

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS E AGRÍCOLA

ESTUDO COMPARATIVO DA PRODUÇÃO, PURI-  
FICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS  $\beta$ -AMILA-  
SES DE *Bacillus megaterium* e *Bacillus*  
*polymyxa*

Alexandre Morga  
Farmacêutico-Bioquímico

Prof. Dr. Yong Kun Park  
Orientador

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrí-  
cola da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do Tí-  
tulo de Doutor em Ciências de Alimentos.

CAMPINAS

1979  
UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL

À

Leticia

Alexandra e

Silvia

## AGRADECIMENTOS

Agradeço sinceramente ao Prof. Dr. Yong Kun Park, pela sua constante e valiosa orientação durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. André Tosello, Diretor da Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola.

Ao Prof. Dr. Fumio Yokoya, Coordenador do Curso de Pós-graduação da FEAA, pela colaboração prestada no uso do Laboratório de Microbiologia.

Aos amigos e conselheiros Prof. Dr. Leopold Hartman e Prof. Dr. Ernest G. Cohn.

Ao Dr. H. B. Naylor da Universidade de Cornell, NY, pela tipificação e confirmação dos microrganismos selecionados.

Ao Prof. Dr. Demétrio Maranczenbaum Aguilera, pelo seu apoio e amizade.

Aos professores e pessoal técnico do Laboratório de Microbiologia e Bioengenharia, pela cooperação prestada no uso de diversos equipamentos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq - pela ajuda financeira prestada.

Ao Departamento de Tecnologia de Alimentos da UFRRJ pelas facilidades no afastamento, tão necessário para o desenvolvimento deste trabalho.

À Srta. Rachel M. Bianchini, pela sua inestimável colaboração.

À minha querida esposa, pelo incentivo e compreensão durante a realização deste curso.

Ao pessoal do Laboratório de Bioquímica de Alimentos, pelo incentivo e colaboração prestados.

Agradecimentos às bibliotecárias da FEAA, Angelina F. Godoy e Creusa Kasumi Nomura, pelo auxílio prestado.

Também agradeço aos amigos e a todas as pessoas que direta ou in diretamente ajudaram na realização deste trabalho.

## CONTEÚDO

	página
ÍNDICE DE QUADROS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
SUMMARY	1
RESUMO	3
INTRODUÇÃO	5
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
MATERIAIS E MÉTODOS	
1. Materiais	22
1.1. Reagentes químicos	22
1.2. Reagentes para meio de cultura	22
1.3. Equipamentos utilizados	22
2. Métodos	23
2.1. Seleção de microrganismos	23
2.2. Isolamento de microrganismos	24
2.3. Teste para verificação da produção da $\beta$ -amilase	24
2.4. Análise cromatográfica em papel	25
2.5. Avaliação da atividade enzimática	26
2.6. Definição da umidade de atividade	27
2.7. Método de identificação dos microrganismos	27
2.8. Condições de produção da $\beta$ -amilase microbiana	28
2.8.1. Faixa de temperatura ótima de produção e temperatura ótima de crescimento	28
2.8.2. Meio de cultura	29

2.8.3. Método de fermentação	30
2.9. Purificação da $\beta$ -amilase	32
2.9.1. Fracionamento com sulfato de amônio	32
2.9.2. Diálise	32
2.9.3. Cromatografia em coluna de DEAE-celulose	33
2.9.4. Cromatografia em coluna de CM-celulose	34
2.10. Estudo das características enzimáticas da $\beta$ -amila <u>s</u> e	34
2.10.1. Efeito do pH na atividade enzimática	35
2.10.2. Efeito do pH na estabilidade enzimática	35
2.10.3. Efeito da temperatura na atividade enzi <u>m</u> ática	36
2.10.4. Termoestabilidade da enzima	36
2.10.5. Efeito de sais metálicos na atividade enzimática	36
2.10.6. Efeito do p-cloromercuriobenzoato na a <u>t</u> ividade enzimática	37
2.10.7. Efeito da hidrólise da $\beta$ -amilase microbiana sobre o amido	37
2.10.8. Efeito da concentração do substrato na velocidade de reação	38
2.11. Determinação da $\alpha$ -glucosidase (maltase)	38
RESULTADOS	
1. Seleção e isolamento de microrganismos	39
2. Microrganismos capazes de produzir $\beta$ -amilase	39
3. Identificação dos microrganismos produtores da $\beta$ -amila <u>s</u> e	39
4. Produção da $\beta$ -amilase microbiana	
4.1. Temperatura	39

4.2. Meio de cultura	40
4.3. Fermentação	41
5. Purificação da $\beta$ -amilase microbiana	45
6. Estudo das características enzimáticas da $\beta$ -amilase microbiana	
6.1. Efeito do pH na atividade enzimática	46
6.2. Efeito do pH na estabilidade enzimática	46
6.3. Efeito da temperatura na atividade enzimática	46
6.4. Termoestabilidade da enzima	47
6.5. Efeito de sais metálicos na atividade enzimática	47
6.6. Efeito do p-cloromercúriobenzoato na atividade enzimática	48
6.7. Efeito da hidrólise da $\beta$ -amilase microbiana sobre o amido	48
6.8. Efeito da concentração do substrato na velocidade de reação	48
7. Presença de $\alpha$ -glucosidase	49

## DISCUSSÃO

1. Isolamento e identificação dos microrganismos capazes de produzir $\beta$ -amilase	50
2. Identificação da $\beta$ -amilase	51
3. Produção da $\beta$ -amilase microbiana	54
3.1. Temperatura	54
3.2. Meio de cultura	55
3.3. Fermentação	57
4. Purificação	59
5. Estudo das características enzimáticas da $\beta$ -amilase microbiana	60

5.1. Efeito do pH	60
5.2. Efeito da temperatura	60
5.3. Efeito dos sais metálicos e p-cloromercúrioben- zoato	61
5.4. Características de ação hidrolítica da $\beta$ -amilase	61
5.5. Efeito de concentração do substrato na velocidade de reação	61
CONCLUSÕES	115
BIBLIOGRAFIA	118

## ÍNDICE DE QUADROS

	Página
QUADRO 1. Similaridade e diferenças das amilases	8
QUADRO 2. Características morfológicas e fisiológicas da cepa n <sup>o</sup> 197	63
QUADRO 3. Características morfológicas e fisiológicas da cepa n <sup>o</sup> 472	64
QUADRO 4. Efeito de algumas fontes de nitrogênio na produção da $\beta$ -amilase microbiana	65
QUADRO 5. Efeito da fonte de carbono na produção da $\beta$ -amilase microbiana	66
QUADRO 6. Efeito da concentração do amido na produção da $\beta$ -amilase microbiana	67
QUADRO 7. Efeito da concentração da fonte de caseína na produção de $\beta$ -amilase microbiana	68
QUADRO 8. Efeito do extrato de levedura na produção da $\beta$ -amilase microbiana	69
QUADRO 9. Purificação da $\beta$ -amilase do <i>Bacillus megaterium</i>	70
QUADRO 10. Purificação da $\beta$ -amilase do <i>Bacillus polymyxa</i>	71

QUADRO 11. Efeito dos sais metálicos na atividade de $\beta$ -amilase microbiana	72
QUADRO 12. Efeito inibitório do p-cloromercuriobenzoato sobre a $\beta$ -amilase microbiana e subsequente reativação com cisteína	73
QUADRO 13. Influência da temperatura na produção da $\beta$ -amilase do <i>Bacillus polymyxa</i> por 60h no mini-fermentador	74
QUADRO 14. Algumas propriedades da $\beta$ -amilase	75
QUADRO 15. Seleção de bactérias produtoras de $\beta$ -amilase	53

## ÍNDICE DE FIGURAS

	página
FIGURA 1. Ação da $\beta$ -amilase sobre a amilopectina	7
FIGURA 2. Correlação entre o efeito da temperatura na produção da $\beta$ -amilase pelo <i>Bacillus megaterium</i> e a Curva de Arrhenius	76
FIGURA 3. Efeito da temperatura na produção de $\beta$ -amilase pelo <i>Bacillus megaterium</i>	77
FIGURA 4. Correlação entre o efeito da temperatura na produção de $\beta$ -amilase pelo <i>Bacillus polymyxa</i> e a Curva de Arrhenius	78
FIGURA 5. Efeito da temperatura na produção de $\beta$ -amilase pelo <i>Bacillus polymyxa</i>	79
FIGURA 6. Relação entre tempo, produção da $\beta$ -amilase, massa celular e pH, pelo <i>Bacillus megaterium</i> , meio amido, mini-fermentador	80
FIGURA 7. Relação entre o tempo, produção da $\beta$ -amilase, massa celular e pH, pelo <i>Bacillus megaterium</i> , meio maltose, mini-fermentador	81
FIGURA 8. Relação entre o tempo, produção da $\beta$ -amilase, massa celular e pH, pelo <i>Bacillus megaterium</i> , meio amido, agitador rotatório	82

- FIGURA 9. Relação entre o tempo, produção da  $\beta$ -amilase, massa e pH, pelo *Bacillus megaterium*, meio maltose, agitador rotatório 83
- FIGURA 10. Cromatograma do consumo dos produtos de hidrólise do amido no meio de cultura com o tempo de fermentação para o *Bacillus megaterium* 84
- FIGURA 11. Cromatograma de produção da enzima no meio de cultura com o tempo de fermentação para o *Bacillus megaterium* 85
- FIGURA 12. Cromatograma do consumo de maltose no meio de cultura com o tempo de fermentação para o *Bacillus megaterium* 86
- FIGURA 13. Cromatograma da produção de enzima no meio de cultura com o tempo de fermentação para o *Bacillus megaterium* 87
- FIGURA 14. Relação entre o tempo, produção da  $\beta$ -amilase, massa celular e pH pelo *Bacillus polymyxa*, meio amido, mini-fermentador 88
- FIGURA 15. Relação entre o tempo, produção da  $\beta$ -amilase, massa celular e pH, pelo *Bacillus polymyxa*, meio maltose, mini-fermentador 89
- FIGURA 16. Relação entre tempo, produção da  $\beta$ -amilase, massa celular e pH, pelo *Bacillus polymyxa*, meio amido, agitador rotatório 90

- FIGURA 17. Relação entre o tempo, produção da  $\beta$ -amilase, massa celular e pH, pelo *Bacillus polymyxa*, meio maltose, agitador rotatório 91
- FIGURA 18. Cromatograma dos produtos de hidrólise do amido com o tempo de fermentação, para o *Bacillus polymyxa* 92
- FIGURA 19. Cromatograma da produção da enzima no meio de cultura com o tempo de fermentação, para o *Bacillus polymyxa* 93
- FIGURA 20. Cromatograma do consumo da maltose no meio de cultura com o tempo de fermentação, para o *Bacillus polymyxa* 94
- FIGURA 21. Cromatograma da produção da enzima no meio de cultura com o tempo de fermentação, para o *Bacillus polymyxa* 95
- FIGURA 22. Relação entre o tempo, produção da  $\beta$ -amilase, massa celular, pH e consumo da glicose, pelo *Bacillus polymyxa* 96
- FIGURA 23. Relação entre o tempo, produção da  $\beta$ -amilase, massa celular, pH e consumo da glicose, pelo *Bacillus polymyxa* 97
- FIGURA 24. Relação entre o tempo, produção da  $\beta$ -amilase, massa celular e pH, pelo *Bacillus polymyxa* 98

