realizada em papel Whatman nº. 1. Amostras das soluções obtidas segundo item 5.7.2.1. foram aplicadas sobre papel e eluídas com solução de solventes composta por n-butanol-piridina-H₂O (6:4:3). O tempo de desenvolvimento do cromatograma foi aproximadamente 20 horas para folha de 46 cm de comprimento.

Como padrão, foi utilizada uma mistura de açúcares composta de glicose (G₁), maltose (G₂), maltotriose (G₃), maltotetrose (G₄), maltopentose (G₅) e maltohexose (G₆).

A revelação dos açúcares reductores obtidos no cromatograma foi feita com AgNO₃ e NaOH alcoólico, de acordo com método descrito por Trevelyan *et al.*, citado por Sato (1991).

5.7.2.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Os açúcares presentes nas amostras de amido hidrolisado foram analisados em equipamento de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).

A amostra obtida segundo item 5.7.1. foi diluída e filtrada em papel de filtro 0,22 µm e aplicada em coluna cromatográfica Polyspher CH CA, 30cm x 6,5mm, a 80°C, com fase móvel de água destilada, deionizada e filtrada, com fluxo de 0,6 ml/minuto.

Os açúcares presentes na amostra foram identificados por comparação do tempo de retenção com os açúcares utilizados como padrão: glicose (G₂) e maltose (G₃). Suas concentrações foram obtidas por integração das áreas dos

picos registrados nos cromatogramas, em comparação com curva de calibração desenvolvida com soluções de concentrações conhecidas dos padrões utilizados.

A detecção dos compostos eluídos da coluna foi realizada com detector de índice de refração, sendo o tempo total da corrida cromatográfica de 15 minutos.

6. RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.1. Isolamento e seleção de microrganismos produtores de alfa-amilase termoestável

Foram coletadas 228 amostras, tanto de raspas de cascas de tubérculos e raízes, tais como batata e mandioca, quanto de solo de campos de produção de mandioca, principalmente. Estas amostras foram diluídas em água estéril, passaram por tratamento térmico e foram inoculadas, conforme descrito no item 5.1.2 da Metodologia.

Dessas amostras, foram isoladas, aproximadamente, 700 linhagens bacterianas. O processo de seleção realizado pode ser esquematizado na tabela 12, demonstrando os parâmetros adotados em cada etapa da pesquisa.

Etapa da seleção	Número de linhagens
Amostras	228
Linhagens isoladas após banho térmico	~700
Pré seleção – Linhagens formadoras de halo de hidrólise	468
Linhagens produtoras de alfa-amilase – atividade hidrolítica positiva ^{*1}	29
Linhagens pré-selecionadas – atividade hidrolítica em altas temperaturas ^{*2}	19
Linhagens selecionadas – análise quantitativa da atividade hidrolítica ^{*2 *3}	6

Tabela 12: Processo de seleção da linhagem bacteriana.

^{*1}: Análises a 60°C – metodologia descrita no item 5.1.5.1.

^{*2}: Análises a 75, 85 e 95°C – metodologia descrita no item 5.1.5.1.

^{*3}: Análise quantitativa da atividade hidrolítica segundo item 5.1.5.2.1.

As linhagens isoladas foram testadas, inicialmente, quanto a sua capacidade de utilização do amido como fonte de energia através do teste da solução de iodo-KI (solução lugol), conforme descrito no item 5.1.3. As 468 colônias formadoras de halo de hidrólise foram incubadas, em meio composto de peptona (5 g/L), extrato de carne (3 g/L) e amido solúvel (5 g/L), conforme o item 5.1.4. A atividade hidrolítica nas ligações glicosídicas α -1,4, característica da alfa-amilase, foi analisada qualitativamente após 72 horas, a 60°C, conforme metodologia descrita no item 5.1.5.1.. Nessa etapa, foram selecionadas 49 linhagens produtoras de alfa-amilase e, dentre estas, 29 apresentaram maior atividade hidrolítica, evidenciada visualmente pela maior intensidade da coloração amarela nos tubos de análise.

As 29 linhagens maiores produtoras foram inoculadas em meio de cultivo novamente, com a mesma metodologia anterior, e tendo suas atividades hidrolíticas medidas a 72 horas de cultivo, à 60, 75, 85 e 95°C. A análise qualitativa (alfa-amilase positiva) em altas temperaturas permitiu a seleção de 19 cepas. Comparando os resultados obtidos, 6 linhagens apresentaram maior atividade hidrolítica, especialmente nas temperaturas de 85 e 95°C.

Essas linhagens foram então cultivadas e a enzima produzida foi analisada quantitativamente, segundo metodologia descrita no item 5.1.5.2.1. em 72 horas de cultivo, em temperaturas de 75, 85 e 95°C.

O resultado dessa última etapa evidenciou que a linhagem chamada 45-2B era a potencialmente mais produtora de alfa-amilase, em função da alta atividade em altas temperaturas.

6.2. Identificação e conservação da linhagem melhor produtora da enzima

O microrganismo melhor produtor da alfa-amilase termoestável foi identificado como pertencente à espécie *Bacillus subtilis* (Ehrenberg 1835) Cohn 1872^{AL}, com características bioquímicas, microscópicas e fisiológicas típicas da espécie, de acordo com o Krieg *et al.*(1984). A identificação bioquímica completa do microrganismo foi realizada pelo laboratório de microbiologia da Fundação André Toselo (Campinas/SP).

O microrganismo encontra-se estocado no Laboratório de Bioquímica da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Unicamp, identificado como LB 45-2B, acondicionado em tubos inclinados em meio composto de agar nutriente acrescido de 0,5% de amido solúvel, com adição de vaselina líquida esterilizada, sob refrigeração.

6.2.1. Caracterização morfo-fisiológica

6.2.1.1. Características das células vegetativas

As colônias apresentaram coloração creme claro, de forma circular e convexa baixa, margem irregular, superfície levemente rugosa, opaca, textura mucóide e com presença de odor. Apresentam bom crescimento entre 30 e 37°C e em faixas de pH variados.

As células apresentaram-se em forma de bastonetes regulares, com células isoladas e em pares, Gram positivas, esporuladas, móveis e aeróbias. Foram observados esporos elipsoidais, subterminais e esporângio não distendido.

As figuras 11 (a) e (b) apresentam as placas de crescimento microbiano e as características morfológicas em dois estágios: antes e depois da adição de solução de iodo-KI (solução lugol), conforme descrito no item 5.1.3. Como esperado, não há diferença significativa na coloração da placa, evidenciando a ausência de iodo no meio de cultivo, em decorrência do consumo deste pela bactéria em estudo.

As tabelas 13, 14 e 15 mostram as características fisiológicas e bioquímicas da linhagem selecionada 45-2B, colaborando com sua identificação como *Bacillus subtilis*.



(a)



(b)

Figura 11: Placa de crescimento da linhagem 45-2B, identificada como *Bacillus subtilis*

(a) – antes da adição de solução de iodo-iodeto de potássio (solução lugol)

(b) – após a adição de solução iodo-iodeto de potássio (solução lugol), conforme descrito no item 5.1.3.

6.2.2. Caracterização bioquímica

	Utilização de carboidratos com formação de ácidos
Sacarose	+
Glicose	+
Inositol	+
Arabinose	+
Xilose	+
Manitol	+
Sorbitol	+
n-acetil-D-glicosamina	+
Amilopectina	+
Salicina	+
Inulina	+
Maltose	+
Palatinose	+
Trealose	+
Galactose	-
Tagalose	-
Ribose	-
Arabitol	-
Amigdalina	-
Rafinose	-

Tabela 13: Utilização de carboidratos pela linhagem selecionada 45-2B

	Fermentação de carboidratos
Fermentação de glicose em presença de 7% de NaCl	-
Fermentação de glicose em presença de ácido mandélico	+
Fermentação de glicose em presença de poliamidohigrostreptina	+
Fermentação de glicose em presença de tiocianato de potássio	+
Fermentação de glicose em presença do inibidor seletivo ácido nalidíxico	-
Fermentação de glicose em presença do inibidor seletivo acetato de sódio	-
Fermentação de glicose em presença do inibidor seletivo oleandomicina	-

Tabela 14: Fermentação de carboidratos pela linhagem selecionada 45-2B

Características bioquímicas	
Produção de catalase	+
Redução de nitrato	+
Assimilação de citrato	+
Decomposição de caseína	+
Produção de esculina	+
Hidrólise do amido	+
Redução do composto 2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio	+
Crescimento em diferentes concentrações de NaCl	+
Produção de oxidase	-
Assimilação de propionato	-
Produção de acetoína	-
Produção de urease	-
Desaminação de fenilalanina	-
Decomposição de tirosina	-
Produção de lecitinase	-

Tabela 15: Características bioquímicas da linhagem selecionada 45-2B

6.3. Produção da alfa-amilase pela linhagem selecionada

6.3.1. Padronização do pré-inóculo

6.3.1.1. Meio de fermentação do pré-inóculo

O meio de fermentação adotado para produção do pré-inóculo manteve a composição citada no item 5.1.4., composto de caldo nutriente (Synth) e 5 g/L de amido solúvel (Synth). A fermentação foi realizada em frascos de erlenmeyer de 250 ml, com 50 ml de meio. Os frascos foram incubados em agitador rotatório, a 150 rpm, na temperatura de 35°C. O pH do meio foi acertado para 7, com HCl 1M ou NaOH 1M.

6.3.1.2. Cinética de crescimento do pré-inóculo

O crescimento microbiano no pré-inóculo foi monitorado durante um intervalo de 72 horas, analisando-se a contagem de unidades formadoras de colônia por volume (UFC/ml) em função do tempo de fermentação.

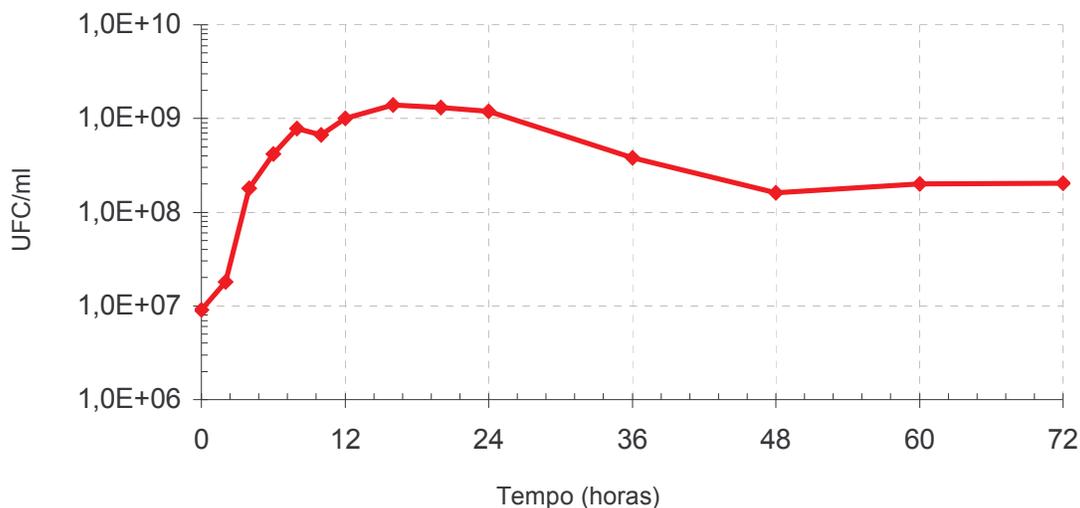


Figura 12: Curva de crescimento microbiano durante fermentação do pré-inóculo

Analisando a figura 12, verifica-se que no tempo de fermentação de 14 horas obteve-se aproximadamente $1,4 \times 10^9$ UFC/ml. De acordo com essa curva de crescimento, a concentração de unidades formadoras de colônias (UFC), nesse tempo de fermentação, corresponde ao máximo obtido com as condições adotadas nesta etapa do processo. Sendo assim, o tempo de fermentação do pré-inóculo ficou estipulado como sendo de 14 horas.

6.3.2. Estudo básico do meio de fermentação

A linhagem bacteriana selecionada 45-2B – identificada como *Bacillus subtilis* – foi cultivada em meios com diferentes composições, testando-se as combinações de 3 diferentes fontes de nitrogênio (peptona, extrato de carne e extrato de levedura) e a fonte de carbono (amido solúvel) seguida as concentrações propostas no item 5.1.4.

A fermentação foi efetivada em frascos de erlenmeyer de 250 ml, com 50 ml de meio de fermentação, a temperatura de 35°C e agitação de 150 rpm.

Padronizado o pré-inóculo, manteve-se constante o volume transferido deste para os frascos de fermentação – igual a 10% do volume final do meio de produção de alfa-amilase. Assim sendo, perfazia-se a concentração aproximadamente constante de $1,4 \times 10^8$ UFC/ml nos frascos com meio de fermentação.

A melhor combinação de componentes foi determinada em função da medição da atividade hidrolítica – unidades de atividade dextrinizante (UAD/ml

enzima) – segundo metodologia descrita no item 5.1.5.2.1., aferida após 72 horas de fermentação.

A composição do meio de fermentação mais efetivo para a produção de alfa-amilase pelo microrganismo selecionado foi peptona, extrato de carne e amido solúvel. Essa composição foi adotada tanto como meio de crescimento do pré-inóculo quanto como meio de fermentação na produção enzimática.

6.3.3. Otimização dos parâmetros de fermentação

Para o estudo da otimização dos parâmetros de fermentação foi realizado um planejamento experimental composto central, adotando-se como variáveis independentes: a) temperatura de fermentação; b) volume de meio de fermentação (em função da utilização permanente de frascos de erlenmeyer de 500ml); c) agitação do meio de cultivo (rpm); a variável dependente é unidade de atividade dextrinizante da enzima produzida (UAD/ml), medida de acordo com o item 5.1.5.2.1.

A composição do meio de fermentação adotada foi peptona (5 g/L), extrato de carne (3 g/L) e amido solúvel (5 g/L). Conforme o item anterior, manteve-se constante o volume transferido de pré-inóculo para os frascos de fermentação (igual a 10% do volume final do meio de produção de alfa-amilase).

O delineamento experimental na forma codificada e os respectivos resultados encontram-se na tabela 16, enquanto que os níveis de estudo das variáveis encontram-se na tabela 17.

A tabela 18 apresenta a análise de variância (ANOVA), baseada no teste da distribuição F e no cálculo do coeficiente de regressão (R^2). O valor de F calculado

foi comparado ao valor tabelado para uma distribuição F (5%), com os graus de liberdade também expressos na tabela 18. Verificou-se que F calculado é 5 vezes maior que o valor tabelado, indicando que a regressão é significativa e preditiva ao nível de 95% de confiança. O coeficiente de correlação (R^2) foi calculado a partir dos valores de soma quadrática (tabela 18). O valor de R^2 igual a 0,95 mostra que o modelo proposto está bastante ajustado aos resultados experimentais.

Ensaio	Temperatura (°C)	Volume (ml)	Agitação (rpm)	UAD (mg amido hidrolisado/ml)
1	-1	-1	-1	8.68
2	+1	-1	-1	6.54
3	-1	+1	-1	8.35
4	+1	+1	-1	3.06
5	-1	-1	+1	8.27
6	+1	-1	+1	8.50
7	-1	+1	+1	7.46
8	+1	+1	+1	8.38
9	-1,68	0	0	4.43
10	+1,68	0	0	7.00
11	0	-1,68	0	9.75
12	0	+1,68	0	8.61
13	0	0	-1,68	7.82
14	0	0	+1,68	6.78
15	0	0	0	9.76
16	0	0	0	9.70
17	0	0	0	9.70

Tabela 16: Planejamento experimental composto central codificado para estudo da otimização dos parâmetros de fermentação

Nível	-1,68	-1	0	1	1,68
Temperatura (°C)	26,6	30	35	40	43,4
Volume (ml)	8	25	50	75	92
Agitação (rpm)	99,6	120	150	180	200,4

Tabela 17: Níveis e valores decodificados dos parâmetros de fermentação estudados no planejamento experimental

	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	Teste F (F _{calculado})	Teste F _{tabelado} (F _{0,95;9;8})
Regressão	54,912	9	6,10	16,85	3,39
Resíduos	2,894	8	0,362		
Falta de ajuste	2,877	5	0,575		
Erro puro	0,017	3	0,006		
Total	57,806	17			

Tabela 18: Análise da variância no estudo das condições de fermentação

Coefficiente de correlação (R^2) = $SQ_{REGRESSÃO}/SQ_{TOTAL} = 0,95$

A tabela 19 mostra o efeito das variáveis sobre a produção enzimática, correlacionada com o número de unidades de atividade dextrinizante (UAD/ml de enzima). Através da análise do fator p, observa-se que todos os fatores propostos apresentaram efeitos significativos sobre a produção enzimática. Entretanto, apenas a temperatura (parâmetro linear) e suas interações tanto com a agitação quanto com o volume de meio apresentaram efeitos positivos na produção

enzimática, enquanto as demais variáveis apresentaram efeito negativo. Esses resultados indicam que a alteração na temperatura de fermentação poderia acarretar ou em diminuição da produção da enzima ou na diminuição atividade hidrolítica, provavelmente em decorrência de desnaturação protéica.

A tabela 20 apresenta os coeficientes de regressão, desvios padrões e limites de confiança para a atividade hidrolítica, medida em Unidades de Atividade Dextrinizante por mililitro (UAD/ml).