FIGURA 25. Cromatograma da $\beta$ -amilase do <i>Bacillus megaterium</i> em coluna de DEAE-celulose	99
FIGURA 26. Cromatograma da $\beta$ -amilase do <i>Bacillus megaterium</i> em coluna de CM-celulose	100
FIGURA 27. Cromatograma da $\beta$ -amilase do <i>Bacillus polymyxa</i> em coluna de DEAE-celulose	101
FIGURA 28. Cromatograma da $\beta$ -amilase do <i>Bacillus polymyxa</i> em coluna de CM-celulose	102
FIGURA 29. Efeito do pH na atividade da $\beta$ -amilase do <i>Bacillus megaterium</i>	103
FIGURA 30. Efeito do pH na atividade da $\beta$ -amilase do <i>Bacillus polymyxa</i>	104
FIGURA 31. Efeito do pH na estabilidade da $\beta$ -amilase do <i>Bacillus megaterium</i>	105
FIGURA 32. Efeito do pH na estabilidade da $\beta$ -amilase do <i>Bacillus polymyxa</i>	106
FIGURA 33. Efeito da temperatura na atividade da $\beta$ -amilase do <i>Bacillus megaterium</i>	107
FIGURA 34. Efeito da temperatura na atividade da $\beta$ -amilase do <i>Bacillus polymyxa</i>	108
FIGURA 35. Efeito da temperatura na estabilidade da $\beta$ -amilase do <i>Bacillus megaterium</i>	109
FIGURA 36. Efeito da temperatura na estabilidade da $\beta$ -amilase do <i>Bacillus polymyxa</i>	110

- FIGURA 37. Hidrólise do amido pela ação da  $\beta$ -amilase do *Bacillus megaterium* 111
- FIGURA 38. Hidrólise do amido pela ação da  $\beta$ -amilase do *Bacillus polymyxa* 112
- FIGURA 39. Efeito da concentração do substrato na velocidade de reação da  $\beta$ -amilase do *Bacillus megaterium* 113
- FIGURA 40. Efeito da concentração do substrato na velocidade de reação da  $\beta$ -amilase do *Bacillus polymyxa* 114

## SUMMARY

Of 851 micro-organisms (fungi and bacteria) obtained from various sources (soil, water, vegetables) two strains of  $\beta$ -amylase producing bacteria were isolated, employing potato agar and nutrient agar as culture media.

These strains were identified as *Bacillus megaterium* and *Bacillus polymyxa*.

The  $\beta$ -amylase production of these bacteria was studied at different temperatures to determine the best temperature range of fermentation. The range for *Bacillus megaterium* was between 26<sup>o</sup>-29<sup>o</sup>C and for *Bacillus polymyxa* between 34<sup>o</sup>-36<sup>o</sup>C. The effect of various carbohydrate and nitrogen sources and their concentrations was also studied.

The best culture medium for the  $\beta$ -amylase production by *Bacillus megaterium* was: 0,5% starch, 1% soybean flour, 1% of yeast extract; and in the case of *Bacillus polymyxa* : 2% starch, 1% casein, 1% of yeast extract. The method used for assessing the production of  $\beta$ -amylase in relation to pH and cellular mass, was rotatory shake and mini-fermentation at the temperature of 28<sup>o</sup>C for *Bacillus megaterium* and 35<sup>o</sup>C for *Bacillus polymyxa*, during 60 hours.

After centrifugation the supernatant of the culture

was used as the  $\beta$ -amylase source and purified as follows: precipitation was effected with 80% solution of  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; the precipitate was dialysed and fractioned using DEAE-cellulose and CM-cellulose columns.

A comparative characterization of the activity of the  $\beta$ -amylases obtained, showed following results: best conditions for *Bacillus megaterium* were pH6.5 and a temperature of 40<sup>o</sup>-45<sup>o</sup>C, the enzyme being stable in the range of pH5.0-7.5 and inactivated above 55<sup>o</sup>C. The  $k_m$  was 0.52mg/ml,  $V_{max}$  1.02 $\mu$ mol/min/mg, and the percentage of starch hydrolysis was 61.3. For *Bacillus polymyxa* the optimum pH and temperature were 7.0 and 45<sup>o</sup>C, respectively, the enzyme being stable in the range between pH4.0 and 9.0, and inactivated above 60<sup>o</sup>C. The  $k_m$  was 1.92mg/ml,  $V_{max}$  1.04 $\mu$ mol/min/mg and the degree of starch hydrolysis was 68.8%.

## RESUMO

No presente trabalho desenvolvemos um estudo referente a duas cepas de bactérias produtoras de  $\beta$ -amilase, representantes de um total de 851 microrganismos (fungos e bactérias), isolados de diferentes fontes (solo, água, vegetais), usando os meios de cultura agar batata e agar nutriente com amido a 1%.

Identificamos estas cepas como *Bacillus megaterium* e *Bacillus polymyxa*.

Estudamos a produção de  $\beta$ -amilase por estas bactérias em diferentes temperaturas, para verificarmos a faixa ótima de temperatura de fermentação. Esta faixa foi, para *Bacillus megaterium*, de 26° a 29°C e, para *Bacillus polymyxa*, de 34° a 36°C. Estudamos também a influência de diferentes fontes de carboidrato e nitrogênio e suas concentrações.

O melhor meio de cultura para a produção de  $\beta$ -amilase do *Bacillus megaterium* foi amido 0,5%, farinha de soja 1% , extrato de levedura 1%, e, para a  $\beta$ -amilase do *Bacillus polymyxa*, amido 2%, caseína 1% e extrato de levedura 1%. O método usado para verificar a produção dessas  $\beta$ -amilases em relação ao pH e à massa celular foi o de agitação rotatória e mini-fermentação, nas temperaturas de 28°C para *Bacillus megaterium* e 35°C para *Bacillus polymyxa* durante 60 horas.

Depois da centrifugação usamos o sobrenadante da cultura como fonte da enzima, a qual foi purificada pela precipitação com  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  a 80% e o precipitado foi dialisado e fracionado em colunas de DEAE-celulose e CM-celulose.

A caracterização comparativa da atividade dessas  $\beta$ -amilases mostrou os seguintes resultados: para o *Bacillus megaterium* as condições ótimas foram pH 6,5 a temperatura 40°-45°C, sendo a enzima estável na faixa de pH 5,0-7,5 e inativada a temperatura acima de 55°C ; o Km foi de 0,52mg/ml e a Vmax 1,02  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ ; a percentagem de hidrólise do amido foi 61,3%. Para o *Bacillus polymyxa* o pH e a temperatura ótima foram 7,0 e 45°C, respectivamente, sendo a enzima estável na faixa de pH 4,0 a 9,0 e inativada acima de 60°C; o Km foi 1,92mg/ml e Vmax 1,04  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ ; a percentagem de hidrólise do amido foi 68,8%.

## INTRODUÇÃO

Nos últimos anos a maltose, devido às suas propriedades higroscópicas e grau de doçura, tem sido empregada com sucesso, não apenas na indústria de alimentos, como também na farmacêutica.

A maltose pode substituir a sacarose em dietas especiais, em determinados casos em que a sacarose é suscetível de causar problemas orgânicos, podendo também substituir a glicose com vantagens, quando usada na forma injetável. O maltitol produzido pela redução da maltose, por não apresentar uma completa metabolização, tem sido usado como produto dietético, sendo mais doce que a maltose e apresenta o mesmo grau de doçura que a sacarose quando nas concentrações de 20%.

De outra parte, xaropes de alta concentração em maltose têm sido usados, com vantagens, na produção de pudins, gelêias, sorvetes, doces e pães.

A produção de maltose se dá principalmente a partir do amido com a enzima  $\beta$ -amilase, a qual pode ser de origem vegetal, mas recentemente foram descobertos microrganismos produtores de  $\beta$ -amilase.

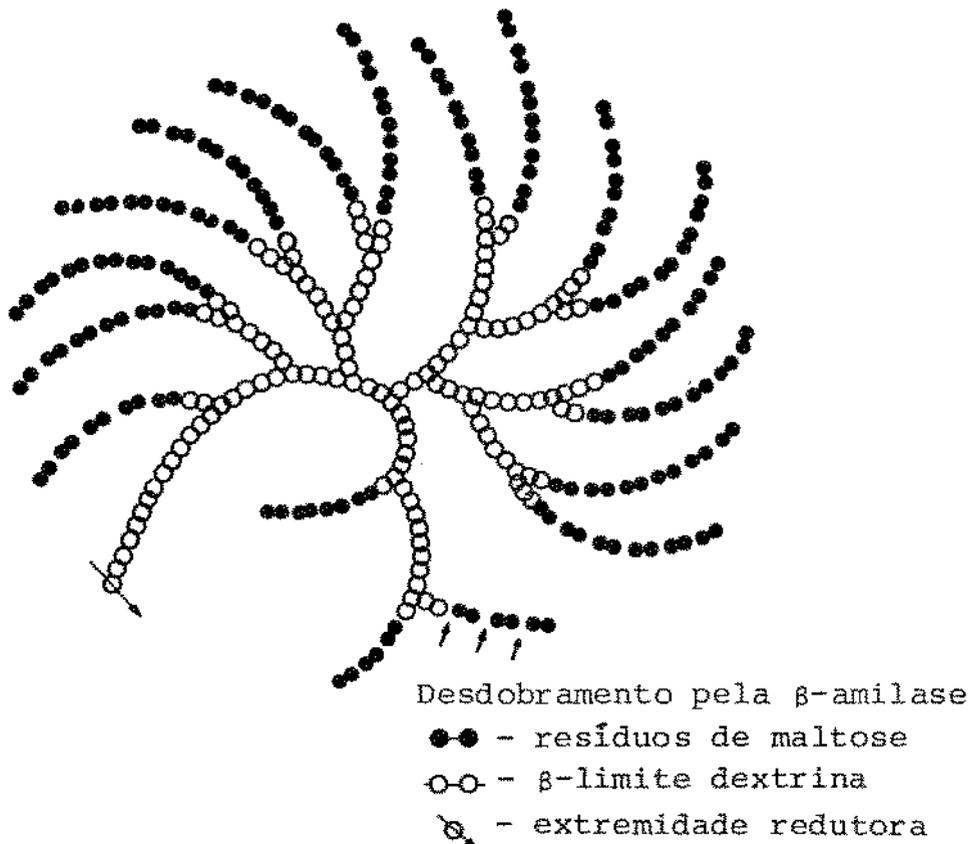
O presente trabalho teve como objetivo principal isolar microrganismos produtores de  $\beta$ -amilase, além de otimizar

as condições de produção desta enzima, assim como efetuar a sua caracterização. Algumas condições de produção de maltose com  $\beta$ -amilase microbiana foram também estudadas.

## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A  $\beta$ -amilase ( $\alpha$ -1,4-glucan maltohidrolase, E.C.3.2.1.2.) hidrolisa sucessivamente as ligações  $\alpha$ -1,4 glucosídicas do amido e glicogênio das extremidades não-redutoras da cadeia, até os pontos de ramificações, produzindo maltose e deixando uma dextrina, conhecida como  $\beta$ -limite dextrina. Tal é devido à mudança configuracional do carbono 1 de  $\alpha$  para  $\beta$ , que é denominada  $\beta$ -amilase, chamada também de amilase sacarogênica (27, 43, 57, 62, 63, 64, 66).

A Figura 1., abaixo mostra a ação da  $\beta$ -amilase sobre a amilopectina (27).



O Quadro 1. mostra algumas semelhanças e diferenças entre a  $\alpha$ -amilase e a  $\beta$ -amilase (57).

Quadro 1. Similaridades e diferenças das amilases (57, 25)

CARACTERÍSTICAS	$\alpha$ -AMILASE	$\beta$ -AMILASE
Pontos de hidrólise	$\alpha+1,4$ ligações glucosídicas rompe ligação $C_1-O'_4$	$\alpha+1,4$ ligações glucosídicas rompe ligações $C_1-O'_4$
Configuração das novas unidades redutoras	$\alpha$	$\beta$
Produtos finais	mist. oligossacarídeos	maltose
Mecanismo de ação	endo	exo
Diminuição da viscosidade e da coloração com iodo	rápida	lenta
Ação sobre os pontos de ramificações	pode ultrapassar	não pode ultrapassar
Atividade da transferase	insignificante	insignificante
Origem	plantas, animais e microrganismos	plantas

#### A. $\beta$ -amilase dos vegetais

A  $\beta$ -amilase foi descoberta por Ohlsson (40), encontrando-se nas plantas superiores e nas sementes das gramíneas, próxima à camada de aleurona e ligada à gluteína (57).

Das  $\beta$ -amilases conhecidas da cevada, trigo, arroz, milho, soja, aveia, centeio, sorgo e batata doce, apenas quatro foram cristalizadas: as da batata doce, do malte (cevada), do trigo e da soja (25).

#### Batata doce

Ball *et al.* (4, 5) obtiveram uma proteína cristalizada com alta atividade de hidrolisar e produzir açúcares redutores de amido, a partir do extrato de batata doce. Esta proteína estava livre da  $\alpha$ -amilase e foi reconhecida como  $\beta$ -amilase. A enzima cristalizada apresentou cerca de 10 vezes mais atividade do que a preparação original. As características da atividade desta  $\beta$ -amilase eram um pH ótimo de 4 a 5 (tampão acetato) e a hidrólise de aproximadamente 60% de amido. O exame no espectroscópio não indicou que a enzima continha um metal pesado ou um grupo prostético.

Bernfeld (6), após recristalizações (6 a 8 vezes), obtiveram uma enzima livre de  $\beta$ -amilase, maltase e fosfatase ácida. A composição desta amilase era de 15,10% de nitrogênio

(Kjeldahl), 0,83% de nitrogênio aminado, 1,16% de nitrogênio a mídico, 6,0% de arginina, 7,0 de tirosina, 0,79% de cistina, 4,32% de metionina e 0,66% de cinzas. O peso molecular calculado por sedimentação e difusão foi de  $152.000 \pm 1.500$ . O ponto isoelétrico foi determinado por eletroforese, 4,74 a 4,79. Uma molécula de  $\beta$ -amilase de batata doce foi capaz de hidrolisar 250.000 ligações  $\alpha$ -1,4 glucosídicas por minuto, a  $30^{\circ}\text{C}$  e pH4,8. O efeito do pH na atividade enzimática em tampão citrato foi mais pronunciado na faixa de 5-6. Segundo o autor, as propriedades da  $\beta$ -amilase da batata doce e sua ação em poliglucosanas (amilose, amilopectina, glicogênio e dextrinas) mostra que a amilose foi convertida quase que completamente em maltose, a amilopectina produziu 60% de maltose e 40% de uma dextrina de alto peso molecular.

Na ação de ativadores e inibidores, verificada por England *et al.* (13, 14), a enzima mostra não requerer íons de  $\text{Cl}^-$  ou  $\text{Ca}^{++}$  para a sua atividade e os reagentes que identificam os grupos -SH, como o p-cloromercuriobenzoato, nitrato de prata, cloreto de mercúrio, o-iodosobenzoato, são fracos inibidores para enzima e esta foi facilmente reativada com adição de glutathione ou 1,2-ditiopropanol. Comparada com a  $\beta$ -amilase do malte, o mesmo autor verificou ainda que a  $\beta$ -amilase da batata doce exibia uma mesma velocidade de sacarificação para

dextrina que, indicando uma mesma atividade específica, porém diferiu nas suas propriedades físico-químicas.

Thomas *et al.* (56) estudaram a influência dos grupos tiol (-SH) sobre a atividade da  $\beta$ -amilase bruta e modificada (carboxiamido-metilada), através da composição dos aminoácidos, cromatografia de troca iônica, estabilidade térmica e ação hidrolítica. O gradiente de pH mostrou dois picos, pK3,7 e pK7,5, nos quais estava envolvida a atividade da enzima bruta. A reação dos grupos -SH superficiais com o iodoacetamida mostrou uma perda de atividade enzimática. Quando dois resíduos de cisteína por unidade de monômero (P.M. 50.000) da enzima foram reagidos, a atividade foi diminuída de um fator de 50. A enzima modificada apresentou os mesmos pKs da enzima bruta. Concluíram, portanto, que os grupos -SH superficiais não são essenciais para a ação enzimática e que a modificação de um desses grupos, alterava apenas a velocidade da ação enzimática, sem alterar o mecanismo de hidrólise.

#### Malte (cevada)

A purificação e cristalização da  $\beta$ -amilase do malte foi relatada por Fischer *et al.* (16). O extrato aquoso do malte continha duas enzimas, a  $\alpha$ -amilase e a  $\beta$ -amilase e cerca de 30% de carboidratos (açúcares redutores e polissacarídeos). A

eliminação da  $\alpha$ -amilase foi efetuada ajustando-se o pH do filtrado aquoso a pH3,6 (ácido acético) por 30 minutos. A purificação foi efetuada ajustando-se o pH do filtrado aquoso a pH5,0 e saturando-se com  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  a 60%; o precipitado obtido foi dissolvido em água e fracionado com acetona a 40-50% (1º fracionamento). O precipitado obtido foi novamente dissolvido em água, corrigindo-se o pH para 7,8. Realizou-se o 2º fracionamento com acetona a 51-56%. Neste precipitado obtido, a  $\beta$ -amilase estava pura. A cristalização da  $\beta$ -amilase foi realizada em sílica-gel a 5°C.

Piquet e Fischer (44) estudaram as propriedades da  $\beta$ -amilase do malte. A enzima cristalizada obtida tinha uma atividade sacarogênica de 1.650mg de maltose/mg N<sub>2</sub> enzima, a pH5,2 e 50°C e a atividade dextrinogênica de 62. A estabilidade da enzima ao pH foi entre 4,5 e 8,0 a 25°C. A atividade da  $\beta$ -amilase mostrou não ter influência de alguns íons ( $\text{Cl}^-$  e  $\text{Ca}^{++}$ ). A enzima era uma albumina muito solúvel em água, 45mg/ml e estável em solução aquosa por um longo período quando resfriada. O ponto isoelétrico determinado por eletroforese foi 6,1. A enzima não teve ação sobre a  $\alpha$ -fenilmaltose.

### Trigo

A  $\beta$ -amilase do trigo foi purificada e cristalizada

por Meyer *et al.* (32). A enzima foi obtida por extração ácida da farinha, para inativar a  $\alpha$ -amilase. O filtrado obtido foi adicionado a uma mistura de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 + \text{NaCl}$  (1:2) a 15%. O precipitado foi dissolvido em água e fracionado com acetona. Foram obtidos cerca de 250mg de enzima de 4kg de farinha. A enzima mostrou apenas um componente em eletroforese (microeletroforese) e não teve ação sobre a maltose, salicina, floridizina e celulobiose. Portanto, a enzima purificada estava livre da maltase,  $\beta$ -glucosidase,  $\alpha$ -amilase. Esta  $\beta$ -amilase era extremamente solúvel em água e estável com  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  por, pelo menos, 6 meses, sem perda da atividade quando resfriada. A  $\beta$ -amilase do trigo apresentou uma atividade de 1.450mg/maltose/mg  $\text{N}_2$  enzima a pH 5,3 e 50°C. O ponto isoelétrico foi de 6,0, a estabilidade ao pH de 4,5 a 9,2 e 20°C. Os íons  $\text{Cl}^-$  e  $\text{Ca}^{++}$  não foram necessários para a atividade da enzima. Os metais pesados ( $\text{Cu}^+$  e  $\text{Hg}^{++}$ ) inativaram rápida e irreversivelmente a enzima. As propriedades da  $\beta$ -amilase do trigo foram semelhantes às da  $\beta$ -amilase do malte (cevada).

Tipplés e Thachuk (58, 59) isolaram e caracterizaram a  $\beta$ -amilase de trigo canadense (duro, vermelho, primavera). A extração, com solução salina e purificada em coluna de DEAE-celulose apresentou uma  $\beta$ -amilase com 5 frações A, B, E (as maiores), C e D (as menores). A extração com água apresentou uma

$\beta$ -amilase com uma fração. As caracterização dos componentes A, B e E apresentou um pH ótimo de 5,4-4,6, 5,2 e 6,2, respectivamente. O coeficiente de sedimentação foi 4,565 e o de difusão de  $6,48 \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ sec}^{-1}$ . O volume específico, baseado nos aminoácidos foi 0,733ml/g e o peso molecular de 642.000. A análise dos aminoácidos indicou que os componentes A, B e E da  $\beta$ -amilase, possuem composição semelhante, existindo no componente E um alto conteúdo de glicina e metionina. Todos os 3 componentes possuíam 4 grupos -SH e uma ligação S-S.

Niku-paavola *et al.* (39) estudaram a  $\beta$ -amilase do trigo (*Triticum vulgare* var. *capelle*) por eletroforese de focalização, verificando que havia uma  $\beta$ -amilase livre e outra ligada, no trigo germinado. O resultado demonstrou a heterogeneidade da  $\beta$ -amilase do trigo natural. A enzima livre teve pontos isoelétricos de 4,8, 4,9, 5,6 e 5,8. Esses resultados sugeriram que era a mesma a base estrutural dos diferentes componentes da  $\beta$ -amilase.