	Efeito (UAD/ml)	Desvio Padrão	t(3)	P	Limite de confiança -95%	Limite de confiança +95%
Média*	9,68	0,04	256,77	1,30E-07	9,56	9,80
Temperatura (L)*	1,51	0,04	36,93	4,37E-05	1,38	1,64
Temperatura (Q)*	-2,75	0,04	-64,62	8,16E-06	-2,88	-2,61
Volume (L)*	-0,98	0,04	-23,86	0,0002	-1,11	-0,85
Volume (Q)*	-0,29	0,04	-6,88	0,0063	-0,43	-0,16
Agitação (L)*	-1,18	0,04	-28,78	9,21E-05	-1,31	-1,05
Agitação (Q)*	-1,63	0,04	-38,21	3,94E-05	-1,76	-1,49
1L x 2L*	0,72	0,05	13,49	0,0009	0,55	0,89
1L x 3L*	2,15	0,05	40,18	3,39E-05	1,98	2,32
2L x 3L*	-0,62	0,05	-11,52	0,0014	-0,79	-0,45

Tabela 19: Efeito das variáveis na produção enzimática, dada em função do número de unidades de atividade dextrinizante (UAD/ml de enzima)

* parâmetros estatisticamente significativos (95% de confiança)

(L) – parâmetro linear (Q) – parâmetro quadrático

	Coeficiente de regressão	Desvio Padrão	Limite de confiança -95%	Limite de confiança +95%
Média*	9,68	0,04	9,56	9,78
Temperatura (L)*	0,76	0,02	0,69	0,82
Temperatura (Q)*	-1,37	0,02	-1,44	-1,31
Volume (L)*	-0,49	0,02	-0,55	-0,42
Volume (Q)*	-0,15	0,02	-0,21	-0,08
Agitação (L)*	-0,59	0,02	-0,65	-0,52
Agitação (Q)*	-0,81	0,02	-0,88	-0,75
1L x 2L*	0,36	0,03	0,28	0,45
1L x 3L*	1,07	0,03	0,99	1,16
2L x 3L*	-0,31	0,03	-0,39	-0,22

Tabela 20: Coeficientes de regressão, desvio padrão e limites de confiança no estudo do delineamento estatístico proposto

* parâmetros estatisticamente significativos

A modelagem para o ajuste de um polinômio de segundo grau que descrevesse o processo de estudo obteve a equação abaixo. Essa equação representa a resposta da atividade hidrolítica dextrinizante em função das condições de fermentação e descreve as superfícies de resposta e curvas de contorno.

$$\text{UAD/ml} = 9,68 + 0,76.\text{Temp} - 1,37.\text{Temp}^2 - 0,49.\text{Vol} - 0,15.\text{Vol}^2 - 0,59.\text{Agit} - 0,81.\text{Agit}^2 + 0,36.\text{Temp}.\text{Vol} + 1,07.\text{Temp}.\text{Agit} - 0,31.\text{Vol}.\text{Agit}$$

A figura 13 ilustra o gráfico de relação entre os valores experimentais obtidos e os valores previstos. A boa distribuição dos valores ao longo da reta evidencia o pequeno desvio entre o delineamento proposto e os resultados obtidos, mostrando que o planejamento foi realizado satisfatoriamente.

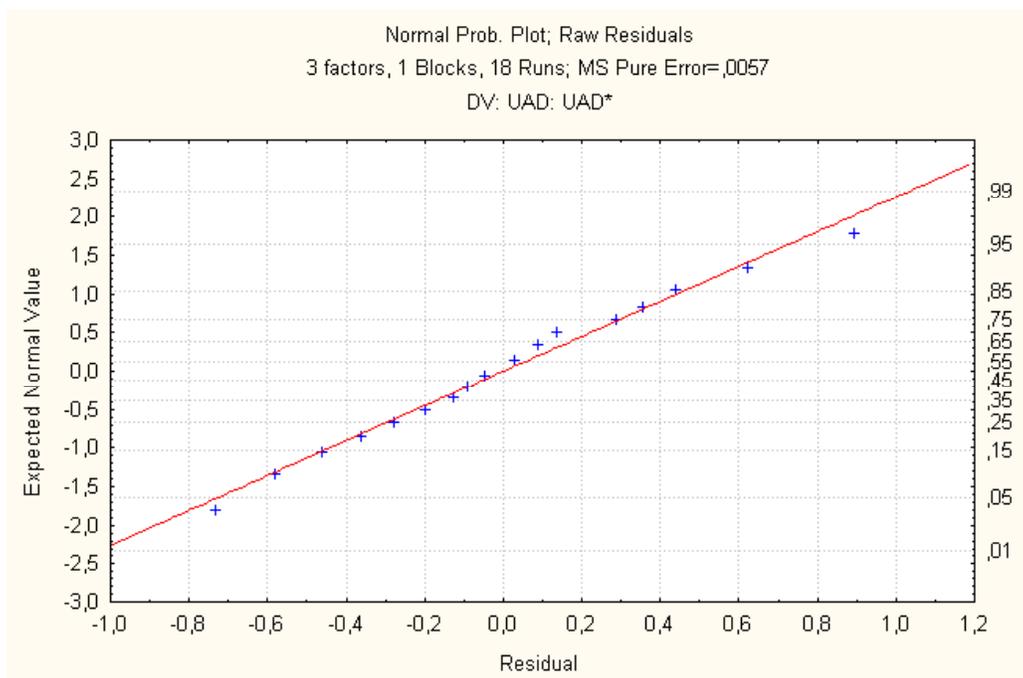


Figura 13: Valores observados experimentalmente x valores previstos pelo modelo proposto

As figuras 14, 15 e 16 ilustram as superfícies de resposta e as curvas de contorno referentes ao delineamento experimental proposto às condições de fermentação. As respostas foram analisadas em função da atividade hidrolítica da enzima produzida (UAD/ml).

A figura 14 apresenta os efeitos das variáveis “volume de meio de fermentação” e “agitação rotatória”, quando mantida a temperatura de 35°C. As condições em que ocorrem os maiores valores de UAD/ml estão bem centralizadas em relação aos valores de agitação, em torno de 150 rpm. Observa-se no gráfico que a área marrom, referente à faixa de maiores UAD/ml, estende-se de volumes muito baixos – economicamente inviáveis – até aproximadamente 70 ml.

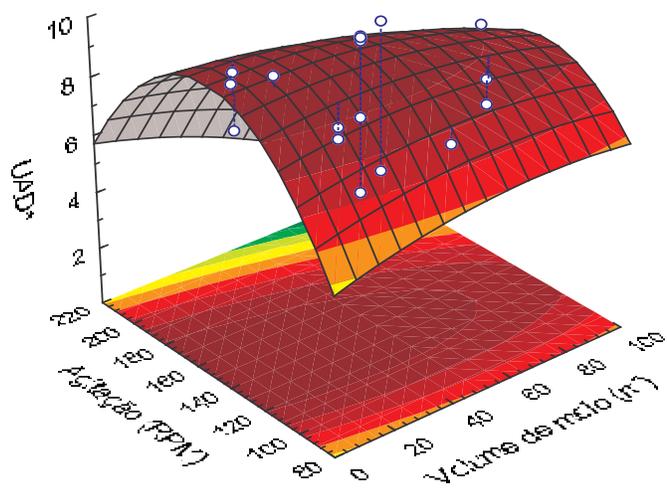
A figura 15 apresenta os efeitos das variáveis “temperatura” e “volume de meio de fermentação”, quando utilizado o agitador rotatório em 150 rpm. As condições em que ocorrem os maiores valores de UAD/ml estão bem centralizadas em relação aos valores de temperatura, em torno de 35°C. A análise da variação do volume de meio segue o padrão ajustado na figura 14, permitindo a utilização de volume de até 70 ml, sem detrimento da intensidade hidrolítica.

A figura 16 apresenta os efeitos das variáveis “temperatura” e “agitação rotatória”, quando utilizado o volume de meio de fermentação de 50 ml. As condições em que ocorrem os maiores valores de UAD/ml estão bem centralizadas em relação a ambos os eixos, em torno dos valores de 120 a 180 rpm e temperatura de 32 a 40°C.

Desta forma, as condições ótimas de produção de alfa-amilase com alta atividade hidrolítica foram estabelecidas em temperatura de 35°C, volume de meio

de fermentação de 50 ml e agitação de 150 rpm, nas condições de meio de cultivo determinadas.

(a)



(b)

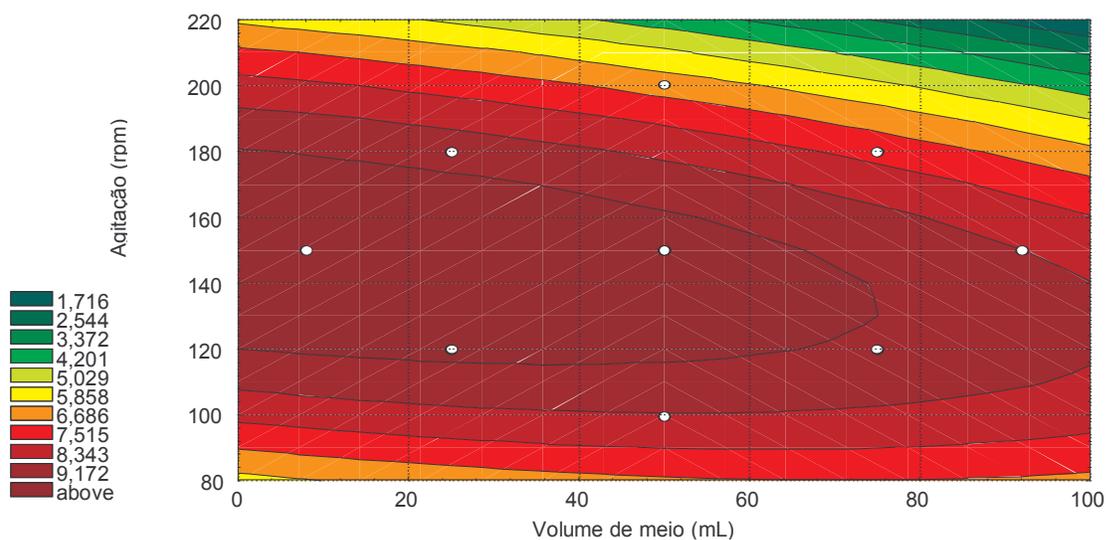


Figura 14: Efeito dos parâmetros volume de meio de fermentação (ml) e agitação (rpm) na atividade hidrolítica da enzima produzida a 35°C.

(a) Superfície de resposta

(b) Curva de contorno

*UAD – Unidades de atividade dextrinizante/ml enzima

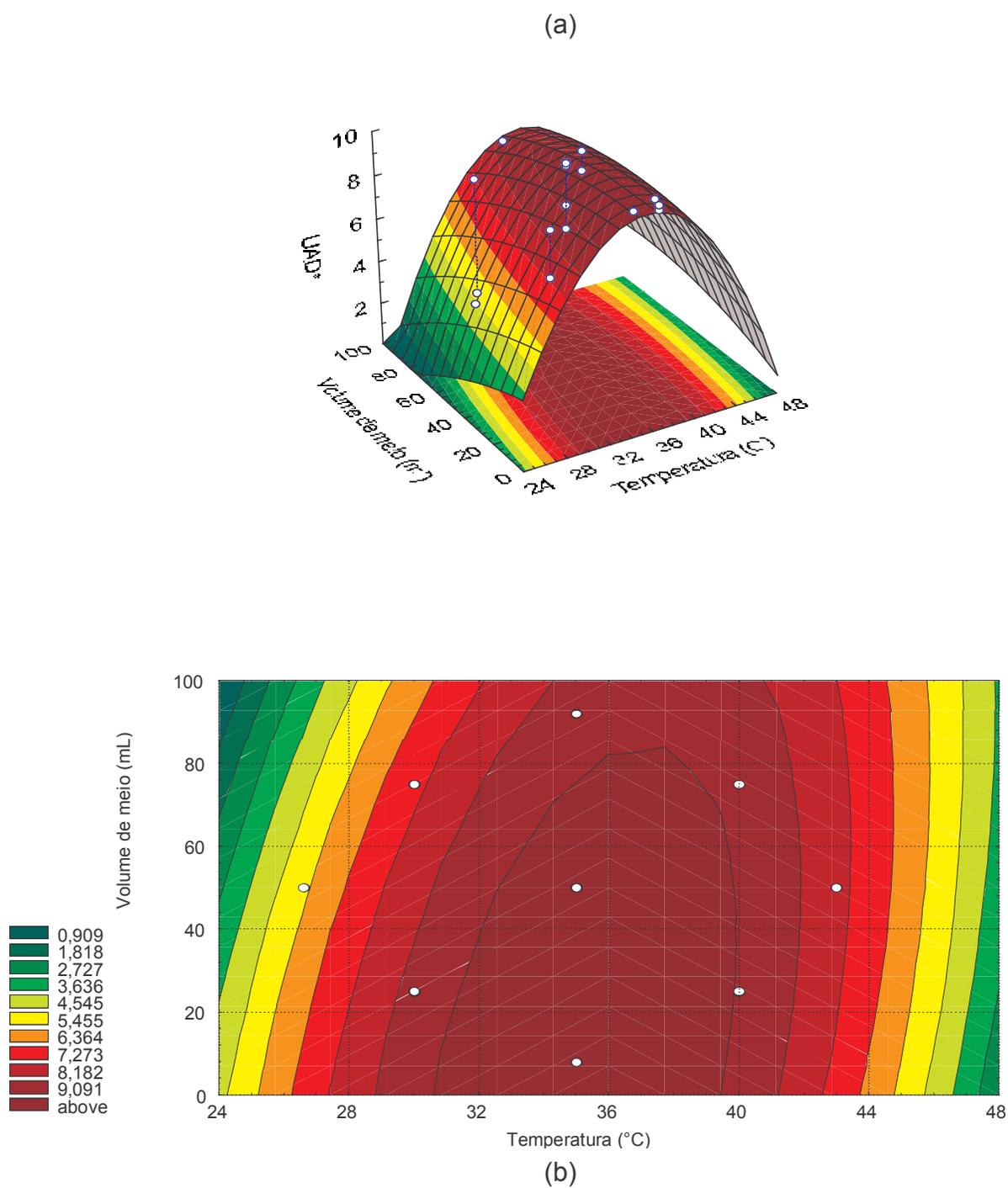


Figura 15: Efeito dos parâmetros temperatura ($^{\circ}\text{C}$) e volume de meio de fermentação (ml) na atividade hidrolítica da enzima produzida sob agitação de 150 rpm.

(a) Superfície de resposta

(b) Curva de contorno

*UAD – Unidades de atividade dextrinizante/ml enzima

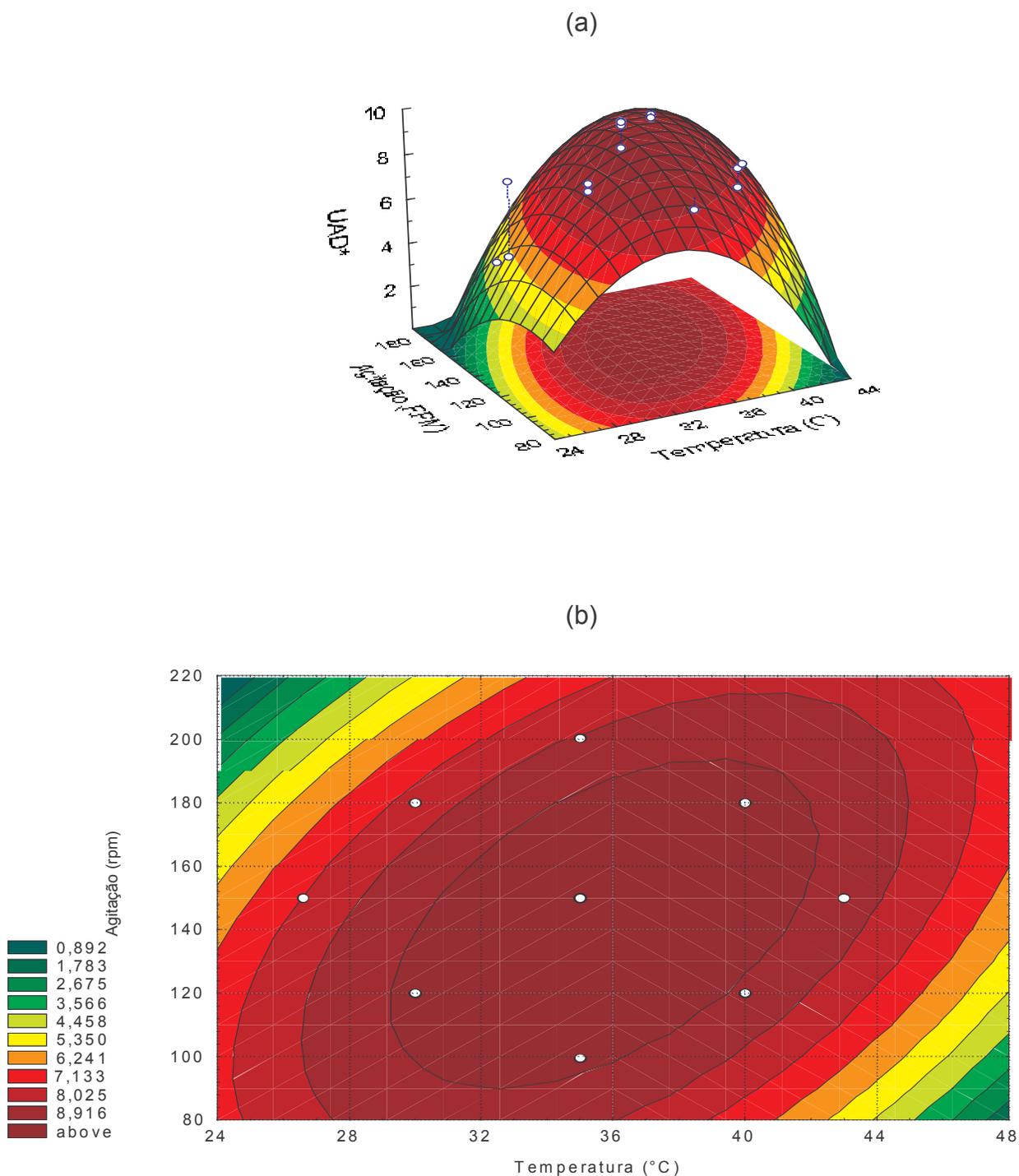


Figura 16: Efeito dos parâmetros temperatura (C) e agitação (RPM) na atividade hidrolítica da enzima produzida em 50 ml de meio de fermentação.

(a) Superfície de resposta

(b) Curva de contorno

*UAD – Unidades de atividade dextrinizante/ml enzima

6.3.4. Produção de alfa-amilase (Enzima bruta)

A produção de alfa-amilase realizou-se em Erlenmeyers de 500 ml, com 50 ml de meio de fermentação (composto por 3 g/L de extrato de carne, 5 g/L de peptona e 5 g/L de amido solúvel), com pH acertado para 7 com NaOH 1M ou HCl 1M, antes da esterilização.

Conforme determinado no item 5.3.3., utilizou-se a temperatura de fermentação de 35°C e agitação de 150 rotações por minuto (rpm).

6.3.4.1. Cinética de produção de alfa-amilase

A cinética da produção enzimática foi monitorada durante 72 horas e, em intervalos regulares de tempo, foram analisados a concentração de unidades formadoras de colônia em volume (UFC/ml), o pH e a atividade hidrolítica dextrinizante (UAD/ml) – mesurados a 60°C, conforme metodologia descrita no item 5.1.5.2.1.

A cinética da produção de alfa-amilase pode ser expressa pela figura 17, em termos de crescimento bacteriano, da atividade hidrolítica da enzima e do pH da solução, em função do tempo de fermentação.