### Soja

Street e Bailey (53) estudaram os carboidratos e as enzimas da soja. Verificaram que a soja tinha 0,5% de amido, 3,14% de dextrinas, 4,95% de pentosanas, 4,86% de galactosanas, 3,29% de celulose e a presença de várias enzimas, tais como a

urease, amilase, proteases, oxidases e lipases.

Orestano e Zummo (42) relataram que o extrato aquoso da soja, depois de um tratamento térmico, não indicou a existência de duas diferentes amilases. Os estudos efetuados por Orestano (41) mostraram que a soja tinha duas amilases: uma que liquefazia o amido e outra que o sacarificava. Orestano (41), em 1933, relatou que a amilase da soja continha apenas uma amilase e, provavelmente, do tipo  $\beta$ -amilase. Bray verificou que a atividade da amilase da soja não aumentava durante a germinação.

Newton e Naylor (38) estudaram a concentração e caracterização da  $\beta$ -amilase de soja. Fizeram uma extração aquosa do grão e fracionaram com álcool etílico a 65%. O precipitado obtido mostrou uma produção de 0,3 a 0,5% e tinha característica sacarogênica - 1mg produzia entre 1.300 a 1.360mg de maltose.

Martin (31) e Newton *et al.* (36) fizeram estudos da ação da  $\beta$ -amilase da soja sobre vários amidos (milho, trigo, arroz, batata, mandioca). A  $\beta$ -amilase (700mg) foi adicionada a 100ml de uma solução de amido a 6% por 5 horas a 40°C, pH4,7. Foi verificada uma hidrólise para amido de milho de 88,24%, amido de arroz 74,82%, amido de trigo 91,60%, amido de batata 85,94% e amido de mandioca 89,15%.

A purificação e a cristalização da  $\beta$ -amilase da soja foram obtidas por Fukumoto e Tsujisaka (17, 18). O extrato aquoso da soja foi tratado com acetato de chumbo a 25%, seguido de fracionamento com  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , que variou de 25 a 55% de saturação. Verificaram que a  $\beta$ -amilase cristalina era semelhante à  $\beta$ -amilase do malte (cevada). Os autores também reconheceram a existência de uma fração amilolítica denominada enzima-Z ( $\alpha$ -amilase).

Gertler e Birk (19) fizeram a purificação e caracterização da  $\beta$ -amilase da soja. Obtiveram uma  $\beta$ -amilase pura por extração ácida da farinha desengordurada (sem tratamento térmico), seguida de fracionamento com  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  a 60% e fracionamento em cromatografia de coluna com  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , DEAE-celulose, Sephadex, G-25, CM-celulose. A enzima pura tinha 16,3% de N<sub>2</sub> (Kjeldahl) e 17,3% por medida em espectrofotometria (280nm). A sua atividade específica foi de 880 unidades, o peso molecular de 61.700 e o ponto isoelétrico de 5,85. Verificaram que o ácido glutâmico era o N-terminal da molécula, constituída de 617 resíduos de aminoácidos. O pH ótimo foi entre 5 e 6. Um pré-tratamento da enzima entre pH 3 e 5 diminuiu a atividade e a pH 6 a 9 a atividade não foi afetada.

## B. $\beta$ -amilase dos microrganismos

Whitaker (65), Richardson (46), Underkofler (62) e Kulp (25) citaram que a  $\beta$ -amilase ocorre apenas nos tecidos vegetais e consideraram duvidosa a sua ocorrência em microrganismos. Entretanto, recentemente, vários autores descobriram certas linhagens de microrganismos que produzem a  $\beta$ -amilase.

### *Bacillus polymyxa*

Muitos autores estudaram a amilase produzida pelo *Bacillus polymyxa*, mas não caracterizaram totalmente a sua ação (12, 24, 45, 48).

A purificação e a verificação da ação hidrolítica da  $\beta$ -amilase produzida pelo *Bacillus polymyxa* ATCC 8523, foram estudadas por Robyt e French (47). A amilase foi purificada pela precipitação com  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  a 50% e solventes orgânicos (álcool butírico e n-propanol). A  $\beta$ -amilase produzia  $\beta$ -maltose como produto dominante quando hidrolisou a amilose, amilopectina e glicogênio. Esta enzima hidrolisou a maltooctaose para dar maltose e maltotriose e maltotetraose. Hidrolisou também a Schar-dinger-dextrina, produzindo maltose e maltotriose. Esta amilase era semelhante à  $\alpha$ -amilase descoberta em animais e bactérias, pela capacidade de passar as ligações  $\alpha$ -1,6-glucosídicas da amilopectina e glicogênio e não requeria grupo não-redutor

no final da cadeia para a sua ação; era semelhante à  $\beta$ -amilase das plantas superiores, devido à produção de  $\beta$ -maltose. Portanto, esta amilase não parecia uma das amilases já descritas, como a  $\alpha$ -amilase ou  $\beta$ -amilase, porque hidrolisava a Schardinger-dextrina.

Griffin e Forgarty (21) estudaram uma enzima amilolítica produzida pelo *Bacillus polymyxa* tipo NCIB 8158, contendo amido e peptona. Os metais adicionados e que melhoraram o efeito da produção da enzima foram  $\text{Ca}^{++}$  e  $\text{Mg}^{++}$ . O controle do pH que era crítico para o estabelecimento das condições de produção ficou entre 6,8 e 7,1. A maior atividade da enzima que apareceu durante a fase estacionária de crescimento não foi devida à autólise da célula, porque os níveis de enzima intracelular foram muito baixos durante a fermentação. Portanto, esta amilase parecia extracelular.

Marshall (30) caracterizou a  $\beta$ -amilase produzida pelo *Bacillus polymyxa* tipo ATCC 8523 como uma exo-ação ( $\alpha$ -1,4-D-glucan-maltohidrolase). Verificou a ação hidrolítica sobre a amilopectina pela  $\beta$ -amilase do *Bacillus polymyxa* e  $\beta$ -amilase da batata doce, mostrando a sua similaridade, obtendo 60% de conversão em maltose. A exo-ação da enzima microbiana foi testada sobre a amilose oxidada, havendo apenas uma pequena hidrólise de 9%, sendo similar à obtida pela  $\beta$ -amilase da batata doce. A

incubação da  $\beta$ -amilase do *Bacillus polymyxa* (1 unidade/mol) com a  $\beta$ -dextrina Schardinger durante 2 horas, resultou apenas 0,7% de hidrólise. Com isso, mostrou que a ação padrão e os produtos da  $\beta$ -amilase do *Bacillus polymyxa* eram basicamente os mesmos que os da  $\beta$ -amilase da batata doce.

#### *Bacillus megaterium*

Higashihara e Okada (23) estudaram uma amilase extracelular produzida pelo *Bacillus megaterium* (cepa n932). Esta amilase foi 2.600 vezes purificada quando fracionada com  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  e filtrada em coluna de Sephadex G-100. A enzima mostrou ser mais ativa a pH 6,5 e estável na faixa de pH entre 5 e 7. A atividade da enzima foi inibida pelo p-cloromercuriobenzoato e reativada completamente pela adição de cisteína. O ponto isoelétrico foi 9,1. O resultado com o experimento no qual o maltooligossacarídeo com a glicose terminal marcada ( $\text{C}^{14}$ ) usada como substrato, mostrou que a enzima removia duas unidades de glicose (maltose) da parte não-redutora da cadeia. Com esses resultados, concluíram que a enzima parecia ser semelhante à  $\beta$ -amilase das plantas superiores quanto a sua ação.

#### *Bacillus cereus*

Takasaki (54, 55) estudou a produção, utilização e

purificação da  $\beta$ -amilase e pululanase do *Bacillus cereus* var. *mycoides* isolada do solo. Esta bactéria tinha a capacidade de produzir ambas as enzimas, importantes para a produção de maltose a partir do amido. Ambas as enzimas foram purificadas pelo fracionamento com  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  e em coluna Sephadex G-100. A  $\beta$ -amilase produziu apenas maltose da amilose, amilopectina e glicogênio. A pululanase produziu maltose, maltotriose e malto tetraose da  $\beta$ -limite dextrina e maltotriose do pululan, mas não da amilose e amilopectina. O pH ótimo da amilase foi 7,0 e o da pululanase foi entre 6 e 6,5. A temperatura ótima foi de 50°C para ambas as enzimas. A atividade da  $\beta$ -amilase foi inibida pelo p-cloromercuriobenzoato e restabelecida pela adição de cisteína. O peso molecular para  $\beta$ -amilase foi estimado em  $35.000 \pm 5.000$ .

#### Outros microrganismos

Vários microrganismos produtores de  $\beta$ -amilase foram isolados do solo por Shink *et al.* (49). Das cepas isoladas, a n°13 e a n°14 pertenciam ao gênero *Streptomyces* a cepa BQ6 ao gênero *Pseudomonas* e a cepa BQ10 ao gênero *Bacillus*.

A produção da  $\beta$ -amilase pela *Pseudomonas* BQ6 (50) foi melhor no meio de cultura composto de amido 3%, polipeptona 3%, NaCl 0,5% e pH 7,0, incubado a 30°C durante 4 dias. O pH ótimo

para a atividade da enzima foi entre 6,5 e 7,4 e a temperatura ótima de 45°C a 55°C. A enzima foi estável na faixa de pH de 6,5 a 8,0 a 30°C por 24 horas, mas foi inativada completamente a 60°C por 15 minutos.

A produção da  $\beta$ -amilase do *Bacillus* BQ10 (51) foi semelhante à da *Pseudomonas* BQ6, usando-se a temperatura de 30°C durante 3 dias. Esta  $\beta$ -amilase apresentou 3 frações na cromatografia de coluna em Sephadex. As propriedades da fração I e da fração II, pH e temperatura ótima foram 6,0 e 7,0 e 45°C e 50°C respectivamente. A fração III foi desprezada devido à pouca atividade enzimática.

## MATERIAL E MÉTODOS

## 1. Materiais

## 1.1. Reagentes químicos

Os reagentes utilizados foram pró-análisis, obtidos de diferentes firmas: Backer, Carlo Erba, Merck, Reagen e Sigma.

## 1.2. Reagentes para meio de cultura, da firma Difco Laboratories.

## 1.3. Equipamentos utilizados

- Estufas	Fanem
- Estufa a vácuo	Fanem
- Autoclave	Fabbe M-103
- Banho termostático	Fanem PA:32683
- Incubador de temperatura Gradiente	Scientific Industries Inc.
- Agitador magnético	Fisaton
- Microscópio	Zeiss e Nikon
- Balança analítica	Sauter M-414 e SD-2000
- Agitador rotatório	Fermentation Design Inc.