A análise da figura 17 demonstra que até o tempo de fermentação de 4 horas há grande crescimento microbiano, permanecendo este constante em $1,0 \times 10^9$ até praticamente 36 horas. A partir desse ponto, há uma diminuição do número de células bacterianas, atingindo um nível intermediário em $1,5 \times 10^8$ de UFC/ml.

Quanto à produção de alfa-amilase, esta figura revela que há grande aumento da atividade hidrolítica da enzima até aproximadamente 24 horas de fermentação, atingindo valores próximos a 10 UAD/ml e mantendo-se desta forma até 50 horas. À partir de 50 horas, há uma redução da atividade hidrolítica para 8,5 UAD/ml, mantendo-se assim constante até o final do intervalo de análise, em 72 horas.

Em relação ao pH, este gráfico mostra que não houve modificação significativa do pH do meio de fermentação, em função do crescimento microbiano e da produção de alfa-amilase, no intervalo de 48 horas, mantendo-se constante e próximo à neutralidade.

Essas análises evidenciam a possibilidade de realizar o processo fermentativo de produção de alfa-amilase por 48 horas, garantindo-se, assim, a obtenção de uma solução de aproximadamente 100% de atividade hidrolítica.

O fluxograma de produção e purificação da alfa-amilase do *Bacillus subtilis* está disposto na figura 18 e permite a visualização do esquema de trabalho adotado na pesquisa.

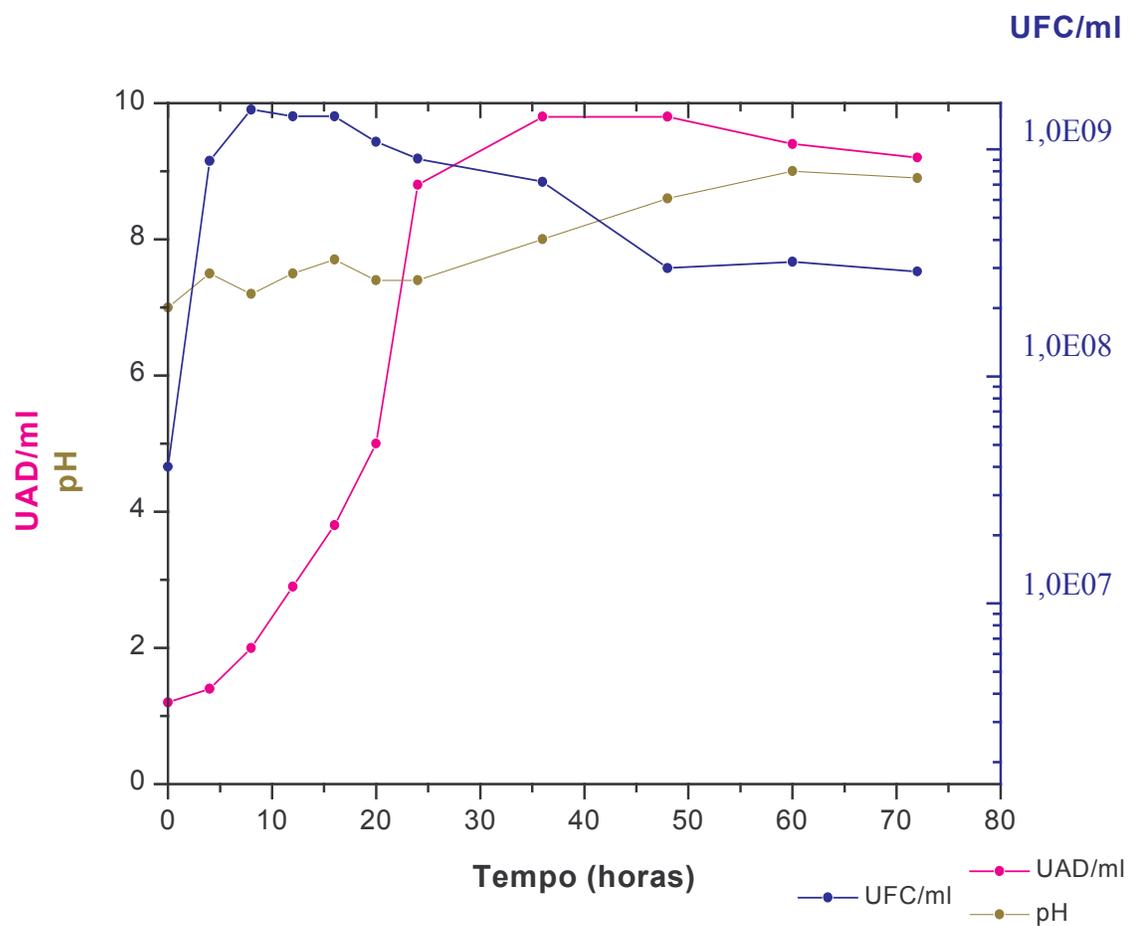


Figura 17: Cinética de crescimento e produção enzimática

UFC/ml – Unidades Formadoras de Colônia/ml

UAD/ml – Unidades de atividade dextrinizante/ml

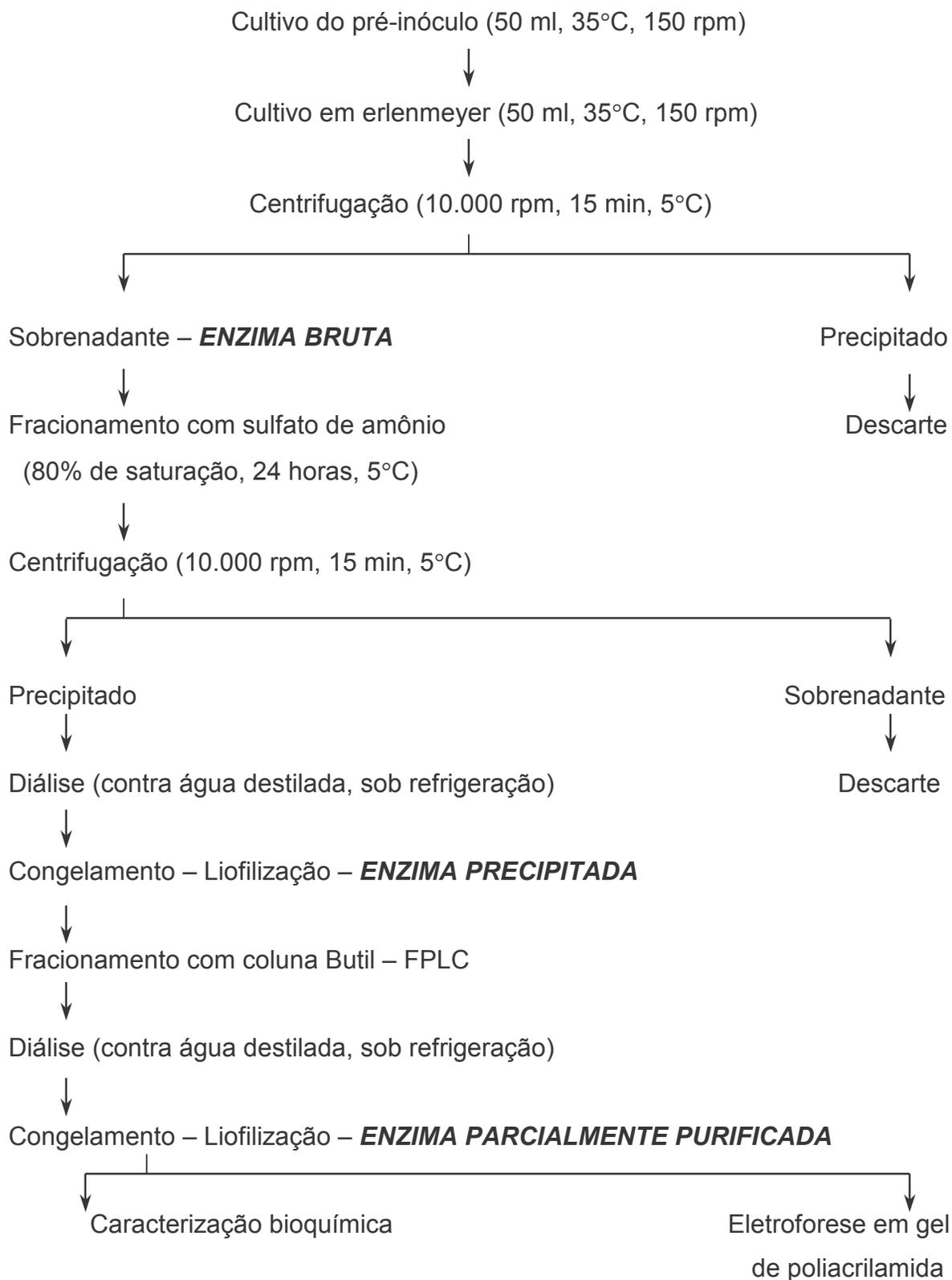


Figura 18: Fluxograma de produção, purificação e aplicação da alfa-amilase produzida pela linhagem 45-2B – *Bacillus subtilis*

6.4. Purificação de alfa-amilase

As etapas da purificação e metodologias seguiram a descrição do item 5.5.

A alfa-amilase da linhagem 45-2B, identificada como *Bacillus subtilis*, obtida após o fracionamento com sulfato de amônio e resuspensa em solução tampão fosfato de sódio 0,05M pH 6, foi filtrada e percolada em coluna de troca iônica DEAE-Sephadex equilibrada com a mesma solução tamponante. A enzima adsorvida na coluna foi eluída com solução tampão fosfato de sódio 0,05M pH 6 acrescida de NaCl 1M. Entretanto, para as condições de pH adotadas nas soluções (definidas como de maior atividade hidrolítica, segundo item 5.6.2.), não houve adsorção da alfa-amilase na resina aniônica, logo não foi possível utilizar essa metodologia na separação e purificação da enzima.

A enzima obtida na mesma etapa anterior – após fracionamento com sulfato de amônio – foi, então, resuspensa em solução tampão acrescida de sulfato de amônio 1M pH 7, filtrada e percolada em coluna cromatográfica com resina butil FF, equilibrada com solução tampão fosfato de sódio 0,05M pH 7 acrescido de sulfato de amônio 1M. A enzima adsorvida na resina foi eluída com tampão fosfato de sódio 0,05M pH 7. Frações de 1 ml foram coletadas a cada minuto e analisadas em relação à presença de alfa-amilase, segundo metodologia descrita no item 5.1.5.2.1.

A figura 19 ilustra o fracionamento da alfa-amilase em coluna cromatográfica enquanto a tabela 21 sumariza a purificação, nas três etapas de análise (enzima bruta, enzima precipitada e enzima parcialmente purificada). Após a etapa cromatográfica, a alfa-amilase foi purificada, aproximadamente, 10 vezes. Na figura 19, os tubos que apresentaram atividade hidrolítica (5 a 8) foram

circulados. Essas frações foram reunidas numa solução total de 600 ml, sendo posteriormente dialisada contra água destilada, sob refrigeração, durante 72 horas e, então congelada e liofilizada. Não foram coletadas outras frações com atividade hidrolítica sobre o amido detectável.

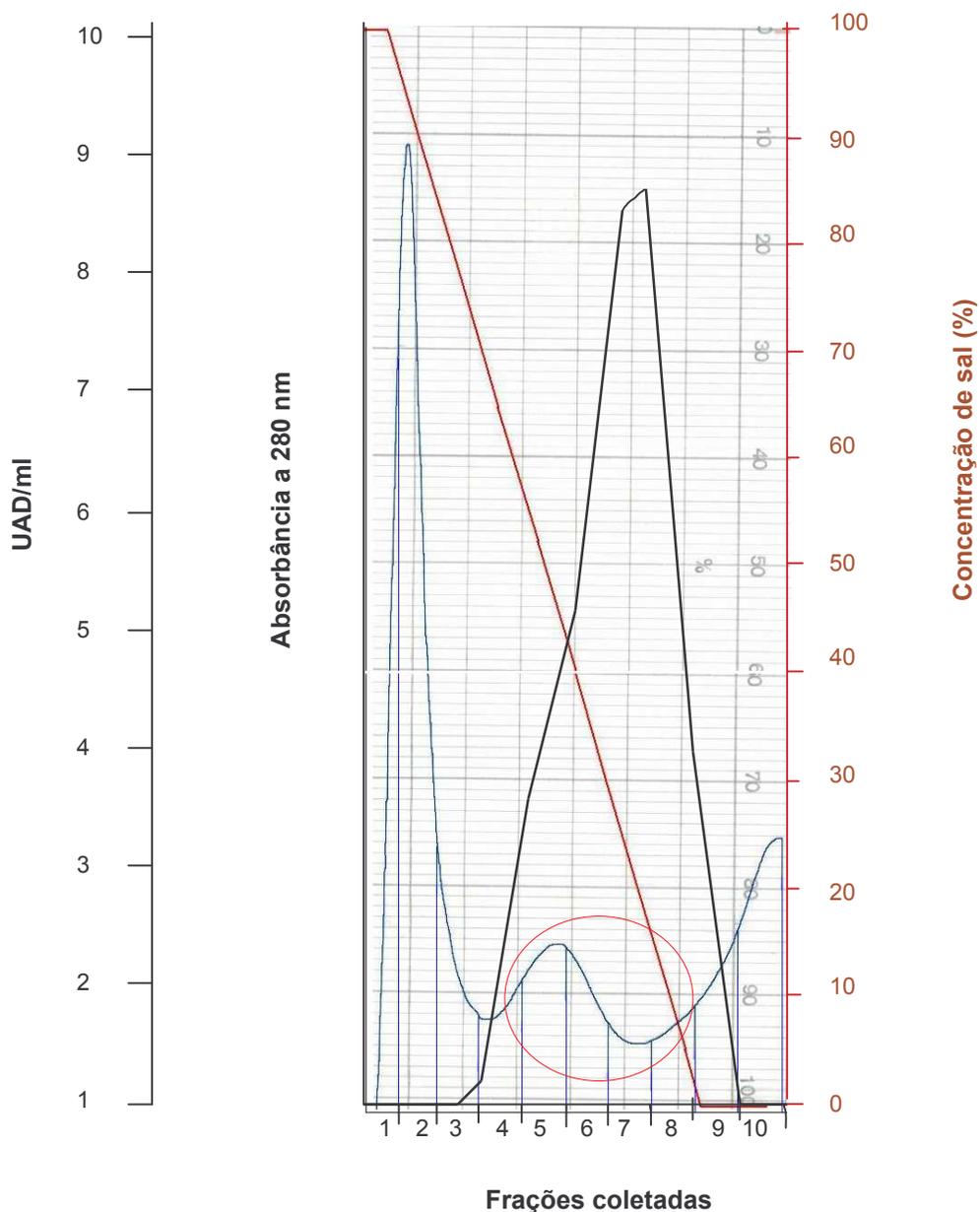


Figura 19: Cromatografia líquida de fase apolar ligada (butil) da alfa-amilase produzida pela linhagem 45-2B

Frações coletadas (5,6,7 e 8) de 1 ml com atividade hidrolítica (UAD/ml)

— Eluição de proteína

— Concentração de sal

— Atividade hidrolítica – UAD/ml – Unidades Atividade Dextrinizante/ml

6.4.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida

O extrato enzimático purificado, dialisado, liofilizado e resuspenso foi submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), de acordo com a metodologia citada no item 5.5.3. A figura 20 mostra o gel de eletroforese, após revelação com Comassie Blue G-250. As proteínas utilizadas como padrões de pesos moleculares foram dispostas na lateral da figura, na direção de suas respectivas frações, enquanto que as amostras de estudo, com concentrações de proteína iguais a 0,47 e 0,93% foram identificadas na parte superior da figura.

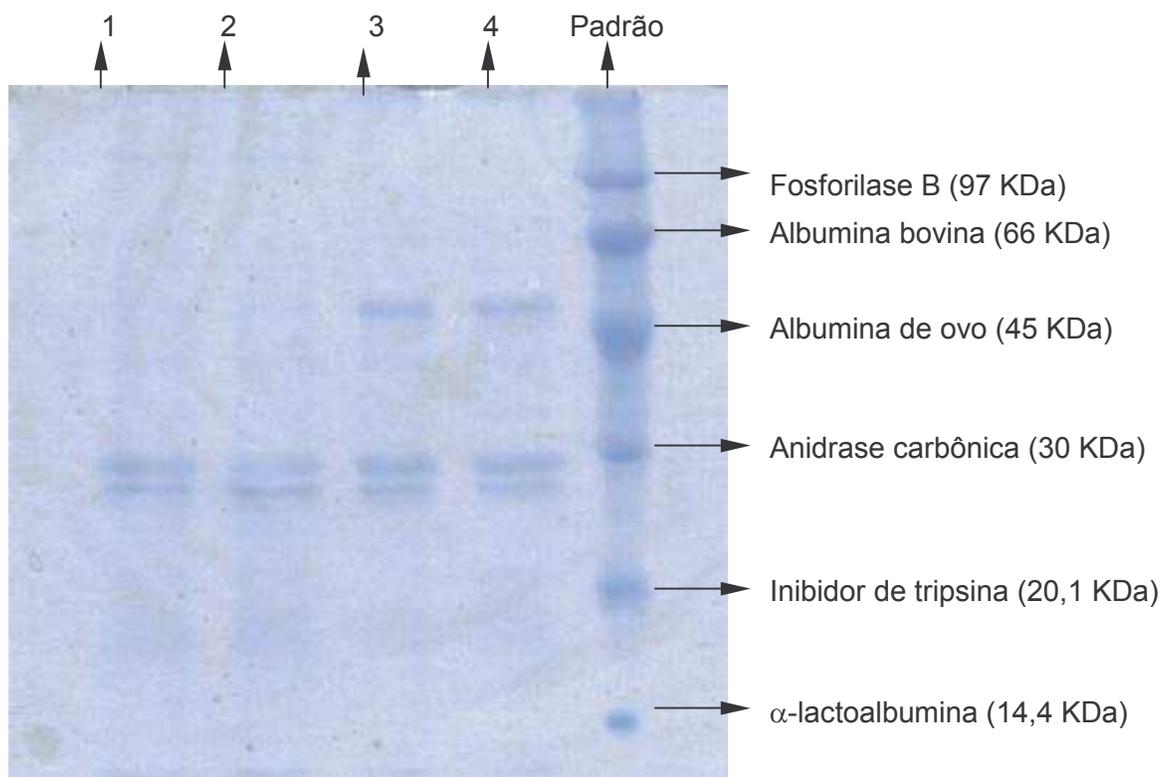


Figura 20: Gel de eletroforese

1 e 2: Amostra de 10 μ l da enzima em concentração de 0,47%;

3 e 4: Amostra de 10 μ l da enzima em concentração de 0,93%;

Padrão: Compostos de peso molecular conhecido, listados na direita da foto;

6.4.1.1. Permeação em gel de Sephadex G-200

A estimativa do peso molecular da enzima purificada foi realizada por filtração em gel de Sephadex G-200, utilizando-se proteínas com peso molecular conhecido como padrão, segundo metodologia descrita no item 5.6.5. O peso molecular da enzima foi estimado em 27,1 KDa.

A enzima apresenta-se 10 vezes mais pura em relação à enzima bruta, entretanto apresenta três frações protéicas evidenciadas na eletroforese em gel de poliacrilamida. Isto indica que a enzima em estudo foi parcialmente purificada com a metodologia proposta. Pela análise da permeação em gel de Sephadex estima-se que a alfa-amilase apresente peso molecular de 27,1 KDa, coincidente, assim, com a terceira fração protéica do gel de eletroforese.

Takasaki (1985) relata a purificação de alfa-amilase produzida por *Bacillus subtilis* G3 através de precipitação com sulfato de amônio (70%), seguida de fracionamentos em colunas DEAE-Sepharose (pH 7), G-Sephadex 100 (pH 7) e Sephadex 150 (pH 7), obtendo a fração enzimática 10,2 vezes mais purificada, com peso molecular de 25 KDa (estimado por eletroforese em gel de poliacrilamida), com rendimento de 16,3%. Uguru (1997) obteve bons resultados de purificação de alfa-amilase utilizando precipitação com sulfato de amônio (60%), fracionamento em colunas de DEAE-Sephadex e G-Sephadex 100 (ambos pH 8). Com rendimento de 10%, a fração apresentou-se 24 vezes mais purificada e com peso molecular estimado em 56 KDa.

Conforme analisado anteriormente, as alfa-amilases produzidas por microrganismos apresentam pesos moleculares de 22,5 a 140 KDa, dependendo da linhagem produtora (Salva, 1990; Lévêque *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 1994;

Uguru *et al.*, 1997; Kichakova *et al.*, 1998; Ikawa *et al.* 1998; Nishimura *et al.*, 1994; Hayashida *et al.*, 1988, Hamilton *et al.*, 1998). Em especial, o trabalho desenvolvido por Takasaki *et al.* (1985) apresenta a alfa-amilase produzida por *Bacillus subtilis* G3 com peso molecular 25 KDa (estimado por eletroforese em gel) e o artigo de Zhang *et al.* (1994) relata a alfa-amilase produzida pelo *B. licheniformis* CUMC 305 com peso molecular de 28 KDa, assemelhando-se aos resultados obtidos no presente trabalho.

	Volume (ml)	Atividade Hidrolítica ^{*1}	Teor de proteína ^{*2} (mg/ml)	Unidade de atividade total (UAD/min)	Proteína total (mg)	Atividade específica ^{*3}	Purificação	% Recuperação
Extrato Bruto	1000	9.84	4.67	9840.00	4670.00	2.11	1.00	100.00
Enzima Precipitada	240	9.01	1.72	2162.40	412.80	5.24	2.49	21.98
Enzima Parcialmente Purificada	37.3	9.94	0.47	370.76	17.53	21.15	10.04	3.77

Tabela 21: Etapas na purificação da alfa-amilase produzida pela linhagem 45-2B

Análises de atividade hidrolítica realizadas a 70°C e pH 6

^{*1} – Unidade de Atividade hidrolítica: mg de amido hidrolisado/minuto/ml de enzima^{*2} – Teor de proteína – definido segundo item 5.6.1.^{*3} – Unidade de atividade específica: UAD/min/mg proteína

6.5. Caracterização da alfa-amilase bruta e parcialmente purificada produzida pelo *Bacillus subtilis*

A caracterização do efeito da temperatura e do pH sobre a atividade hidrolítica foi realizada segundo metodologia descrita no item 5.6.2. As frações enzimáticas bruta e parcialmente purificada foram analisadas quanto à atividade hidrolítica segundo metodologia descrita no item 5.1.5.2.1., referente à atividade dextrinizante (dada em UAD/ml) e no item 5.1.5.2.2., referente à atividade sacarificante (dada em mg maltose/minuto/mg proteína).

6.5.1. Caracterização da alfa-amilase bruta produzida pelo *Bacillus subtilis*

A fração enzimática obtida de acordo com o item 5.3.4., chamada enzima bruta, teve a concentração de proteína estimada em 4,67 mg proteína/ml.

A temperatura de 70°C e pH 6 foram considerados ótimos para esta fração enzimática, apresentando atividade dextrinizante de 9,84 mg amido hidrolisado/minuto e atividade sacarificante de 81,9 mg maltose liberada/minuto.

De acordo com a figura 21, referente ao efeito da temperatura e do pH sobre a atividade hidrolítica da enzima bruta, os maiores valores de atividade estão relacionados com a faixa de pH entre 5 e 6, nas temperaturas de 50 a 80°C. Esta faixa, referente a aproximadamente 100% de atividade hidrolítica, pode ser estendida ao pH 7, com redução da temperatura máxima para 70°C.

A atividade hidrolítica na temperatura de 90°C foi ligeiramente maior em soluções de pH 5, em comparação com as de pH 6. Na temperatura de 100°C

houve grande redução da atividade, aproximando-se de 1 UAD/ml, em todas faixas de pH.

Pela análise do mesmo gráfico ficou evidenciado que soluções em pHs de 3, 4, 8 e 9 não foram apropriados para atividade hidrolítica nem da enzima bruta e nem da enzima purificada.

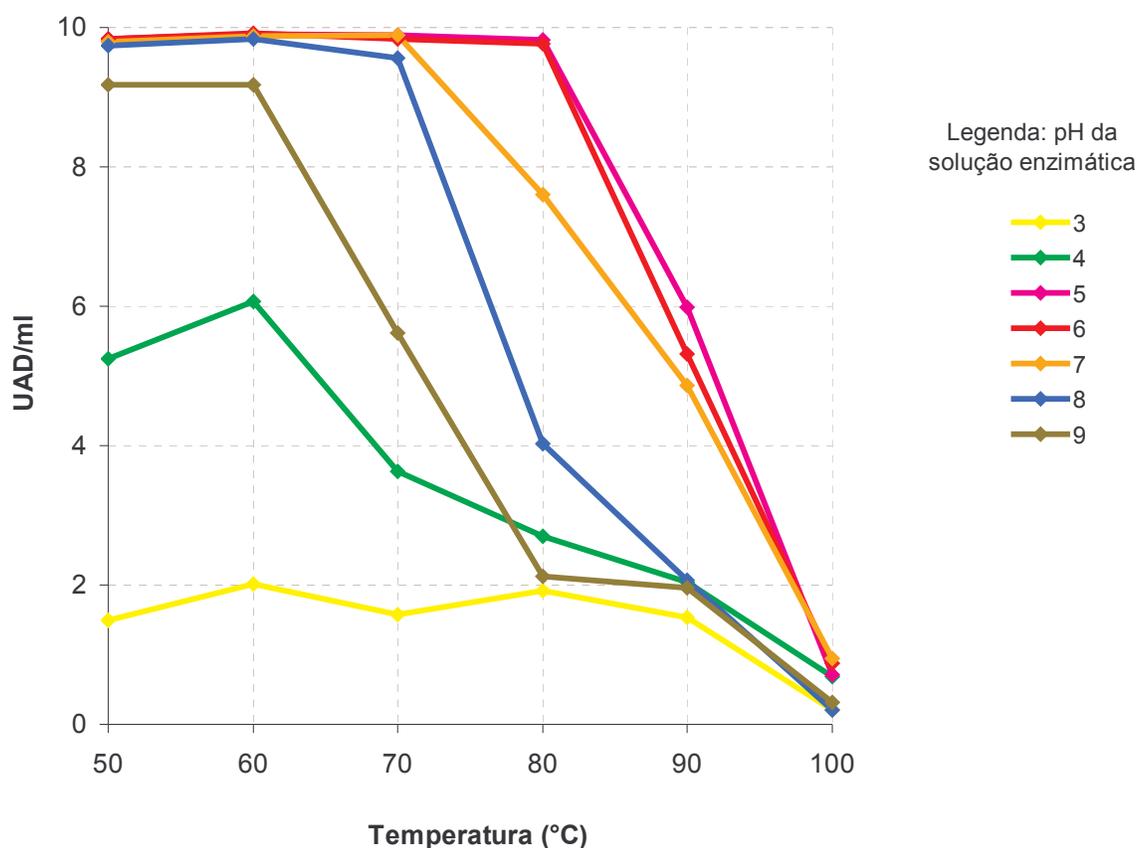


Figura 21: Efeito da temperatura e do pH sobre a atividade dextrinizante da alfa-amilase bruta produzida pelo *Bacillus subtilis* – sem adição de CaCl_2

UAD – Unidade de Atividade Dextrinizante (mg amido hidrolisado/minuto) por ml de enzima

6.5.2. Caracterização da alfa-amilase parcialmente purificada produzida pelo *Bacillus subtilis*

A fração enzimática obtida de acordo com o item 5.5.2., chamada enzima parcialmente purificada, teve a concentração de proteína estimada em 0,46 mg proteína/ml. A figura 22 mostra que a temperatura de 70°C e pH 6 podem ser considerados ótimos para esta fração enzimática, apresentando atividade dextrinizante de 9,94 mg amido hidrolisado/minuto e atividade sacarificante de 76,2 mg maltose liberada por minuto.

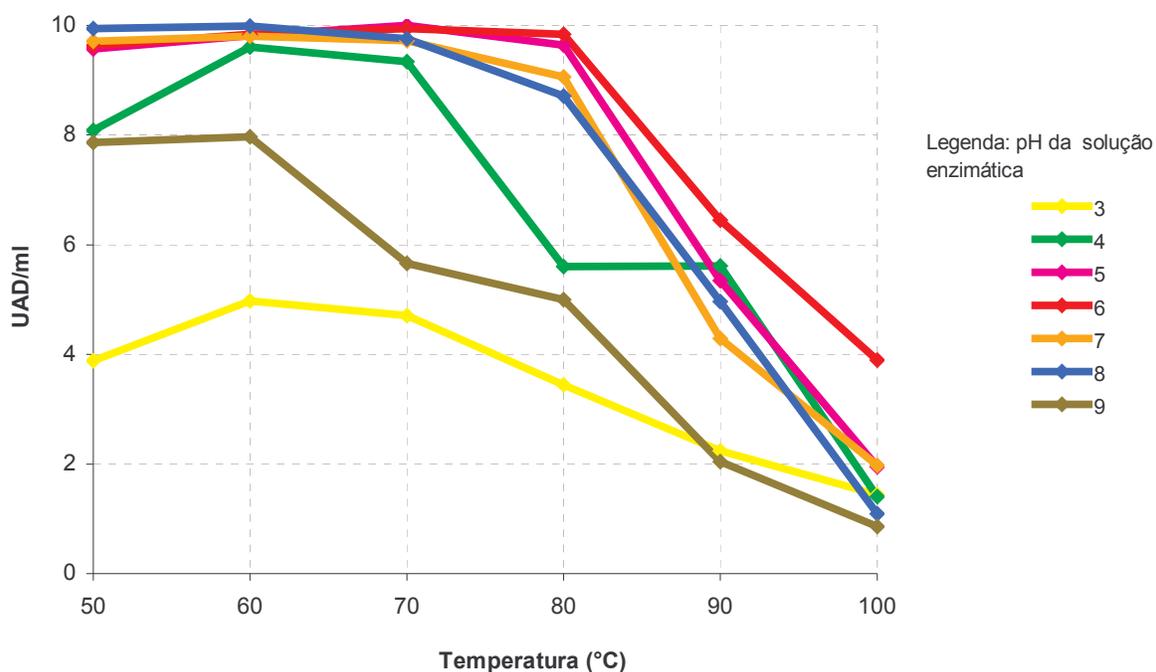


Figura 22: Efeito da temperatura e do pH sobre a atividade dextrinizante da alfa-amilase parcialmente purificada produzida pelo *Bacillus subtilis* – sem adição de CaCl_2

UAD – Unidades de Atividade Dextrinizante - mg de amido hidrolisado/minuto por ml de enzima

A análise das figuras 25 e 27, referentes à enzima purificada, evidenciam que não houve elevação significativa dos valores de atividade hidrolítica apesar da purificação parcial da enzima. Entretanto, essa conclusão é alterada quando analisa-se a atividade hidrolítica de ambas frações em função da concentração de proteínas (figura 29).

6.5.3. Efeito da presença de íons Ca^{2+} sobre a atividade enzimática

O estudo do efeito da presença de íons cálcio sobre a atividade enzimática foi realizado nas frações enzimáticas bruta e purificada, de acordo com metodologia descrita no item 5.6.3.

As frações enzimáticas foram analisadas quanto à atividade hidrolítica segundo metodologia descrita no item 5.1.5.2.1., referente à atividade dextrinizante (dada em UAD/ml) e no item 5.1.5.2.2., referente à atividade sacarificante (dada em mg maltose/minuto/mg proteína).

Analisando as figuras 23 e 24, referentes às enzimas bruta e purificada com acréscimo de íons Ca^{2+} , conclui-se que tais íons apresentam efeito limitado sobre a atividade hidrolítica, representando aumento pequeno na atividade das enzimas em solução tamponante de pHs 5 e 6, em altas temperatura (90 e 100°C). Isto leva à conclusão de que a presença de cálcio não influencia significativamente a atividade hidrolítica, restando averiguar seu efeito sobre a estabilidade térmica desta enzima quando sob altas temperaturas (efeito analisado no item 5.5.4.).

O mesmo efeito pode ser comprovado nas figuras seguintes, relacionando as enzimas bruta e purificadas, com e sem íons cálcio, em função do pH ótimo 6 (figuras 26) e em função da temperatura ótima 70°C (figura 28). A figura 29

apresenta o efeito da presença de íons cálcio nas frações bruta e parcialmente purificada, analisado em atividade sacarificante, mostrando a pequena influência destes íons na atividade hidrolítica da enzima.

6.5.4. Determinação da termoestabilidade da enzima

O estudo da estabilidade térmica da enzima foi realizado de acordo com metodologia proposta pelo item 5.6.4. utilizando-se apenas a enzima bruta, na presença/ausência de íons cálcio. As análises de termoestabilidade foram realizadas com a enzima bruta na ausência de substrato.

As figuras 30 e 31 mostram o declínio da atividade hidrolítica em função do tempo de incubação, nas temperaturas de 50 a 90°C. A temperatura de 100°C apresentou atividade apenas nos 5 minutos iniciais (em ambas figuras), não sendo, portanto, plotada nos gráficos.

Na temperatura de 50°C, a enzima manteve atividade de praticamente 100% por 8 horas, tanto na ausência quanto na presença de íons cálcio. É provável que os íons cálcio tenham efetivamente influenciado na termoestabilidade da enzima, uma vez que, na temperatura de 60°C a enzima tenha permanecido com aproximadamente 90% de atividade após 90 minutos de incubação, ao contrário do ocorrido quando na ausência de cálcio. Da mesma forma, a enzima incubada nas temperaturas de 70, 80 e 90°C apresentou atividade hidrolítica por mais tempo quando acrescida de íons cálcio.

A tabela 22 compara publicações sobre a produção de alfa-amilase pelo gênero *Bacillus*, analisando as condições de temperatura e de pH considerados ótimos e de estabilidade e respectivos pesos moleculares das enzimas. Algumas

citações aparecem incompletas, mas vale a referência e registro de pesquisa e uso de tais microrganismos produtores de alfa-amilase.

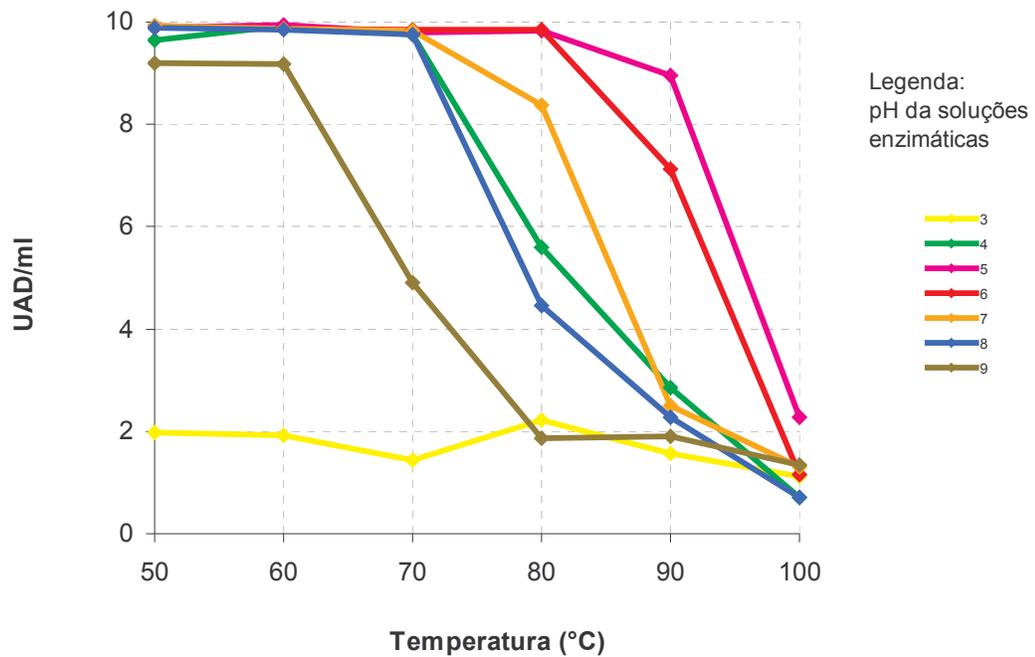


Figura 23: Efeito da temperatura e do pH sobre a atividade hidrolítica da alfa-amilase bruta produzida pelo *Bacillus subtilis* com adição de CaCl_2

UAD – unidade de atividade dextrinizante – mg de amido hidrolisado/minuto por ml de enzima