- Fermentador	Mini-ferm, New Brunswick Scientific Co., M-1000
- Potenciômetro	Horiba H-5
- Centrífuga	Beckman Model J-21 B
- Espectrofotômetro	Perkin-Elmer-Double-Bean Coleman, 124D
- Espectrofotômetro	Coleman 295E
- Espectrofotômetro	Bausch&Lomb, Spectronic 20
- Coletor de frações	Gilson Co.
- Conjunto de cromatografia de papel	
- Liofilizador	Virtis Mod.nº10- 146 MR - BA

## 2. Métodos

### 2.1. Seleção de microrganismos

Foram utilizadas amostras de diferentes fontes (solo, água, vegetais) para o isolamento de microrganismos. As amostras de ±100g de solo e água foram coletadas nos arredores de Campinas, SP, e acondicionadas em frascos de vidro esterilizados. Cerca de 100g de amostras de vegetais (grãos, raízes e tubérculos) fo

ram adquiridas na Fazenda Santa Elisa, Campinas, SP, e acondicionadas em frascos de vidro esterilizados.

## 2.2. Isolamento de microrganismos

Cerca de 1,0g de amostra (solo, água e vegetais) foi acondicionado a 10ml de água esterilizada contida em tubos de rosca, os quais foram agitados e deixados em repouso por 10 minutos.

As placas de Petri contendo agar nutriente com amido a 1% e agar batata foram inoculadas com o líquido sobrenadante dos tubos, pelo método de estrias, com auxílio da alça. As placas foram incubadas a 30°C por 24 e 48 horas para o desenvolvimento de bactérias e 3 a 5 dias para os fungos.

As colônias que cresceram nas placas, cujo halo incolor era verificado após teste de vapores de iodo, foram transferidas para tubos de ensaio contendo os devidos meios de cultura e incubados a 30°C até o desenvolvimento satisfatório do microrganismo.

## 2.3. Teste para verificação da produção da amilase

Para verificar a presença da amilase dos microrganismos isolados, produtores de enzimas amilolíticas das diferentes fontes, usou-se o seguinte meio de cultura: extrato de le-

vedura, 1%; triptona, 1%; amido, 1%; pH7,0. O meio de cultura foi distribuído em frascos Erlenmeyer de 250ml, num volume de 20ml e esterilizados a 121°C por 15 minutos. Os frascos Erlenmeyer foram inoculados com os microrganismos isolados e colocados no agitador rotatório, mantendo-se uma rotação constante de 250r.p.m., temperatura de incubação de 27° a 29°C por um período de 24 a 48 horas para as bactérias e 3 a 5 dias para os fungos.

#### 2.4. Análise cromatográfica em papel

A cultura ( $\pm 10$ ml) de cada microrganismo foi centrifugada a 8000xg por 10 minutos e o sobrenadante foi usado como a fonte de enzima.

##### Técnica cromatográfica

- a. em um tubo de ensaio contendo 9ml de uma solução de amido a 1%, adicionou-se 1ml do sobrenadante da cultura;
- b. incubou-se a mistura (sobrenadante + solução amido) em banho termostático a 40°C por uma noite, colocando-se gotas de toluol no tubo de ensaio;
- c. a mistura (40 $\mu$ l) foi aplicada em papel de cromatografia Whatman n°3 (18x43cm). Aplicou-se 40 $\mu$ l de uma solução padrão de açúcares (0,1%) contendo de 1 a 6 unidades de glicose, pa

ra comparação;

- d. o cromatograma de papel foi corrido no sentido ascendente , no sistema de solventes piridina:n-butanol:água (1:6:3) por 40h a temperatura ambiente;
- e. a localização dos açúcares no cromatograma foi revelada pelo reagente  $\text{AgNO}_3$  e solução alcoólica NaOH, segundo Trevelyan *et al.* (52);
- f. após a leitura dos açúcares, onde se observou a localização da glucose, maltose, maltotriose, maltotetraose e maltopentaose, selecionou-se as cepas que produziram a maltose com a maior intensidade.

## 2.5. Avaliação da atividade enzimática

A cultura ( $\pm 10\text{ml}$ ) de cada microrganismo selecionado, como produtor de  $\beta$ -amilase, foi centrifugada a  $8000 \times g$  por 10 minutos e avaliou-se a atividade enzimática no sobrenadante do seguinte modo:

- a. em um tubo de ensaio contendo 9ml de substrato (solução de amido a 1%) adicionou-se 1ml do sobrenadante da cultura;
- b. incubou-se a mistura (sobrenadante + substrato) em banho termostático a  $40^\circ\text{C}$  por 30 minutos;
- c. retirou-se 1ml da mistura e avaliou-se o poder redutor formado na solução de amido pelo método de Somogy-Nelson (46,

35) e correlacionou-se com uma curva padrão para maltose.

#### Preparo do substrato

Em um becker de 250ml, pesou-se 2g de amido solúvel, (batata), adicionou-se 100ml de água destilada e aqueceu-se com agitação até a gelatinização do amido. Esfriou-se e completou-se a 200ml em balão volumétrico com solução tampão fosfato 0,1 M a pH7,0.

#### 2.6. Definição da unidade de atividade da $\beta$ -amilase

Uma unidade de atividade enzimática é a quantidade na qual 1 $\mu$ mol de maltose é produzida por minuto nas condições descritas no item 2.5..

#### 2.7. Métodos de identificação dos microrganismos

As linhagens de microrganismos selecionados como produtores de  $\beta$ -amilase foram identificadas segundo Wolf e Barker (54), Field (13), Manual 427 (18) e Manual Bergey's (5). Empregaram-se as técnicas do Manual de Laboratório para Alimentos Enlatados e Processos (24) para as características morfológicas e fisiológicas.

## 2.8. Condições de produção da $\beta$ -amilase microbiana

Foram usadas, para produção, as linhagens dos microrganismos testados como produtores de  $\beta$ -amilase, selecionadas pela cromatografia de papel.

Para essa produção, estudou-se:

### 2.8.1. Faixa de temperatura ótima de produção e temperatura ótima de crescimento

Utilizou-se o incubador de temperatura gradiente num intervalo entre 20° e 55°C, agitação de 70 ciclos/min, durante 24h de incubação. Os meios de cultura usados foram: a) amido 1%, extrato de levedura 1%, pH7,0; b) maltose 1%, triptona 1%, extrato de levedura 1%, pH7,0. Os tubos do incubador, contendo 10ml do meio de cultura, foram inoculados com 0,05ml de uma suspensão de células do microrganismo produtor da  $\beta$ -amilase, lavadas (3 vezes) assepticamente, com tampão fosfato pH7,0. O inóculo do microrganismo foi desenvolvido no meio de cultura correspondente, incubado entre 27° e 29°C, no agitador rotatório, a 250r.p.m. por 16 horas.

A atividade enzimática a cada temperatura foi medida após 24h, segundo o item 2.5.. A leitura da massa celular para determinação do crescimento microbiano foi medida a 600nm. Foram feitas leituras a intervalos de 15min e a constante K de

crescimento foi determinada da porção retilínea de maior declive da curva de crescimento, utilizando-se a seguinte equação:

$$K = \frac{2,303 (\log A_2 - \log A_1)}{T_2 - T_1}$$

onde  $A_2$  e  $A_1$  são as absorbâncias lidas nos tempos  $T_2$  e  $T_1$ , respectivamente.

### 2.8.2. Meio de cultura

- a. estudou-se várias fontes de carboidratos usados na concentração de 1% e o meio base foi triptona 1%, pH7,0;
- b. estudou-se várias fontes de nitrogênio na proporção de 1%, tendo como meio básico extrato de levedura 1%, amido 1%, pH 7,0;

Os meios foram inoculados com microrganismos produtores de  $\beta$ -amilase, colocados no agitador rotatório a 250r.p.m., incubados nas respectivas temperaturas ótimas, de acordo com o item 2.8.1., durante 24h. Após esse tempo, foram medidas a massa celular, a atividade enzimática e o pH.

A massa celular foi determinada colocando-se 20ml da cultura em tubo de centrífuga, centrifugando-se a 8000xg por 10min e secando o precipitado em estufa a vácuo a 80°C por 6 a 8 horas. No sobrenadante foram determinados o pH e a atividade

enzimática, segundo o item 2.5.

### 2.8.3. Método de fermentação

Foram utilizados os seguintes meios de cultura:

- a. amido 1%, triptona 1%, extrato de levedura 1%, pH7,0;
- b. maltose 1%, triptona 1%, extrato de levedura 1%, pH7,0;
- c. glucose 1%, triptona 1%, extrato de levedura 1%, pH7,0;
- d. glucose 0,5%, maltose 0,5%, triptona 1%, extrato de levedura 1%, pH7,0.

O inóculo foi preparado colocando-se 80ml do meio de cultura em frasco Erlenmeyer de 500ml, inoculando-se o microrganismo produtor de  $\beta$ -amilase e colocando-se o frasco no agitador rotatório com agitação de 250r.p.m. a temperatura ótima de produção do microrganismo durante 16h.

#### a. Mini-fermentador

Usou-se 700ml de meio de cultura para a fermentação, adicionando-se 1% (v/v) de inóculo ( $\pm 10^7$  bact/ml) de células lavadas (3 vezes) assepticamente e incubou-se a temperatura ótima de produção para cada microrganismo durante 60h, mantendo-se uma aeração de 1 volume/volume/minuto.

#### b. Agitador rotatório

A fermentação no agitador rotatório foi realizada em frascos Erlenmeyer de 500ml contendo 90ml de meio de cultura, sendo adicionado 1% (v/v) de inóculo ( $\pm 10^7$  bact/ml) de células lavadas (3 vezes) assepticamente, mantendo-se uma agitação de 250r.p.m. e incubando-se a temperatura ótima para cada microrganismo durante 60 horas.

Foram retiradas alíquotas do meio de cultura de hora em hora durante as primeiras 10 horas de fermentação e, posteriormente, de 4 em 4 horas, para o estudo da relação entre a produção de enzima, alteração do pH e crescimento do microrganismo durante a fermentação. O crescimento dos microrganismos foi determinado pela leitura no espectrofotômetro a 660nm, após a massa celular ter sido lavada 3 vezes por centrifugação, e ressuspendida com água destilada. Correlacionou-se a medida da absorbância com o peso seco da massa celular, secando-se a massa celular em estufa a vácuo a 80°C por 6 a 8 horas. Foram controladas, durante o crescimento dos microrganismos, as formas vegetativas e esporuladas pelo método de coloração de Gram. Para determinar a produção de enzima, foi medida a atividade enzimática no sobrenadante da cultura, segundo o item 2.5.

Foram também detectados, cromatograficamente, o consumo da fonte de carboidrato e a produção de enzima no meio de

cultura.