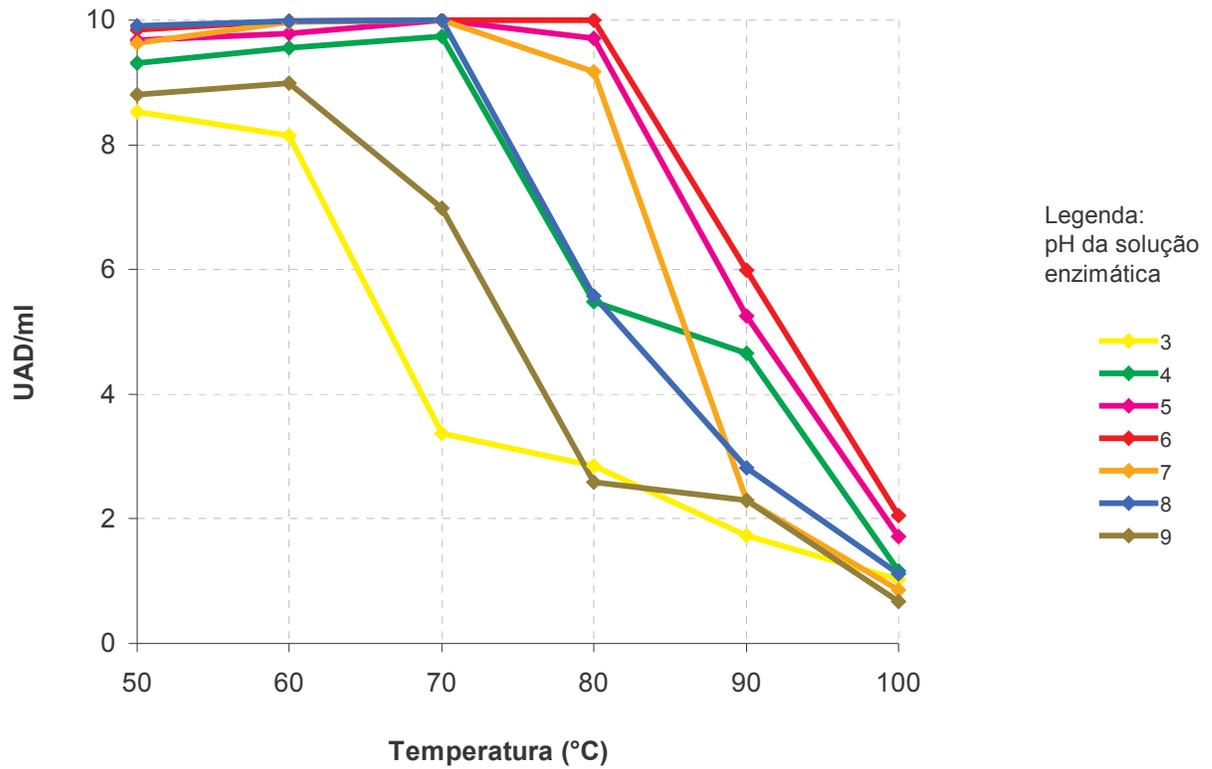


Figura 24: Efeito da temperatura e do pH sobre a atividade hidrolítica da alfa-amilase parcialmente purificada produzida pelo *Bacillus subtilis* com adição de CaCl_2
UAD – Unidades de Atividade Dextrinizante - mg de amido hidrolisado/minuto por ml de enzima

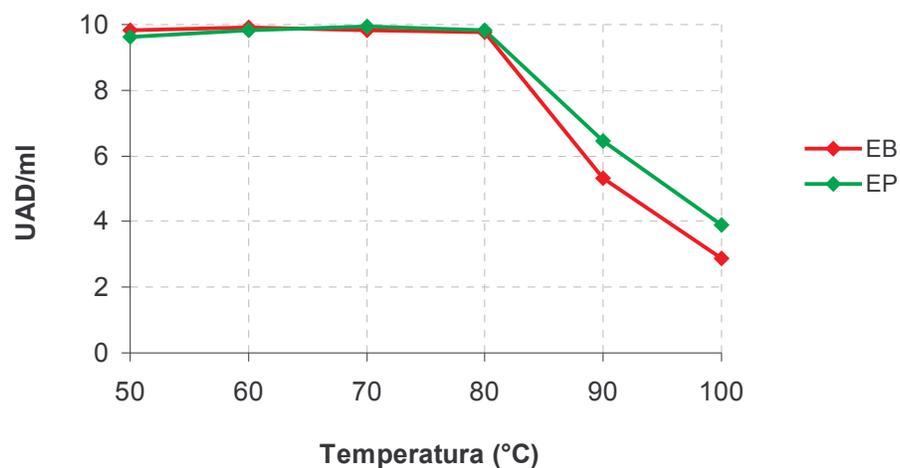


Figura 25: Comparação da atividade hidrolítica entre as alfa-amilase bruta e parcialmente purificada, em pH 6, sem adição de CaCl_2

UAD – Unidades de Atividade Dextrinizante - mg de amido hidrolisado/minuto por ml de enzima

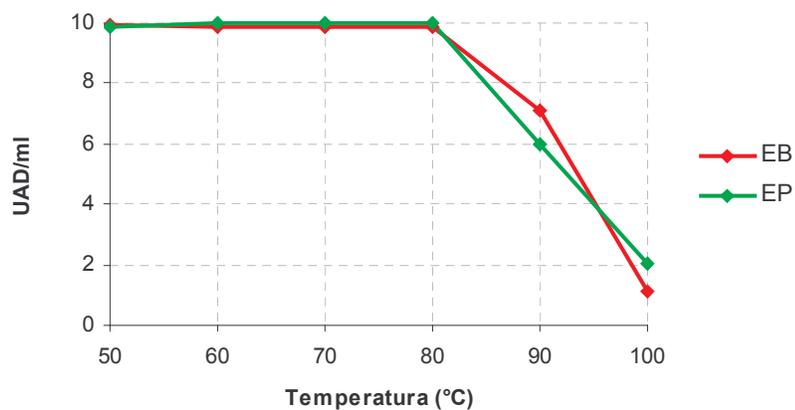


Figura 26: Comparação da atividade hidrolítica entre as alfa-amilase bruta e parcialmente purificada, em pH 6, com adição de CaCl_2

UAD – Unidades de Atividade Dextrinizante - mg de amido hidrolisado/minuto por ml de enzima

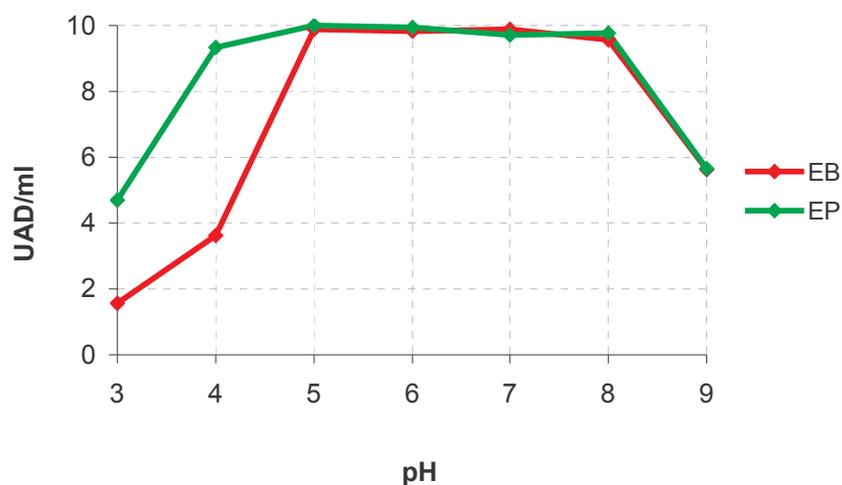


Figura 27: Comparação da atividade hidrolítica entre as alfa-amilases bruta e parcialmente purificada, na temperatura de 70°C, sem adição de CaCl_2

UAD – Unidades de Atividade Dextrinizante - mg de amido hidrolisado/minuto por ml de enzima

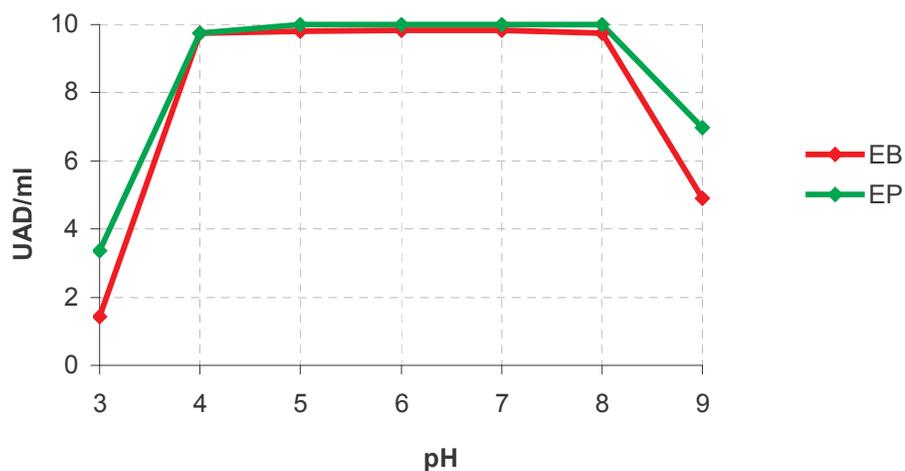


Figura 28: Comparação da atividade hidrolítica entre as alfa-amilases bruta e parcialmente purificada, na temperatura de 70°C, com adição de CaCl_2

UAD – Unidades de Atividade Dextrinizante - mg de amido hidrolisado/minuto por ml de enzima

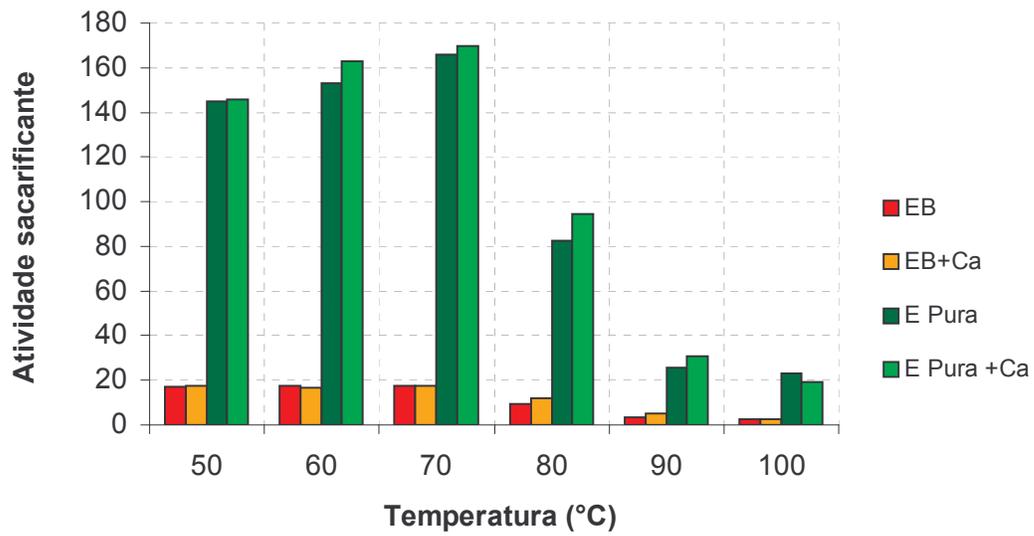


Figura 29: Efeito da presença/ausência de 20 mM de CaCl_2 na alfa-amilase bruta e parcialmente purificada produzida pelo *Bacillus subtilis*, em pH 6, em termos de atividade sacarificante

Atividade sacarificante – mg maltose/mg proteína/minuto

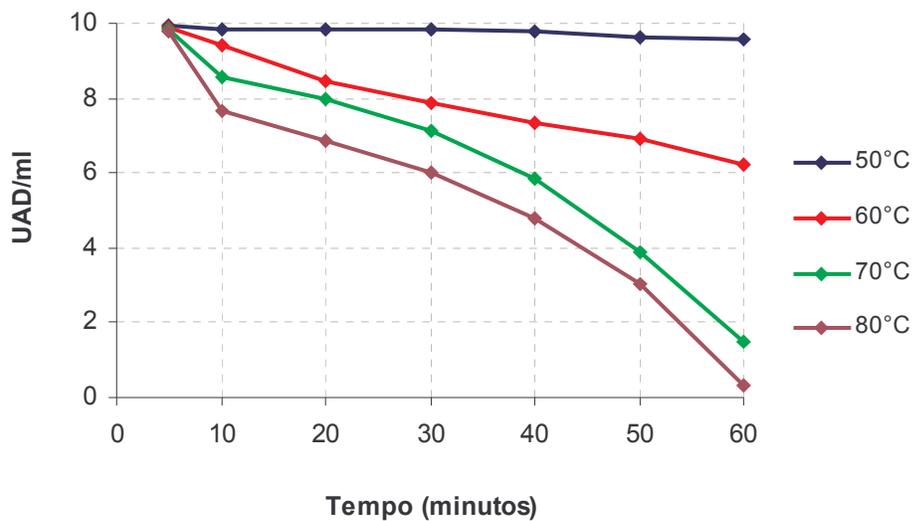


Figura 30: Efeito da temperatura sobre a atividade hidrolítica da alfa-amilase bruta produzida pelo *Bacillus subtilis* em função do tempo de incubação, sem adição de CaCl_2
Medição da atividade hidrolítica em 60°C

UAD – Unidades de Atividade Dextrinizante – Atividade hidrolítica residual

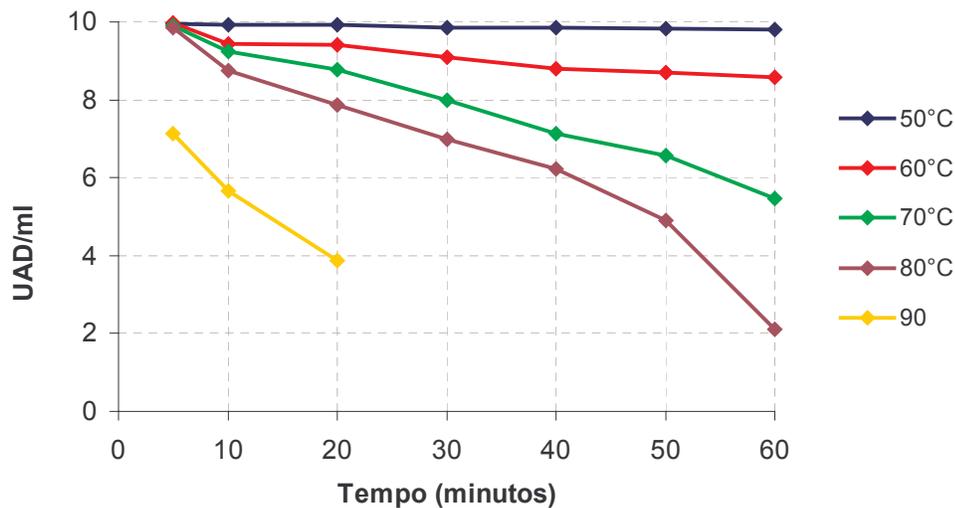


Figura 31: Efeito da temperatura sobre a atividade hidrolítica da alfa-amilase bruta produzida pelo *Bacillus subtilis* em função do tempo de incubação, com adição de CaCl_2
Medição da atividade hidrolítica em 60°C

UAD – Unidades de Atividade Dextrinizante – Atividade hidrolítica residual

Microrganismo	T _{ótimo} (°C)	T _{estabilidade} (°C)	pH _{ótimo}	Peso Molecular (KDa)	Referência
<i>B. subtilis</i> – Linhagem 45-2B	70 - 80	50 – 70	5 – 6	27,1	Presente trabalho
<i>B. subtilis</i>	90	-	8,5	-	Kichakova (1998)
<i>B. subtilis</i>	80	30 – 80	5,6	56	Uguru (1997)
<i>B. subtilis</i> X-23	60	40 – 60	6 – 7	54	Nishimura (1994)
<i>B. subtilis</i>	50	-	6 – 7	25	Takasaki (1985)
<i>B. subtilis</i> 65	60	-	6	68	Hayashida (1988)
	-	-	-	-	Kichakova (1998)
<i>B. stearothermophilus</i>	70 – 80	-	5-6	-	Zhang (1994)
	80	-	6,9	59	Zhang (1994)
	75	90°C	6,5	48	Suvd (2001)
<i>B. licheniformis</i> NCIB 6346	-	-	-	-	Kichakova (1998)
<i>B. licheniformis</i>	-	-	-	-	Uguru (1997)
<i>B. licheniformis</i> CUMC 305	90	-	9	28	Zhang (1994)
<i>B. licheniformis</i>	70 – 90	-	7	62,5	Zhang (1994)
<i>B. licheniformis</i> TCRDC-B13	90	-	5,5 – 10	-	Bajpai (1989)
<i>B. licheniformis</i>	>85	-	5 – 6	-	Shetty (1998)
<i>B. licheniformis</i>	90	90°C	6,5	-	Suvd (2001)
<i>B. thermooleovorans</i> NP54	100	100°C	8	-	Malhotra (2000)
	-	-	-	-	Uguru (1997)
<i>B. amyloliquefaciens</i>	-	-	-	-	Sarikaya (2000)
	60	90°C	6,5	-	Suvd (2001)
<i>Bacillus</i> sp. KSM1378	55-60	-	8	53	Ikawa (1998)
<i>Bacillus</i> sp WN11	75-80	-	5,5	76 – 53	Mamo (1999)
<i>Bacillus</i> sp IMD 134	-	-	6	69,2	Hamilton (1998)
<i>Bacillus</i> sp JF2	90	-	5,5	140	Zhang (1994)
<i>Bacillus</i> sp JF2	85 – 90	-	5	110	Zhang (1994)
<i>B. acidocaldarius</i>	70	-	3,5	66	Kanno (1986)

Tabela 22: Caracterização das alfa-amilase produzidas pelos microrganismos do gênero *Bacillus*

Notação (-) – refere-se a dados não mencionados pelos autores

6.6. Produtos da ação hidrolítica da alfa-amilase sobre o amido

A hidrólise de diferentes tipos de amido (batata, mandioca, milho e trigo) foi realizada segundo a metodologia descrita no item 5.7. As soluções foram monitoradas no período de 12 horas, sendo analisadas quanto à concentração de açúcares redutores (em função de curva padrão baseada em maltose), por cromatografia descendente em papel e por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

A figura 32 mostra o aumento da concentração de açúcares redutores, em função de maltose, referentes à hidrólise dos quatro tipos de amido, analisados em 4, 6, 8, 10 e 12 horas. Pode-se concluir, analisando esta figura, que a ordem decrescente de hidrólise dos grânulos de amido é milho, mandioca, batata e trigo. Hamilton (1998) relata que o grânulo do amido de milho é o mais susceptível ao ataque pela alfa-amilase do *Bacillus sp.* IMD 434, seguido dos grânulos de amido de arroz, trigo e batata.

Sarikaya (2000) explica que a forma/estrutura dos grânulos do amido e sua concentração são fundamentais para a efetiva ação enzimática e, por essa razão, há diferentes rendimentos hidrolíticos de uma mesma enzima quando aplicada em amidos de diferentes fontes.

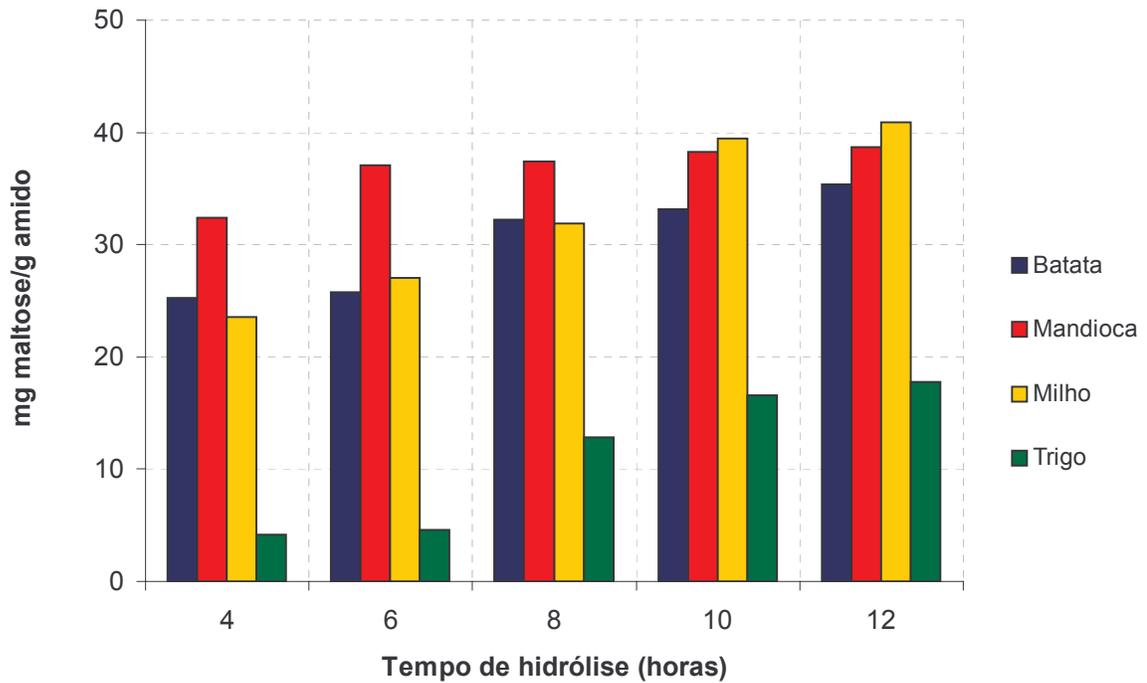


Figura 32: Comparação da ação hidrolítica da alfa-amilase produzida pelo *Bacillus subtilis* nos diferentes tipos de amido, nos tempos de 4, 6, 8, 10 e 12 horas
Analisado em função de açúcares redutores – conversão para maltose – dada em mg maltose/g amido

6.6.1. Cromatografia dos produtos de hidrólise do amido pela alfa-amilase produzida pelo *Bacillus subtilis*

Os produtos oriundos da hidrólise do amido nos tempos de 4, 8 e 12 horas foram aplicados em papel Watman n.1 e analisados segundo a metodologia descrita no item 5.7.2. Os cromatogramas encontram-se nas figuras 33, 34 e 35 (cromatografia em papel) e nas figuras 38, 39, 40 e 41 (cromatografia líquida para amostra de batata, mandioca, milho e trigo, respectivamente).

A análise dos cromatogramas revela que, a partir de 4 horas de reação, há grande produção de glicose (G1) e maltose (G2). A partir do tempo de hidrólise de 8 horas, há formação de maltotriose (G3) e maltotetose (G4), além da produção anterior. Até o final da hidrólise, em 12 horas de reação, não há modificações qualitativas dos produtos, mantendo, então, a liberação glicose, maltose, maltotriose e maltotetose, prioritariamente.

Nishimura (1994) analisou os produtos de hidrólise de amido solúvel sob ação de alfa-amilase produzida pelo *Bacillus subtilis* X-23 e encontrou, ao final de 16 horas de reação, apenas grande quantidade de glicose, maltose e maltotriose. Baseado nestes produtos finais, maltooligossacarídeos de baixo peso molecular, classificou a enzima como alfa-amilase sacarificante.

Mamo (1999) relata a obtenção de alfa-amilase extracelular produzida por *Bacillus sp* WN11 que, em presença de amido solúvel, libera glicose, maltose, maltotriose e, em menor quantidade, oligossacarídeos de baixo peso molecular. Em relação aos produtos da hidrólise de amido de batata e de milho, cita trabalhos que indicam ampla hidrólise desses grânulos na presença de enzimas produzidas por microrganismos do gênero *Bacillus*. Assim como o milho, a batata é

largamente cultivada sem, no entanto, encontrar as mesmas aplicações industriais para os seus produtos de hidrólise do amido, como o milho, largamente utilizado há anos. Desta forma, segundo Mamo, a descoberta de enzimas capazes de gerar um processo de hidrólise técnica e economicamente viável, preferencialmente em uma única etapa de sacarificação, ou a possibilidade de acoplar o uso de alfa-amilase a uma enzima desramificante (analisando a existência de barreiras tecnológicas, como, por exemplo, a compatibilidade entre as temperaturas e pH ótimos e de atividade entre enzimas) torna-se uma vantagem produtiva no processo.

Uguru (1997) hidrolisou amidos de diversas fontes com alfa-amilase produzida por *Bacillus subtilis* e obteve a produção de glicose, maltose, maltotriose e pequenas concentrações desde maltotetrose até maltohexose (G6). Pela análise dos produtos obtidos, a alfa-amilase foi considerada sacarificante, ao contrário das alfa-amilases liquidificantes, em geral produzidas pelo *Bacillus licheniformis* e *Bacillus amyloliquefaciens*, que liberam maltodextrinas de maiores pesos moleculares.

Takasaki (1985) descreveu a produção de xaropes de maltotriose (*tailor-made products*) pela hidrólise de amido pela ação de alfa-amilase termoestável produzida por *Bacillus subtilis* G3. No processo, além da liberação de maltotrioses, havia a produção de maltose e pequena quantidade de glicose.

A análise das áreas relativas aos picos de eluição dos compostos cromatografados permite estimar, quando comparados com as curvas padrão, a concentração desses compostos obtidos a partir da hidrólise do amido. As curvas padrão, desenvolvidas com soluções de concentração conhecida de glicose e

maltose, analisadas sob as mesmas condições, estão dispostas nas figuras 37 e 38.

A tabela 23 ilustra essa quantificação, dada em função do teor de glicose e maltose no tubo de reação (quantidade total formada destes açúcares) e em relação à quantidade de amido inicial (3 g). Através da análise desses dados, percebe-se que o amido de mandioca, batata e milho foi mais susceptível à hidrólise enzimática do que o de trigo. A maior produção de glicose foi atingida utilizando-se amido de mandioca, enquanto a maior produção de maltose foi obtida com amido de milho.

Assim sendo, percebe-se que a enzima estudada é capaz de hidrolisar diferentes tipos de amido, levando à produção de glicose e maltose, majoritariamente. Podendo, portanto, ser classificada como alfa-amilase sacarificante.

	Quantidade de glicose (mg) no tubo de hidrólise	mg glicose/ g amido	Quantidade de maltose (mg) no tubo de hidrólise	mg maltose/ g amido
Batata	1402.17	467.39	172.45	57.48
Mandioca	1899.88	633.29	174.63	58.21
Milho	1858.03	619.34	194.07	64.69
Trigo	202.56	67.52	71.85	23.95

Tabela 23: Análise quantitativa da hidrólise do amido pela cromatografia líquida de alta eficiência

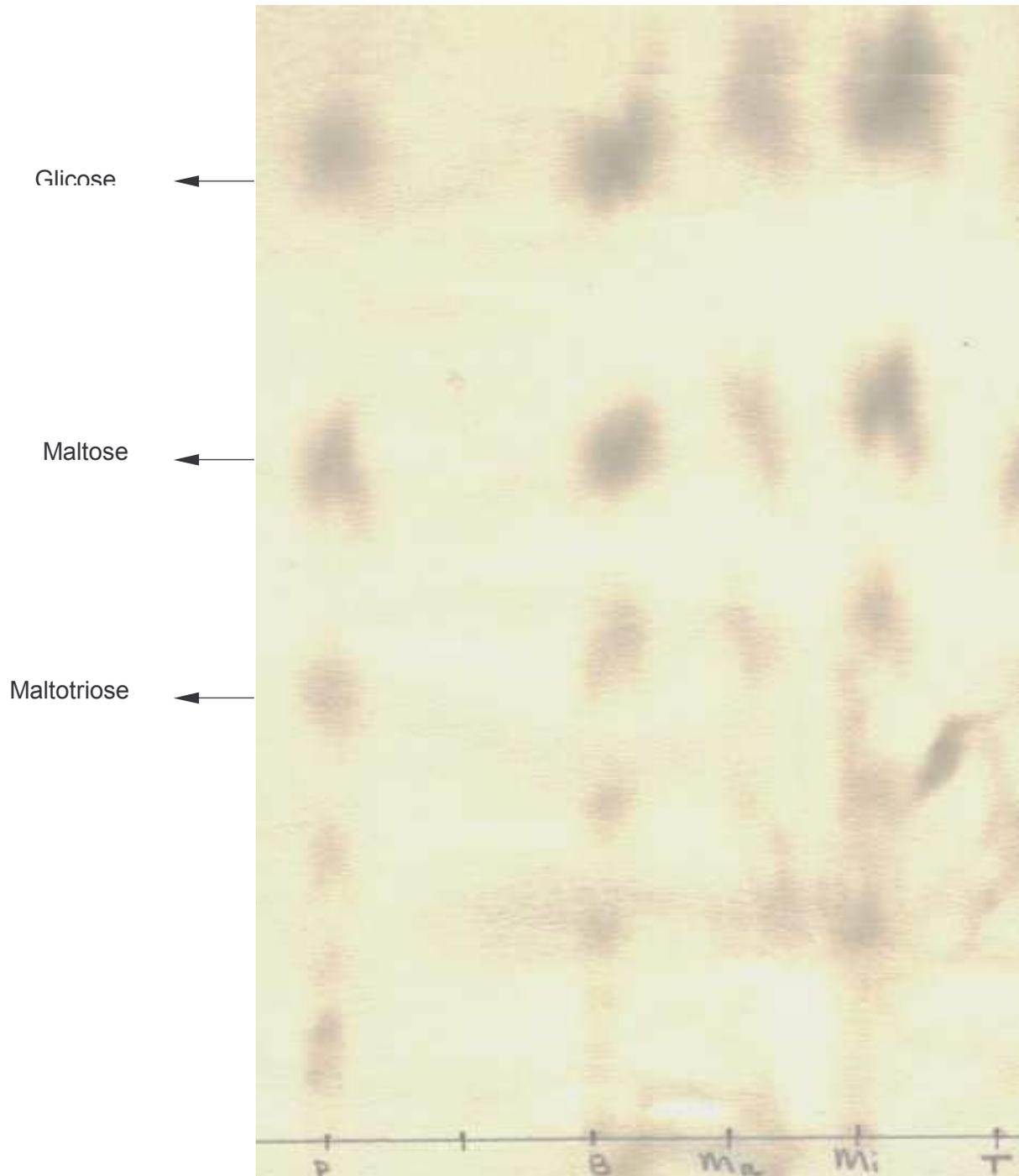


Figura 33: Cromatografia descendente em papel para tempo de reação de 4 horas

Legenda: P – solução padrão (conforme item 5.7.2.1)

B – Amido de batata

Ma – Amido de mandioca

Mi – Amido de milho

T – Amido de trigo

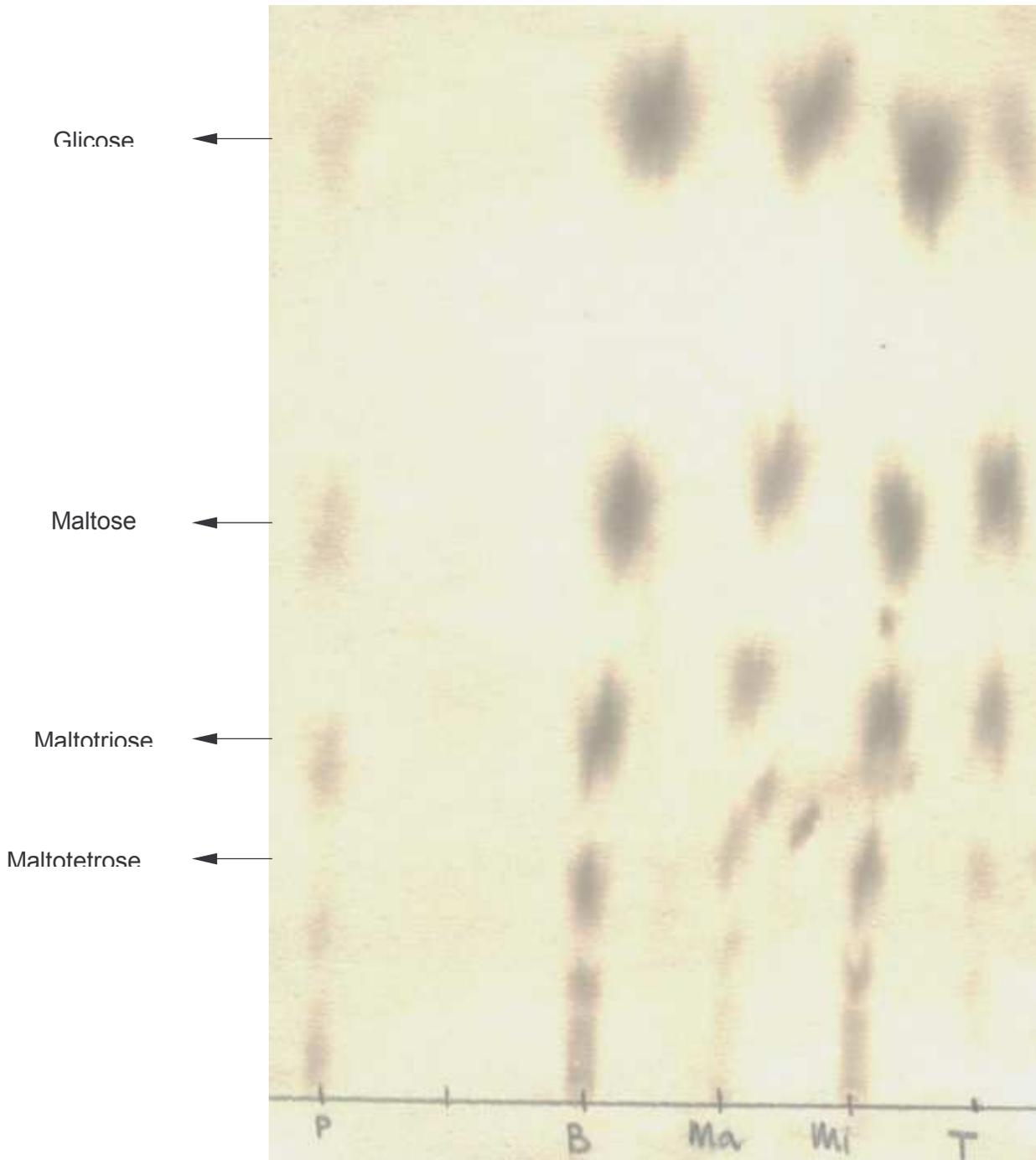


Figura 34: Cromatografia descendente em papel para tempo de reação de 8 horas

Legenda: P – solução padrão (conforme item 5.7.2.1)

B – Amido de batata

Ma – Amido de mandioca

Mi – Amido de milho

T – Amido de trigo

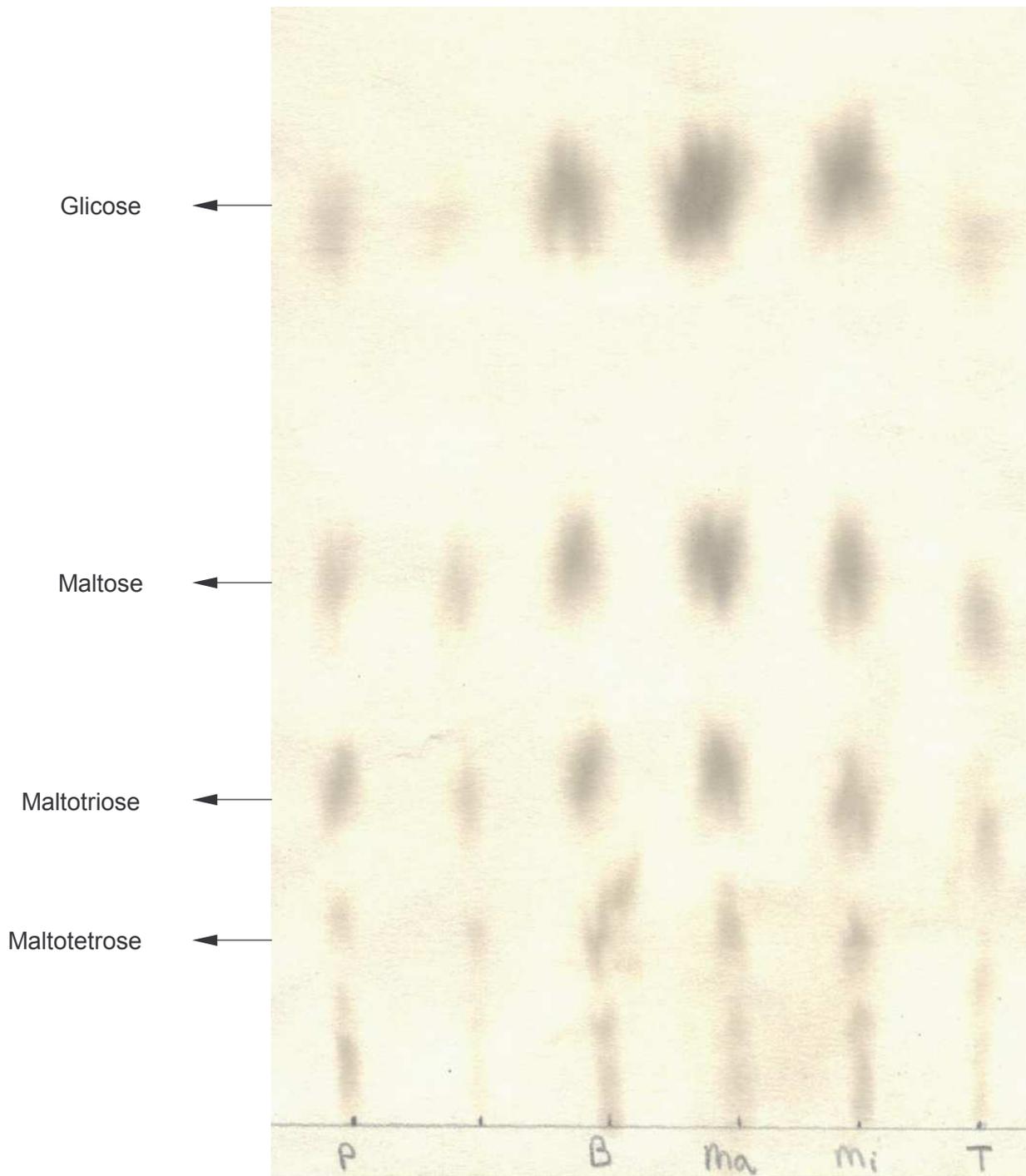


Figura 35: Cromatografia descendente em papel para tempo de reação de 12 horas

Legenda: P – solução padrão (conforme item 5.7.2.1)