Quando se utilizou meio de cultura contendo glucose, esta foi determinada pelo método da glucose oxidase (8).

## 2.9. Purificação da $\beta$ -amilase

A enzima foi produzida no meio de cultura contendo amido 1%, triptona 1%, extrato de levedura 1% e pH7,0. O meio de cultura obtido por fermentação em agitação rotatória, segundo especificações do item 2.8.1., foi centrifugado a 8000xg por 10min e o sobrenadante decantado sofreu o seguinte procedimento:

### 2.9.1. Fracionamento com sulfato de amônio

O sobrenadante (1 litro) foi saturado a 80% com sulfato de amônio, o precipitado (enzima bruta), formado após uma noite a 4°C, foi recuperado por centrifugação e o sobrenadante descartado.

### 2.9.2. Diálise

O precipitado foi dissolvido em 50ml de água deionizada e dialisado contra água deionizada a 4°C durante 48h (trocando-se a água periodicamente). A solução dialisada foi recuperada por centrifugação 8000xg por 10 minutos.

### 2.9.3. Cromatografia em coluna de DEAE-celulose

A solução dialisada (40ml) do item 2.9.2. foi aplicada em coluna com 2,5cm de diâmetro e 50cm de altura, contendo DEAE-celulose ativada conforme técnica cromatográfica.

#### Técnica cromatográfica

- a. usou-se 20g de dietilaminoetil-celulose (DEAE-celulose) previamente lavados com 600ml de solução HCl 0,5N e filtrados em lã de vidro. A seguir, o HCl foi removido, lavando-se com água deionizada;
- b. a seguir, tratou-se com 600ml de solução NaOH 0,5N e fez-se nova lavagem com água deionizada até a neutralidade;
- c. equilibrou-se a DEAE-celulose com tampão fosfato 0,05M, pH 7,0, acondicionou-se na coluna e equilibrou-se novamente com o mesmo tampão;
- d. aplicou-se a solução dialisada (contém enzima) na coluna de DEAE-celulose ativada;
- e. a enzima absorvida na coluna foi eluída com um gradiente tampão fosfato a pH7,0 de 0,05M a 0,5M;
- f. coletaram-se frações de 5ml/30min nos tubos do coletor de frações. Ao fim da eluição, mediu-se a proteína pela absorbância 280nm e a atividade da enzima segundo o item 2.5., de cada fração.

#### 2.9.4. Cromatografia em coluna de CM-celulose

##### Preparo da amostra

Dos tubos das frações do eluente da coluna DEAE-celulose, onde foi observada a atividade da  $\beta$ -amilase, misturou-se e precipitou-se com  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  a 80%. O precipitado formado durante uma noite a  $4^\circ\text{C}$  foi recuperado por centrifugação e o sobrenadante descartado. O precipitado foi dissolvido em 10ml de água deionizada e dialisado contra água deionizada por 24 horas.

##### Técnica cromatográfica

A técnica usada foi a descrita no item 2.9.3., porém reativando a resina primeiramente com solução de NaOH e depois com solução HCl. A solução dialisada foi aplicada em uma coluna de 2,5cm de diâmetro e 50cm de altura, contendo carboximetilcelulose (CM-celulose) ativada.

#### 2.10. Estudo das características enzimáticas da $\beta$ -amilase

As frações do eluente da coluna de CM-celulose, onde foi observada atividade da  $\beta$ -amilase, foram misturadas e saturadas com  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  a  $80^\circ\text{C}$  e o precipitado foi dissolvido em água deionizada e dialisada contra água deionizada por 48h a

40°C e a solução dialisada foi liofilizada.

A enzima liofilizada foi dissolvida em água deionizada para estudo das características enzimáticas. A concentração da proteína na solução enzimática foi determinada pelo método de Lowry *et al.* (25).

#### 2.10.1. Efeito do pH na atividade enzimática

Para determinar o efeito do pH na atividade enzimática, 1ml da solução enzimática (45µg proteína/ml) foi incubada no substrato (solução de amido 1%) a diferentes pH (3 a 10). A mistura foi incubada a 40°C por 30min, após o que mediu-se a atividade.

A solução de amido a 1% foi preparada com os diferentes tampões, 0,1M, dentro dos limites de sua ação tamponante : tampão citrato, pH3; tampão acetato, pH4 e 5; tampão fosfato, pH6 a 8; tampão glicina-NaOH, pH9 e 10.

#### 2.10.2. Efeito do pH na estabilidade enzimática

Para determinar o efeito do pH na estabilidade enzimática, colocou-se 5ml de solução enzimática (45µg proteína/ml) + 5ml tampão (segundo item 2.10.1.) 0,1M a diferentes pH (3 a 10), em um tubo de ensaio, deixou-se a temperatura ambiente (28°C) por 12h e, após, mediu-se a atividade enzimática.

### 2.10.3. Efeito da temperatura na atividade enzimática

Para determinação do efeito da temperatura na atividade enzimática, adicionou-se 1ml da solução enzimática (45 $\mu$ g proteína/ml) a 9ml de substrato (solução de amido 1%, pH7,0) e incubou-se a diferentes temperaturas (30 $^{\circ}$ , 35 $^{\circ}$ , 40 $^{\circ}$ , 45 $^{\circ}$ , 50 $^{\circ}$ , 55 $^{\circ}$ , 60 $^{\circ}$  e 65 $^{\circ}$ C) por 30min e, após, mediu-se a atividade enzimática.

### 2.10.4. Termoestabilidade da enzima

A influência da temperatura na termoestabilidade da enzima foi determinada colocando-se 5ml de solução enzimática (90 $\mu$ g proteína/ml) em vários tubos de ensaio, incubando-se a diferentes temperaturas (30 $^{\circ}$ , 35 $^{\circ}$ , 40 $^{\circ}$ , 45 $^{\circ}$ , 50 $^{\circ}$ , 55 $^{\circ}$  e 60 $^{\circ}$ C), por 30min, determinando-se a atividade enzimática.

### 2.10.5. Efeito de sais metálicos na atividade enzimática

Para verificar o efeito de sais metálicos na atividade enzimática, a mistura de reação foi assim constituída: 9ml de solução amido a 1%, em tampão fosfato 0,05M a pH7,0 contendo 0,001M do íon do metal e 1ml de solução enzimática (45 $\mu$ g proteína/ml).

#### 2.10.6. Efeito do p-cloromercuriobenzoato na atividade enzimática

Para determinação do efeito do p-cloromercuriobenzoato (p-CMB), a mistura da reação enzimática foi constituída de 5ml (1ml p-CMB 0,001 ou 0,002M), 1,5ml tampão fosfato 0,1M, pH 7,0; 2,5ml de solução enzimática (90 $\mu$ g proteína/ml). A mistura foi incubada a temperatura de 25°C por 1 hora, após o que, determinou-se a atividade enzimática.

Para teste de reativação da atividade da  $\beta$ -amilase adicionou-se a 2,5ml de solução 0,04M de cisteína em tampão fosfato 0,05M, pH7,0, em 2,5ml da mistura enzimática (p-CMB + enzima), incubou-se por 1 hora e, após, determinou-se a atividade.

#### 2.10.7. Efeito da hidrólise da $\beta$ -amilase microbiana sobre o amido

Incubou-se um tubo de ensaio com 20ml de solução a 0,5% de amido batata, contendo a  $\beta$ -amilase microbiana ( $\pm$ 300U.A/ml) a 50°C em banho termostático por 7 horas. Durante este período, foram coletadas amostras para medir os açúcares redutores formados durante a hidrólise; no final foram feitas cromatografias, segundo o item 2.4.. Foram testadas as enzimas brutas e as enzimas purificadas nas colunas de DEAE-celulose e CM-ce-

lulose.

#### 2.10.8. Efeito da concentração do substrato na velocidade de reação

Para a determinação do efeito da concentração do substrato na reação, o sistema de incubação foi constituído de 1ml de solução enzimática (45 $\mu$ g proteína/ml), 9ml de solução de amido em tampão fosfato (pH ótimo de cada  $\beta$ -amilase) de concentração variável entre 0,25% e 5%mg/ml. As misturas foram incubadas durante 30 minutos em banho termostático a 40°C. A constante de Michaelis-Menten (Km) e a velocidade máxima (Vmax) foram determinadas segundo o sistema gráfico de Lineweaver-Burk (28).

#### 2.11. Determinação da $\alpha$ -glucosidase (maltase)

A presença da  $\alpha$ -glucosidase foi testada pela incubação de 9ml de solução de maltose a 1% em tampão fosfato 0,1M pH 6,0 com 1ml de solução da enzima bruta (270 $\mu$ g/ml) a 40°C por 1 hora. A presença da glicose foi testada pelo método da glicose-oxidase.

## RESULTADOS

### 1. Seleção e isolamento de microrganismos

Foram selecionados e isolados 851 microrganismos (fungos e bactérias) capazes de hidrolisar o amido das diferentes fontes, conforme os itens 2.1. e 2.2.

### 2. Microrganismos capazes de produzir $\beta$ -amilase

Dos 851 microrganismos isolados, somente duas bactérias, cepas 197 e 472, foram capazes de produzir  $\beta$ -amilase, conforme os testes realizados em 2.3., 2.4. e 2.5.

### 3. Identificação dos microrganismos produtores da $\beta$ -amilase

O Quadro 2. mostra os dados obtidos para a cepa nº 197 e o Quadro 3. mostra os dados obtidos para a cepa nº 472, segundo o item 2.7.. Verificamos que a cepa nº 197 era *Bacillus polymyxa* e a cepa nº 472 era *Bacillus megaterium*. A taxonomia destas bactérias foi confirmada pelo Dr. H.B. Naylor, da Universidade Cornell, E.U.A.

### 4. Produção da $\beta$ -amilase microbiana

#### 4.1. Temperatura

A faixa de temperatura de máxima produção de enzima,

bem como a faixa de temperatura ótima de crescimento, para as bactérias indicadas, foram determinadas conforme o item 2.8.1.

As Figuras 2. e 3. mostram que, para o *Bacillus megaterium* a faixa de temperatura entre 26° a 29°C foi a melhor para a produção de enzima. Na Figura 2. fica evidenciado que a faixa de crescimento ótima está situada entre 34° e 38°C.

As Figuras 4. e 5. mostram, respectivamente, que para o *Bacillus polymyxa* a faixa de temperatura entre 34° e 36°C é a melhor para a produção de enzima. A faixa de crescimento ótima está situada, como se observa na Figura 4., entre 35° e 38°C.

#### 4.2. Meio de cultura

Os meios de cultura testados para verificação de uma melhor produção de  $\beta$ -amilase, quando utilizadas diferentes fontes de nitrogênio e carbono, conforme o item 2.8.2. e estão relacionados nos Quadros 4. e 5., para o *Bacillus megaterium* e *Bacillus polymyxa*. Verificamos que para o *Bacillus megaterium*, as melhores fontes de nitrogênio foram a farinha de soja desengordurada e a triptona e, para o *Bacillus polymyxa*, foram a caseína e a triptona. Quanto às fontes de carbono, para ambos os *Bacillus* foram o amido, amilopectina e dextrina.