B – Amido de batata

Ma – Amido de mandioca

Mi – Amido de milho

T – Amido de trigo

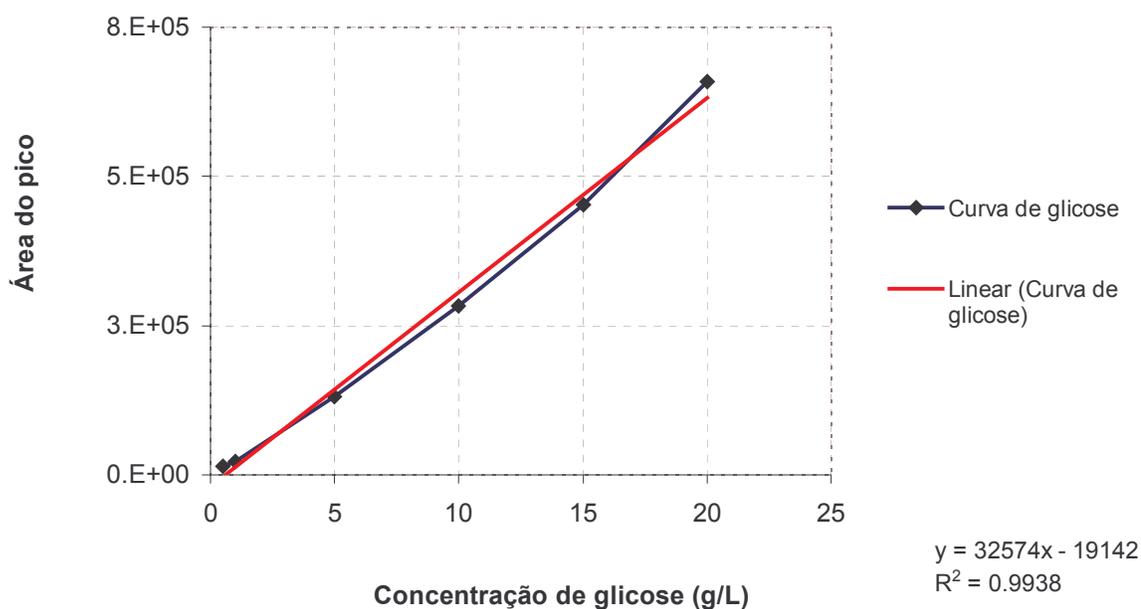


Figura 36: Curva padrão da glicose

Tempo de retenção na coluna do HPLC de, aproximadamente, 8,05 minutos

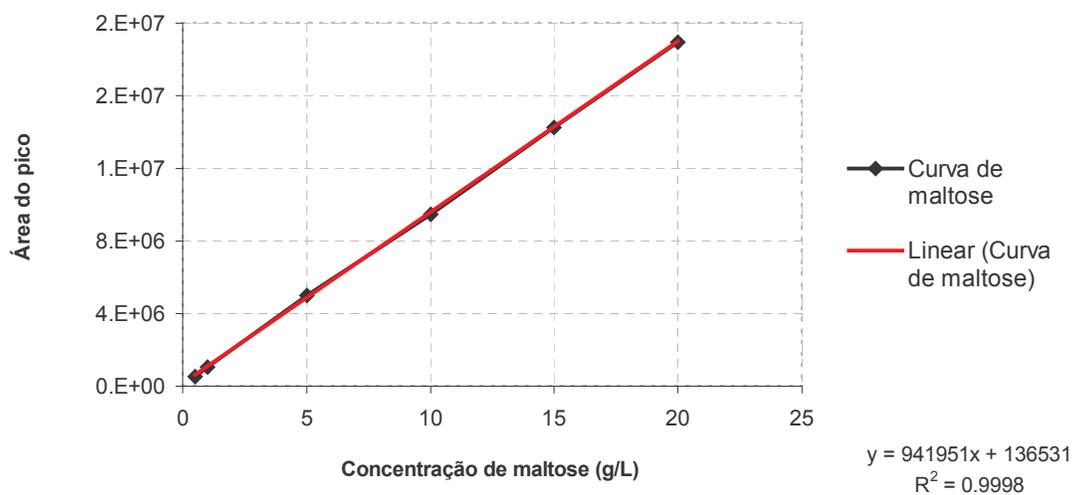


Figura 37: Curva padrão da maltose

Tempo de retenção na coluna do HPLC de, aproximadamente, 6,50 minutos

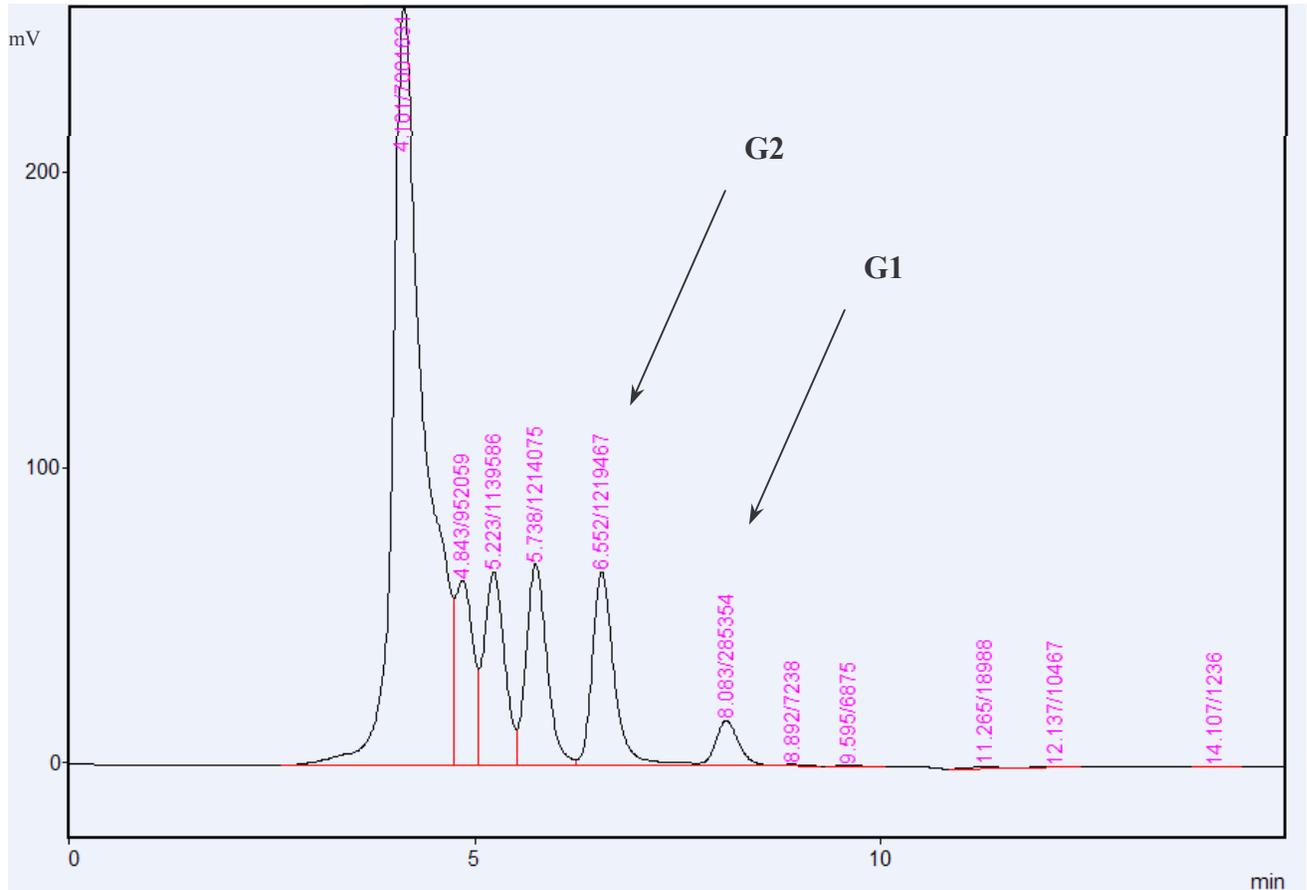


Figura 38: Cromatograma dos produtos de hidrólise do amido de batata, após 12 horas de reação enzimática

G1 – Glicose (tempo de retenção aproximado em 8,05 minutos)

G2 – Maltose (tempo de retenção aproximado de 6,50 minutos)

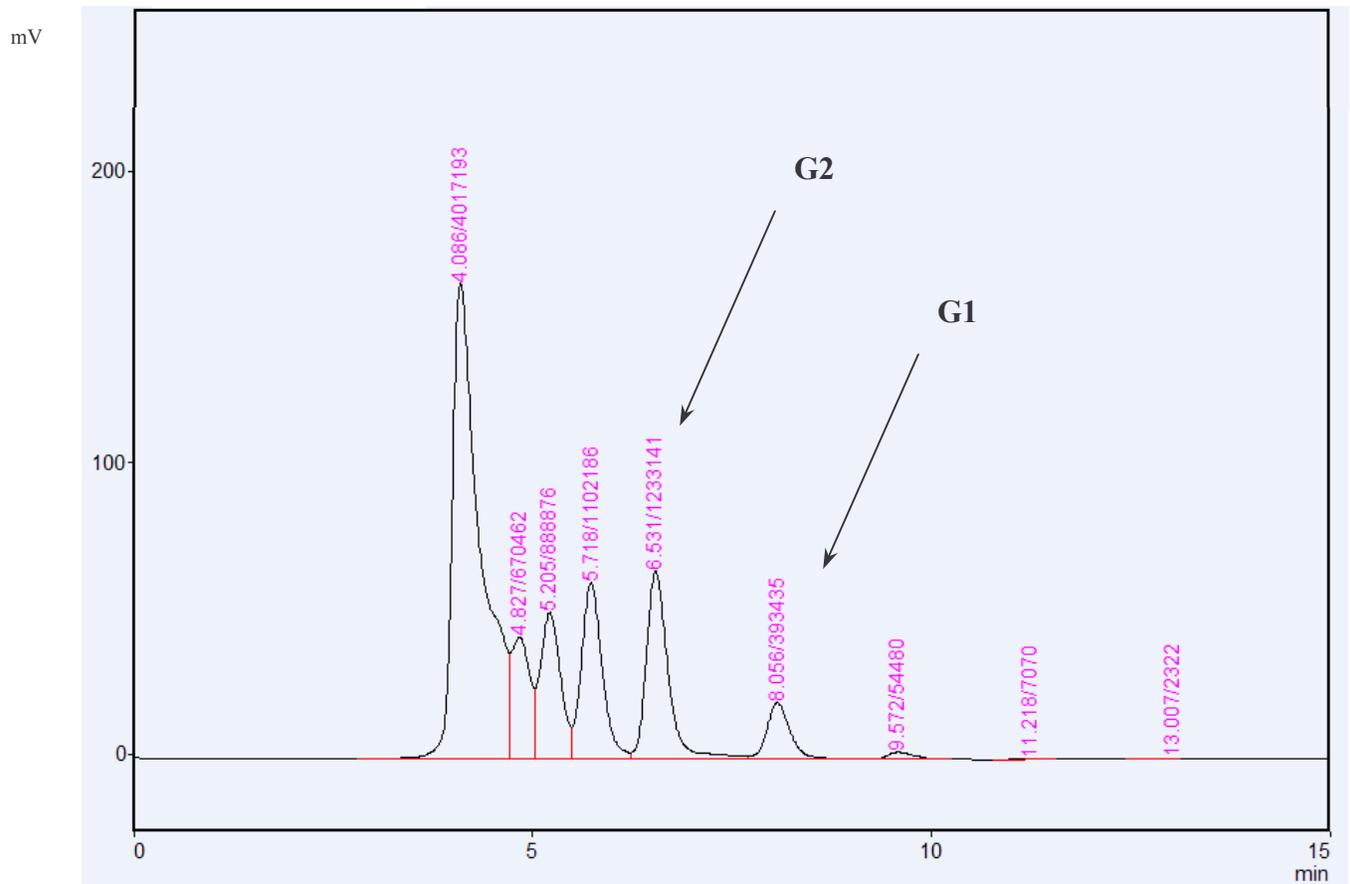


Figura 39: Cromatograma dos produtos de hidrólise do amido de mandioca, após 12 horas de reação enzimática

G1 – Glicose (tempo de retenção aproximado em 8,05 minutos)

G2 – Maltose (tempo de retenção aproximado de 6,50 minutos)

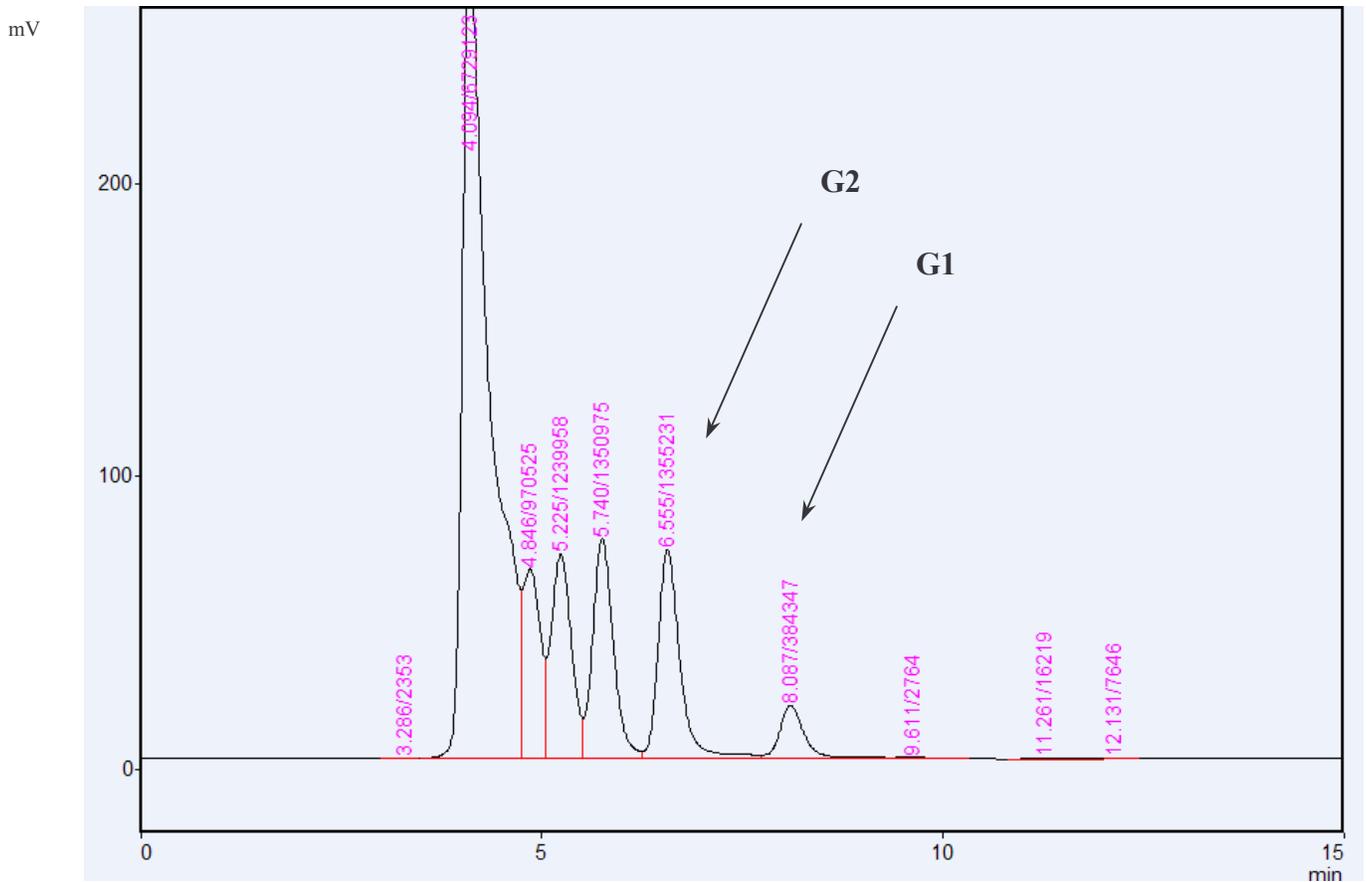


Figura 40: Cromatograma dos produtos de hidrólise do amido de milho, após 12 horas de reação enzimática

G1 – Glicose (tempo de retenção aproximado em 8,05 minutos)

G2 – Maltose (tempo de retenção aproximado de 6,50 minutos)