O estudo da concentração de farinha de soja, caseína e amido é mostrado nos Quadros 6. e 7.. O Quadro 8. mostra a influência do extrato de levedura na produção da  $\beta$ -amilase microbiana.

Dos meios de cultura estudados, o que apresentou melhor produção de  $\beta$ -amilase do *Bacillus megaterium* foi amido 0,5%, farinha de soja 1%, extrato de levedura 1%, e para o *Bacillus polymyxa* foi amido 2%, caseína 1% e extrato de levedura 1%.

#### 4.3. Fermentação

##### *Bacillus megaterium*

A Figura 6. e a Figura 7. mostram a variação do pH, massa celular e produção de enzima nos diferentes meios de cultura, no mini-fermentador.

O pH variou de 7,0 a 6,4, aproximadamente, no período de 0 a 4 horas e de 6,4 a 8,4 no período de 4 a 24 horas. Durante as 60 horas seguintes de fermentação, o pH 8,4 manteve-se constante.

A medida da massa celular proporcionou uma curva de crescimento cuja lag-fase se situa no período de 0 a 2 horas ; a fase logarítmica entre 2 e 14 horas e a fase estacionária de 14 a 32 horas. Após esse tempo ocorreu a diminuição da massa

celular.

A  $\beta$ -amilase começou a ser produzida entre 2 e 4 horas de fermentação, no meio de amido, e 6 a 8 horas, no meio de maltose. A produção máxima foi atingida entre 20 e 24 horas, no meio amido, e 20 horas no meio de maltose. Após o tempo de 32 horas de fermentação a atividade da  $\beta$ -amilase decresceu.

A Figura 8. e a Figura 9. mostram a variação do pH, massa celular, produção de enzima nos diferentes meios de cultura, no agitador rotatório. O pH variou de 7,0 a 6,4 no período de 0 a 6 horas e de pH6,4 a 8,4 no período de 6 a 34 horas. A partir de pH8,4 manteve-se constante até 60 horas de fermentação. A massa celular mostrou uma curva típica de crescimento, a lag-fase no período de 0 a 4 horas; a fase logarítmica de 4 a 14 horas e a fase estacionária de 16 a 32 horas. Após esse tempo, ocorreu diminuição na massa celular. A  $\beta$ -amilase começou a ser produzida entre 4 e 6 horas no meio de amido e entre 6 e 8 horas no meio de maltose; a produção máxima foi atingida a partir de 20 horas de fermentação. Após esse tempo, 32 horas, a atividade decresceu.

As Figuras 10. e 11., cromatogramas, mostram a hidrólise do amido e produção da enzima no meio de cultura, respectivamente.

As Figuras 12. e 13., cromatogramas, mostram o consu

mo de maltose e a produção da enzima no meio de cultura, respectivamente. No meio de cultura, a maltose foi consumida quase totalmente após 6 horas de fermentação. A  $\beta$ -amilase começou a ser produzida a partir de 8 horas de fermentação.

#### *Bacillus polymyxa*

A Figura 14. e a Figura 15. mostram a variação do pH, massa celular e produção da  $\beta$ -amilase nos dois meios de cultura, no mini-fermentador. O pH variou de 7,0 a 5,4 no período de 0 a 6 horas e de 5,4 a 8,5 no período de 6 a 24 horas. O pH 8,5 manteve-se constante até 60 horas de fermentação. A medida da massa celular mostrou a curva de crescimento; a fase estacionária de 8 a 12 horas. Após esse tempo, a massa celular diminuiu. A produção da  $\beta$ -amilase começou a partir de 6 horas de fermentação e atingiu o máximo a partir de 12 horas. Após o tempo de 16 horas a atividade decresceu.

A Figura 16. e a Figura 17. mostram a variação do pH, massa celular e produção da  $\beta$ -amilase nos dois meios de cultura no agitador rotatório. O pH variou de 7,0 a 5,4 no período de 0 a 6 horas, de 5,4 a 8,5 no período de 6 a 24 horas. O pH 8,5 manteve-se constante até 60 horas de fermentação. A medida da massa celular mostrou a curva de crescimento, apresentando a fase logarítmica num período de 0 a 6 horas e a fase estacionária

ria de 8 a 10 horas. Após esse tempo, a massa celular diminuiu. A produção da  $\beta$ -amilase atingiu o máximo entre 14 a 18 horas, no meio amido, e 16 a 24 horas, no meio maltose. Após esse tempo, a atividade da  $\beta$ -amilase decresceu.

A Figura 18. e a Figura 19., cromatogramas, mostram a hidrólise do amido e a produção da enzima no meio de cultura, respectivamente. No meio de cultura, a partir de 2 horas de fermentação, apareceu a maltose que desapareceu após 6 horas. As células microbianas começaram a produzir a  $\beta$ -amilase a partir de 8 horas de fermentação.

As Figuras 20. e 21., cromatogramas, mostram o consumo da maltose e produção da enzima no meio de cultura, respectivamente. A maltose, no meio de cultura, foi consumida quase que totalmente a partir de 6 horas de fermentação. A produção da  $\beta$ -amilase pelo *Bacillus polymyxa* começou a partir de 8 horas de fermentação.

As Figuras 22., 23. e 24., mostram a influência entre a glicose e maltose na produção da enzima, massa celular e pH. A glicose foi consumida entre 4 a 16 horas de fermentação; o pH variou de 7,0 a 5,4 no período de 0 a 6 horas. Após esse tempo, subiu até 8,3, no meio maltose-glicose, e 7,0, no meio de glicose. A variação da massa celular foi semelhante às das curvas de crescimento já descritas para o *Bacillus polymyxa*.

A produção de enzima foi mínima no meio de glicose em relação ao meio de maltose. No meio de glicose-maltose, a glicose foi consumida entre 4 e 12 horas, quando iniciou a produção da enzima.

#### 5. Purificação da $\beta$ -amilase microbiana

A Figura 25. e a Figura 26. mostram o cromatograma em coluna de DEAE-celulose e CM-celulose da  $\beta$ -amilase do *Bacillus megaterium*. Na coluna de DEAE-celulose, a enzima bruta, de acordo com o item 2.9.3., apresentou 4 picos de proteína, tendo apenas o 2º pico apresentado atividade da  $\beta$ -amilase. Na coluna de CM-celulose, a enzima, de acordo com o item 2.9.4., apresentou 4 picos de proteína e apenas o 3º pico apresentou atividade da  $\beta$ -amilase. O Quadro 9. mostra a atividade específica da  $\beta$ -amilase, bruta e purificada, do *Bacillus megaterium*.

As Figuras 27. e 28. mostram a cromatografia em coluna da  $\beta$ -amilase do *Bacillus polymyxa*. Na coluna de DEAE-celulose, a enzima bruta, de acordo com o item 2.9.3., apresentou 5 picos de proteína e apenas o 3º pico mostrou atividade da  $\beta$ -amilase. Na coluna de CM-celulose, a enzima, de acordo com o item 2.9.4., apresentou 3 picos de proteína e apenas o 2º pico exibiu atividade da  $\beta$ -amilase. O Quadro 10. mostra a atividade específica da  $\beta$ -amilase, bruta e purificada, do *Bacillus polymyxa*.

## 6. Estudo das características enzimáticas da $\beta$ -amilase microbiana

### 6.1. Efeito do pH na atividade enzimática

O estudo do efeito do pH na atividade da  $\beta$ -amilase microbiana foi realizado de acordo com o item 2.10.1.. Os resultados são mostrados na Figura 29. para o *Bacillus megaterium* e na Figura 30. para o *Bacillus polymyxa*. Verificou-se que a  $\beta$ -amilase do *Bacillus megaterium* tem maior atividade a pH6,5 e a  $\beta$ -amilase do *Bacillus polymyxa* a pH7,0.

### 6.2. Efeito do pH na estabilidade enzimática

O estudo referente à influência do pH na estabilidade enzimática foi realizado de acordo com o item 2.10.2.. A Figura 31. mostra que a estabilidade da  $\beta$ -amilase do *Bacillus megaterium* atinge o seu máximo na faixa de pH5,0 a 9,0. A Figura 32. mostra a estabilidade da  $\beta$ -amilase do *Bacillus polymyxa* entre a faixa de pH6,0 a 8,0.

### 6.3. Efeito da temperatura na atividade enzimática

O efeito da temperatura na atividade enzimática foi determinado de acordo com o item 2.10.3.. A Figura 33. refere-se à  $\beta$ -amilase do *Bacillus megaterium*, a enzima apresentou maior atividade a 50°C. A Figura 34. refere-se à  $\beta$ -amilase do

*Bacillus polymyxa*; esta enzima apresentou maior atividade entre 45° a 50°C.

#### 6.4. Termoestabilidade da enzima

O estudo referente à influência da temperatura na termoestabilidade da enzima foi realizado de acordo com o item 2.10.4.. A Figura 35. mostra a resistência térmica da  $\beta$ -amilase do *Bacillus megaterium*; a enzima foi estável até 45°C por 30 minutos, quando ocorreu a perda crescente da atividade na ordem crescente da temperatura. Foi inativada a 55°C por 15 minutos, a 60°C por 10 minutos e a 65°C por 5 minutos.

A Figura 36. mostra a resistência térmica da  $\beta$ -amilase do *Bacillus polymyxa*; a enzima foi estável a 45°C por 30 minutos, ocorrendo a perda crescente da atividade na ordem crescente da temperatura, a enzima foi inativada a 55°C por 15 minutos e a 60°C por 5 minutos.

#### 6.5. Efeito de sais metálicos na atividade enzimática

O Quadro 11. mostra os resultados referentes ao estudo da influência dos sais metálicos na atividade da  $\beta$ -amilase microbiana, de acordo com o item 2.10.5.. As  $\beta$ -amilases foram bastante inibidas pelos íons  $Hg^{++}$ ,  $Ag^+$  e  $Fe^{++}$ .

#### 6.6. Efeito do p-cloromercuriobenzoato na atividade enzimática

O Quadro 12. mostra o estudo do efeito do p-cloromercuriobenzoato sobre a atividade da  $\beta$ -amilase microbiana e a reativação da atividade pela cisteína, de acordo com o item 2.10.6.. O p-cloromercuriobenzoato inibiu a atividade da  $\beta$ -amilase, a qual foi reativada pela cisteína.

#### 6.7. Efeito da hidrólise da $\beta$ -amilase microbiana sobre o amido

O efeito da hidrólise da  $\beta$ -amilase, bruta e purificada, do *Bacillus megaterium* é mostrado na Figura 37. A enzima bruta hidrolisou 51,1% do amido e as enzimas purificadas hidrolisaram 55,5% do amido, produzindo apenas maltose.