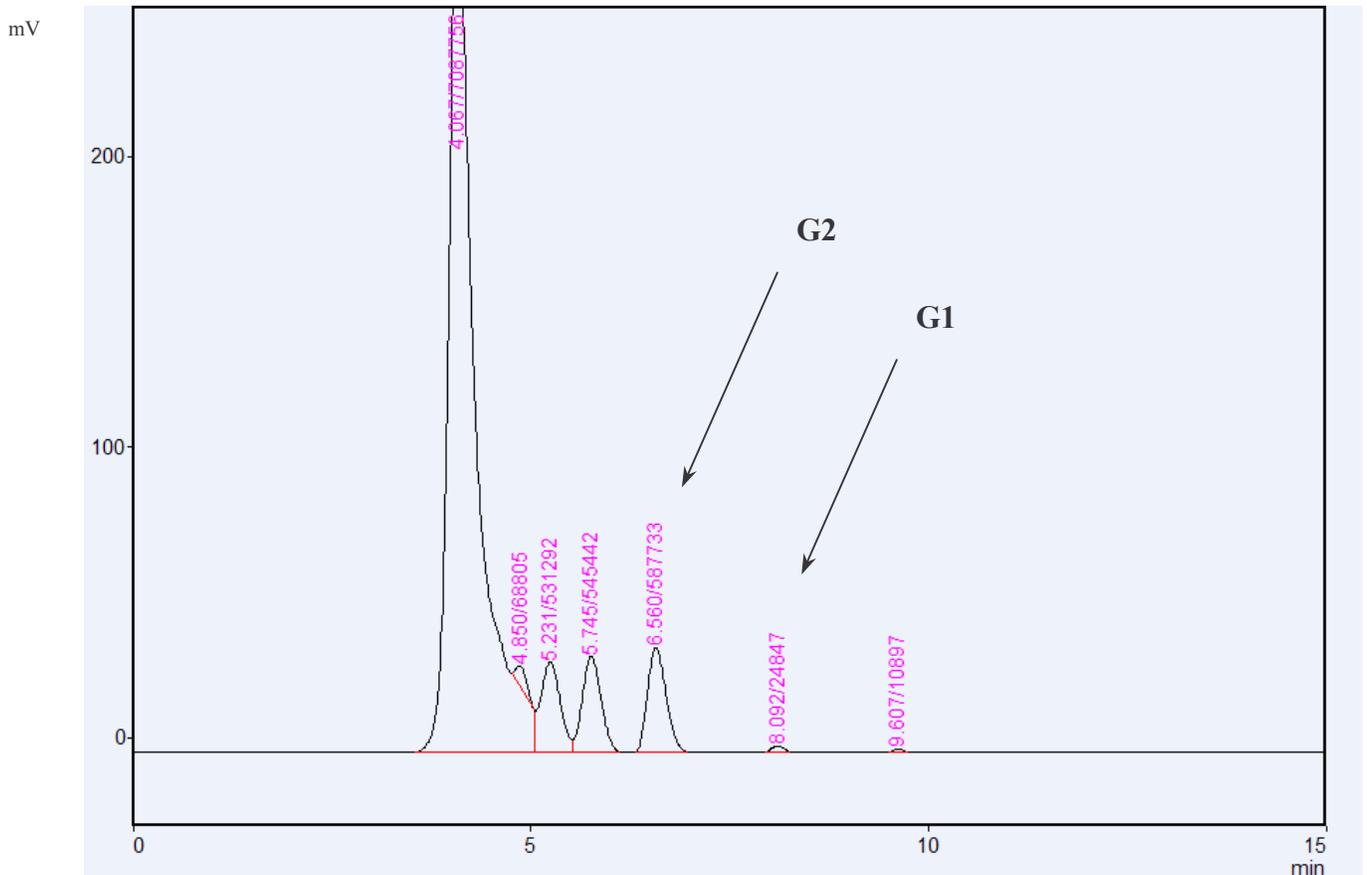


Figura 41: Cromatograma dos produtos de hidrólise do amido de trigo, após 12 horas de reação enzimática

G1 – Glicose (tempo de retenção aproximado em 8,05 minutos)

G2 – Maltose (tempo de retenção aproximado de 6,50 minutos)

7. CONCLUSÕES

- 7.1. Das 700 linhagens isoladas, a classificada como LB 45-2B, identificada como *Bacillus subtilis*, apresentou maior atividade hidrolítica sobre o amido, medida em altas temperaturas.
- 7.2. Esta linhagem de *Bacillus subtilis* produz alfa-amilase termoestável extracelular que, ao hidrolisar o amido, liberou sacarídeos de baixo peso molecular, prioritariamente. Assim sendo, esta enzima pode ser classificada como alfa-amilase bacteriana sacarificante.
- 7.3. Quando utilizado o meio de cultivo composto por 3 g/L de extrato de carne, 5 g/L de peptona e 5 g/L de amido solúvel, a linhagem em estudo atingiu máxima produção de alfa-amilase em até 48 horas, a 35°C e agitação de 150 rpm.
- 7.4. A enzima apresenta atividade hidrolítica máxima nas faixas de pH de 5 a 6 e de temperatura de 50 a 70°C.
- 7.5. Verificou-se que a alfa-amilase tem sua atividade hidrolítica pouco afetada pela presença de 20mM de CaCl₂. Entretanto, este composto favoreceu a estabilidade térmica da enzima, mantendo-a estável por 1 hora a 60°C.
- 7.6. A enzima foi purificada 10 vezes quando em comparação com a enzima bruta. A eletroforese vertical em gel de SDS-poliacrilamida mostrou, entretanto, a presença de 3 frações protéicas, indicando que a enzima encontra-se parcialmente purificada. Para a completa purificação, há necessidade de utilização de técnicas complementares de purificação.

7.7. A estimativa do peso molecular da enzima, realizada em coluna de gel Sephadex G-200, indica o valor aproximado de 27,1 KDa, correspondente à terceira fração proteica evidenciada no gel de SDS-poliacrilamida.

7.8. A enzima hidrolisou os amidos de milho, batata e mandioca com maior eficiência do que o amido de trigo, em 12 horas de reação, à 70°C. Após este tempo, constatou-se a produção de glicose, maltose e maltotriose.

8. Sugestões para trabalhos futuros

- 8.1. Identificação molecular do microrganismo para definição de sua subespécie;
- 8.2. Estudo de meio de produção alternativo e mais barato, assim como sua otimização;
- 8.3. Efetivação da completa purificação da enzima estudada, adicionando-se etapas e/ou metodologias complementares;
- 8.4. Ampliação da escala produtiva da enzima, visando adaptá-la a escala industrial;
- 8.5. Estudo das condições de processamento (tempo, matéria prima, controle do processo etc.) para obtenção de produtos específicos (*tailor made products*);

9. BIBLIOGRAFIA

- ALI, M.B.; MEZGHAMI, M.; BEJAR, S. 1999. A thermostable alpha-amylase producing maltohexaose from a new isolated *Bacillus sp.* US 100: study of activity and molecular cloning of the corresponding gene. *Enzyme and Microbial Technology*. 24: 584-589.
- BEYNUM, G.M.A.; ROELS, J.A. 1985. *Starch Conversion Technology – Food Science and Technology*, vol. 14. Marcel Dekker Inc.
- BAJPAI, P.; BAJPAI, P. 1989. High-Temperature alkaline alpha-amylase from *Bacillus licheniformis* TCRDC-B13. *Biotechnology and Bioengineering*. 33: 72-78.
- BUONOCORE, V.; CAPORALE, C.; ROSA, M. & GAMBACORTA, S. 1976. Stable, inducible thermoacidophilic alpha-amylase from *Bacillus acidocaldarius*. *Journal of Bacteriology*. 128 (2): 515 – 521.
- BURGESS-CASSLER, A. & IMAN, S. 1991. Partial purification and comparative characterization of alpha-amylase secreted by *Lactobacillus amylovoms*. *Current Microbiology*. 33: 207-213.
- CHRISTOPHERSEN, C.; OTZEN, D.E.; NORMAN, B.E.; CHRISTENSEN, S.; SCHAFER, T. 1998. Enzymatic characterization of Novamyl, a thermostable alpha-amylase. *Starch/Starke*. 50 (1): 39-45.
- DEWEER, P.; AMORY, A. 1997. Acid-stable and thermo-stable enzymes derived from *sulfololus* species.
- DOBREVA, E.; IVANOVA, V.; EMANUILOVA, E. 1994. Effect of temperature on some characteristics of the thermostable alpha-amylase from *Bacillus licheniformis*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 10: 547-550.
- DOYLE, E.M.; NOONE, A.M.; KELLY, C.T.; FOGARTY, W.M. 1999. Comparison of the action pattern of two high maltose-forming alpha-amylase on linear maltooligosaccharides. *Enzyme and Microbial Technology*. 25: 330-335.

- EU. European Union, 2002. Evaluation of the Community Policy for starch and starch products. Capítulo 2. Disponível em: www.europa.eu.int/comm/agriculture/eval/reports/amidon/chap2.pdf Acesso em 14 jan. 2004.
- FOGARTY, W.M.; COLLINS, B.S.; DOYLE, E.M.; KELLY, C.T. 1993. The high maltose-forming alpha-amylase of *Saccharomonospora viridis*: mechanisms of action. *Journal of Industrial Microbiology*. 11: 199-204.
- GODSHALL, M.A. 1998. The Multiple Roles of Carbohydrates in Food Flavour Systems. *Cereal Foods World*. 33(11): 913-918.
- HAMILTON, L.M.; KELLY, C.T.; FOGARTY, W.M. 1998. Raw starch degradation by the non-raw starch-adsorbing bacterial alpha-amylase of *Bacillus sp.* IMD 434. *Carbohydrate Research*. 314, 251-257.
- HAMILTON, L. M.; KELLY, C. T.; Fogarty, W. M. 1999. Production and properties of the raw starch-digesting alpha-amylase of *Bacillus sp.* IMD 435. *Proc. Bioch.* 35: 27-31.
- HAYASHIDA, S.; TERAMOTO, Y.; INOUE, T. 1988. Production and characteristics of raw-potato-starch-digesting alpha-amylase from *Bacillus subtilis* 65. *Applied and Environmental Microbiology*. 54 (6): 1516-1522.
- IKAWA, K.; ARAKI, H.; TSUJINO, Y.; HAYASHI, Y.; IGARASHI, K.; HATADA, Y.; HAGIHARA, H.; OZAWA, T.; OZAKI, K.; KOBAYASHI, T.; ITO, S. 1998. Hyperexpression of the gene for a *Bacillus* alpha-amylase in *Bacillus subtilis* cells: enzymatic properties and crystallization of the recombinant enzyme. *Bioscience and Biotechnological Biochemistry*. 62 (9): 1720-1725.
- INGLE, M.B.; ERICKSON, R.J. 1978. Bacterial alpha-amylases. *Advances in Applied Microbiology*. 24: 257-279.
- IWATA, K.; OHNISHI, M.; HIROMI, K. 1990. Glucose production from maltohexaose as a substrate by the bacterial alpha-amylase-catalyzed reaction.

- Its time courses obtained by theoretical and experimental approaches. *Starch/Starke*. 42 (4): 147-151.
- KANNO, M. A 1986. *Bacillus acidocaldarius* alpha-amylase that is Highly Stable to Heat Under Acidic Conditions. *Agricultural Biological Chemistry*. 50(1): 23-31.
- KATO, M. 1999. Trehalose Production With a New Enzymatic System From *Sulfolobus solfataricus* KM1. *Journal of Molecular Catalysis Enzimatic*. 6: 223-233.
- KEARSLEY, M.W.; DZIEDIC, S.Z. 1995. Handbook of starch hydrolysis products and their derivatives. Chapman & Hall.
- KIM, I.C.; YOO, S.H.; LEE, S.J.; OH, B.H.; KIM, J.W.; PARK, K.H. 1994. Synthesis of branched oligosaccharides from starch by two amylases cloned from *Bacillus licheniformis*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 58 (2): 416-418.
- KICHAKOVA, N.A.; PAVLOVA, I.N.; ZAKHAROVA, Y. 1998. Purification and identification of amylolytic enzymes from *Bacillus licheniformis*. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 34 (5): 458-461.
- KRIEG, N.R.; HOLT, J.G. 1984. Bergey's manual of systematic bacteriology. Willians & Willians, Baltimore, USA, 1^a ed., 1: 408-465.
- KRUGER, J.E.; LINEBACK, D; STANFFER, C.E. 1998. Enzymes and their role in cereal technology. American Association of Cereal Chemistry.
- KURIKI, T.; YANASE, M.; TAKATA, H.; TAKESADA, Y.; IMANAKA, T.; OKADA, S. 1993. A new way of producing isomalto-oligosaccharide syrup by using the transglycosylation reation of neopullulanase. *Applied and Environmental Microbiology*. 59 (4): 953-959.
- KWAK, Y.S.; AKIBA, T.; KUDO, T. 1998. Purification and characterization of alpha-amylase from Hyperthermophilic Archeon *Thermococcus profundus*, which

- hydrolyzes both α -1,4 and α -1,6 glucosidic linkages. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 86 (4): 363-367.
- LAMA, L.; TRINCONE, A.; MARZILLO, P.; ROSA, M.; GAMBACORTA, A. 1990. Starch Conversion with Immobilized Thermophilic Archaeobacterius *Sulfalobus solfataricus*. *Biotechnology Letters*. 2 (6): 431-432.
- LEE, J.T.; KANAI, H.; KOBAYASHI, T.; AKIBA, T.; KUDO, T. 1996. Cloning, nucleotide sequence and Hyperexpression of alpha-amylase gene from an archaeon, *Thermococcus profundus*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 82 (5): 432-438.
- LÉVÊQUE, E.; JANECEK, S.; HAYE, B.; BELARBI, A. 2000. Thermophilic archaeal amylolytic enzymes. *Enzyme and Microbial Technology*. 26: 3-14.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. 1951. Protein measurement with Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 193: 265
- MACEDO, G.A. 1995. Produção, purificação, caracterização bioquímica e aplicações de lipase de *Geotrichum sp.* Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- MALHOTRA, R.; NOORWEZ, S.M.; SATYANARAYANA, T. 2000. Production and partial characterization of thermostable and calcium-independent alpha-amylase of an extreme thermophile *Bacillus thermooleovorans* NP54. *Letters in Applied Microbiology*. 31: 378-384.
- MAMO, G.; GESSESSE, A. 1999. Purification and characterization of two raw-starch-digesting thermostable alpha-amylase from a thermophilic *Bacillus*. *Enzyme and Microbial Technology*. 25: 433-438.

- MEDDA, S.; CHANDRA, K. 1980. New strains of *Bacillus licheniformis* and *Bacillus coagulans* producing thermostable alpha-amylase active at alkaline pH. *Journal of Applied Bacteriology*. 48: 47-58.
- MILES, A.A.; MISRA, S.S. 1938. The estimation of the bactericidal power of blood. *Journal of Higiene*. 38: 732-749.
- NEBESNY, E. 1993. Changes of carbohydrates compositions during enzymatic hydrolysis of starches of various origin. *Starch/Starke*. 45 (12): 426-429.
- NELSON, N. 1944. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *Journal of Biological Chemistry*. 153: 375-380.
- NISHIMURA, T.; KOMETANI, T.; TAKII, H.; TERADA, Y.; OKADA, S. 1994. Purification and some properties of alpha-amylase from *Bacillus subtilis* X-23 that glucosylates phenolic compounds such as hydroquinone. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 78 (1): 31-36.
- ODIBO, F.L.C.; ULBRICH-HOFMANN, R. 2001. Thermostable alpha-amylase and glucoamylase from *Thermomyces lanuginosus* F1. *Acta Biotechnol*. 21 (2): 141-153.
- OGASAHARA, K.; IMANISHI, A.; ISEMURA, T. 1970. Studies on thermophilic alpha-amylase from *Bacillus stearothermophilus*. Thermal stability of thermophilic alpha-amylase. *The Journal of Biochemistry*. 67(1): 77-82.
- OMOBUWAJO, T.O. 1994. Modelling of a Process for Conversion of Corn to Syrup. *Food and Science Technology*. 27(1): 23-28.
- PANDEY, A.; NIGAM, P.; SOCCOL, C.R.; SOCCOL, V.T.; SINGH, D.; MOHAN, R. 2000. Advances in microbial amylases. *Biotechnological Applied Biochemistry*. 31: 135-152.
- RE, R. 1989. Estudo sobre a determinação da atividade da alfa-amilase em farinha de trigo através do método viscosimétrico. Tese (Doutorado em Tecnologia de

- Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- REDDY, R.M.; REDDY, P.G.; SEENAYYA, G. 1999. Enhanced Production of Thermostable β -Amylase and Pululanase in the Presence of Surfactants by *Clostridium thermosulfurogenes* SVZ. *Process Biochemistry*. 34: 87-92.
- RICHARDSON, T.H.; TAN, X.; FREY, G.; CALLEN, W.; CABELL, M.; JAM, L.; MACOMBER, J.; SHORT, J.M.; ROBERTSON, D.E.; MILLER, C. 2002. A novel, high performance enzyme for starch liquefaction. *The Journal of Biological Chemistry*. 277 (29): 26501-26507.
- ROUSSEL, L.; VIELLE, A.; BILLET, I.; CHEFTEL, J.C. 1991. Sequential heat gelatinization and enzymatic hydrolysis of corn starch in an extrusion reactor. Optimization for a maximum dextrose equivalent. *Lebensm. – Wiss u. Technol.* (24): 449-458.
- SABORNY, A.A.; KARBASSI, F. 2000. Thermodynamic studies on the interaction of calcium ions with alpha-amylases. *Thermochimica Acta*, 362: 121-129.
- SAHA, B.C.; ZEIKUS, J.G. 1987. Biotechnology of maltose syrup production. *Process Biochemistry*. (June): 78-82.
- SALVA, T.J.G. 1990. Alfa-amilase de *Bacillus subtilis* ATCC 601 B: produção e propriedades da enzima não purificada. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- SALZMANN, S.M. 1991. *Enzyme Handbook*, vol. 3. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- SARIKAYA, E.; HIGASA, T.; ADACHI, M.; MIKAMI, B. 2000. Comparison of degradation abilities of alpha- and beta-amylases on raw starch granules. *Process Biochemistry*. 35: 711-715.

- SATO, H.H. 1991. Estudo das características bioquímicas da pululanase de *Klebsiella sp* e sua aplicação. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- SHETTY, J.K.; ALLEN, W.G. 1998. An acid-stable, thermostable alpha-amylase for starch liquefaction. *Cereal Foods World*. 33 (11): 929-934.
- SOMOGYI, M. 1952. Notes on sugar determination. *Journal of Biological Chemistry*. 195: 19-23.
- SUVD, D.; FUJIMOTO, Z.; TAKASE, K.; MATSUMURA, M.; MIZUNO, H. 2001. Crystal structure of *Bacillus stearothermophilus* alpha-amylase: possible factors determining the thermostability. *Journal of Biochemistry*. 129: 461-468.
- TAKASAKI, Y. 1985. An amylase producing maltotriose from *Bacillus subtilis*. *Agric. Biological Chemistry*. 49 (4): 1091-1097.
- TANAKA, T.; ISHIMOTO, E.; SHIMOMURA, Y. 1987. Purification and some properties of raw starch-binding amylase of *Clostridium butyricum* T-7 isolated from mesophilic methane sludge. *Agricultural Biological Chemistry*. 51 (2): 399-405.
- UGURU, G.C.; ROBB, D.A.; AKINYANJU, J.A.; SANI, A. 1997. Purification, characterization and mutagenic enhancement of a thermoactive alpha-amylase from *Bacillus subtilis*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 19: 273-279.
- WANG, Y.J., WANG, L. 2000. Structures and properties of commercial maltodextrins from corn, potato and rice starches. *Starch/Starke*. 52: 296-304.
- ZHANG, X.; XIE, S.; WU, X.; JIN, F.; LI, X. 1994. Purification and characterization of thermostable alpha-amylase II from *Bacillus sp* – JF2 strain. *Enzyme Microb. Technology*. 16: 985-990.