O efeito da hidrólise da  $\beta$ -amilase, bruta e purificada, do *Bacillus polymyxa* é mostrado na Figura 38. A enzima bruta hidrolisou 68,8% do amido e a enzima purificada 62,2% do amido. Os açúcares produzidos foram maltose, 84,2%, glicose, 10,5%, e maltotriose, 5,3%.

#### 6.8. Efeito da concentração do substrato na velocidade de reação

O efeito da concentração do substrato na velocidade de reação, determinado conforme o item 2.10.8., está demonstrado nas Figuras 39. e 40. A constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) para a  $\beta$ -amilase do *Bacillus megaterium* foi de 0,52mg/ml e a

velocidade máxima ( $V_{max}$ )  $1,04\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ . Para a  $\beta$ -amilase do *Bacillus polymyxa* foi de  $1,92\text{mg}/\text{ml}$  e a  $V_{max}$  de  $1,02\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ .

#### 7. Presença da $\alpha$ -glucosidase

A  $\alpha$ -glucosidase não foi detectada nas  $\beta$ -amilases microbianas por nós estudadas, quando testada de acordo com o item 2.11.

## DISCUSSÃO

1. Isolamento e identificação dos microrganismos capazes de produzir  $\beta$ -amilase

Do estudo de 851 microrganismos (bactérias e fungos) isolados de várias fontes como produtores de  $\beta$ -amilase, apenas duas bactérias do solo foram capazes de produzir  $\beta$ -amilase. Essas bactérias foram identificadas como *Bacillus megaterium* e *Bacillus polymyxa*. Verificamos, portanto, uma baixa incidência de microrganismos produtores desta enzima, o que está de acordo com os resultados obtidos por outros autores.

Robyt & French (47) em 1964 foram os primeiros a relatar que *Bacillus polymyxa* ATCC8523 produzia uma amilase semelhante à  $\beta$ -amilase dos vegetais; Marshall (30) caracterizou a amilase produzida pelo *Bacillus polymyxa* ATCC8523 como uma  $\alpha$ -1,4 maltohidrolase.

Higashihara & Okada (23) isolaram 200 cepas de bactérias que não deram zona clara ao redor da colônia bacteriana no teste entre amido e iodo e verificaram que uma cepa (nº32), *Bacillus megaterium*, produziu uma  $\beta$ -amilase semelhante à dos vegetais.

Shink *et al.* (49) isolaram 238 cepas de bactérias e 77 cepas de *Actinomyces* de várias fontes que não deram halo in

color no teste entre amido e iodo, verificaram que *Bacillus cereus* (BQ10) e *Pseudomonas pseudomallei* (BQ6) e dois *Streptomyces* (nº13 e nº43) produziram  $\beta$ -amilase.

Takasaki (54) isolou do solo o *Bacillus cereus* var. *mycoïdes* que produzia  $\beta$ -amilase e pululanase.

Como podemos observar, apenas 7 cepas de bactérias foram relatadas anteriormente como capazes de produzir  $\beta$ -amilase.

## 2. Identificação da amilase microbiana

A  $\beta$ -amilase, de acordo com a literatura consultada (27, 43, 57, 62, 63, 64, 66), produz maltose e uma  $\beta$ -limite dextrina e causa uma fraca descoloração na reação amido e iodo (57).

### *Bacillus polymyxa*

Os resultados dos cromatogramas da  $\beta$ -amilase, obtidos pela incubação da solução de amido e enzima, de acordo com o item 2.4., mostram que, além da maltose (84,2%), formou-se glicose (10,5%) e maltotriose (5,3%), estando estes resultados de acordo com os cromatogramas realizados por Robyt & French (47), onde a maltose (85%) foi o principal produto de hidrólise. Podemos dizer que a amilase produzida pelo *Bacillus polymyxa* por nós isolado é semelhante à produzida pela ação hidrolí-

tica pelo *Bacillus polymyxa* ATCC8523. Marshall (30) comparou os resultados da amilase do *Bacillus polymyxa* ATCC8523 com a hidrólise da  $\beta$ -amilase da batata doce e classificou a enzima microbiana como uma exo  $\alpha$ -1,4-D glucan maltohidrolase.

Os resultados negativos da presença da  $\alpha$ -glucosidase para as  $\beta$ -amilases microbianas por nós isoladas concordam com os resultados obtidos por Rose (48), que verificou que a maltose era o principal açúcar da hidrólise do amido pela amilase do *Bacillus polymyxa* e a enzima estava livre da maltase. Sendo assim, a glicose produzida pela amilase do *Bacillus polymyxa* pode ser proveniente da hidrólise da maltotriose, o que difere das  $\beta$ -amilases dos vegetais quanto à sua ação.

#### *Bacillus megaterium*

Os resultados dos cromatogramas da  $\beta$ -amilase do *Bacillus megaterium* por nós isolado produziu apenas maltose e traços da maltotriose, portanto, diferentes dos resultados obtidos por Higashihara & Okada (23), quando isolaram várias cepas do solo, conforme o Quadro 15. das quais escolheram a cepa nº32 para estudar a produção e identificação da  $\beta$ -amilase.

Quadro 15. Seleção de bactérias produtoras de  $\beta$ -amilase (23)

nº cepa	G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub>	G <sub>3</sub>	G <sub>4</sub>	G <sub>5</sub>
1-1	-	-	+	+	++
2-1	+	+++	++	++	++
6-1	-	+++	++	+	++
8	-	+++	+	-	++
9-4	+	+	+	++	++
10-1	++	+++	++	+	++
14-1	-	++	-	-	-
17-2	-	++	+	+	++
19-2	+	+++	++	++	+++
23-1	-	+++	++	+	+
24-3	+	+	-	-	-
25-6	+	+++	++	+	-
28-1	-	+	+	+	++
32	+	+++	++	+	-

Oligossacarídeos identificados pela cromatografia de papel; G<sub>1</sub>: glicose; G<sub>2</sub>: maltose; G<sub>3</sub>: maltotriose; G<sub>4</sub>: maltotetraose; G<sub>5</sub>: maltopentaose.

(+) (++) (+++) mostram a intensidade da mancha

(-) não detectado

Na cromatografia de papel dos produtos de hidrólise, da amilase produzida pelo *Bacillus megaterium*, cepa nº32, depois de purificada em coluna de Sephadex G-100, apareceram glicose, maltose, maltotriose e maltotetraose. Esta cromatografia foi comparada com a dos produtos de hidrólise da  $\beta$ -amilase da batata doce, que também deu os mesmos açúcares, concluindo-se que a amilase microbiana era uma  $\beta$ -amilase.

Pelo cromatograma da  $\beta$ -amilase da batata doce, utilizada por Higashihara & Okada (23), esta parece não ter sido uma enzima pura, devido aos produtos formados, ficando errada a conclusão de que a  $\beta$ -amilase microbiana produzida pelo *Bacillus megaterium*, cepa nº32, é semelhante à  $\beta$ -amilase vegetal.

Por outro lado, a  $\beta$ -amilase produzida pelo *Bacillus megaterium* por nós isolado mostrou realmente uma característica semelhante à da  $\beta$ -amilase vegetal, quanto ao produto formado. Possivelmente, teria sido mais interessante se Higashihara & Okada (23) tivessem realizado o seu trabalho com as cepas nº 6-1, 8, 14-1, 17-2, 25-1 e 28-1, que produziram pela hidrólise principalmente a maltose, isenta de glicose.

### 3. Produção da $\beta$ -amilase microbiana

#### 3.1. Temperatura

Com o estudo realizado no incubador de temperatura

gradiente, conforme o item 2.8.1. e os resultados mostrados nas Figuras 2. e 4., observamos a relação entre a temperatura de produção da  $\beta$ -amilase e o crescimento do microrganismo.

Para o *Bacillus polymyxa*, a faixa de temperatura ótima para a produção da  $\beta$ -amilase coincide com a faixa de temperatura ótima de crescimento. Quando usamos temperatura de 30°C verificamos que a produção diminuiu de 20% em relação à de 35°C, relacionando-se a atividade da enzima com a massa celular, como mostra o Quadro 13.

Para o *Bacillus megaterium*, a faixa de temperatura ótima de produção não coincidiu com a faixa de temperatura ótima de crescimento. Quando usamos temperaturas acima de 30°C, a produção diminuiu.

As temperaturas ótimas de produção por nós utilizadas foram diferentes, tanto para o *Bacillus polymyxa* como para o *Bacillus megaterium*, quando comparadas com a temperatura de produção do *Bacillus polymyxa* ATCC8523, que foi de 33°C e 30°C (47, 30), da  $\beta$ -amilase do *Bacillus polymyxa* NCIB8158 (21), 30°C, e a  $\beta$ -amilase do *Bacillus megaterium*, cepa n°32 (23), 30°C.

### 3.2. Meio de cultura

Dos meios de cultura por nós estudados, verificamos que o amido foi indutor para a produção da  $\beta$ -amilase, tanto pa

ra o *Bacillus polymyxa* como para o *Bacillus megaterium*. Estas bactérias produziram 34 e 20 vezes mais  $\beta$ -amilase, respectivamente, em relação ao meio básico. Depois do amido, a amilopectina e dextrina foram também bons indutores. A maltose teve um efeito de indução de 50% e a amilose de 75%, em relação ao amido. No meio com glicose houve uma maior produção da massa celular, com referência ao meio básico, mas a produção da enzima/mg da massa celular foi a mesma. Já o meio com galactose, frutose e sorbitol, teve uma maior produção de massa celular, porém a produção de enzima foi menor em relação ao meio básico, apresentando, portanto, uma repressão parcial da enzima.

O meio com lactose, sacarose e manose, apesar de apresentar bom crescimento, teve uma inibição total sobre a produção da enzima em relação ao meio base.

Quanto à fonte de nitrogênio, Quadro 4., para a  $\beta$ -amilase do *Bacillus megaterium*, verificamos que a adição de trip-tona produziu mais massa celular, em referência ao meio base, mas a produção de enzima/mg da massa celular foi quase a mesma; já no meio com peptona, apresentou três vezes mais produção de massa celular, mas a produção da enzima foi menor, apresentando uma repressão parcial da mesma. O meio com farinha de soja produziu 8 vezes mais enzima/ml de cultura, em referência ao meio base.

Para o *Bacillus polymyxa*, quanto à fonte de nitrogênio, verificamos que o meio com triptona produziu mais massa celular, em referência ao meio base e a produção da enzima foi 60% maior em relação à massa celular. A peptonas produziu mais massa celular, porém a mesma produção de enzima por massa celular, em relação ao meio base. A caseína produziu 4 vezes mais enzima/ml de cultura, em relação ao meio básico.

No estudo da influência do extrato de levedura no meio de cultura, Quadro 8., verificou-se que, para o *Bacillus megaterium*, a produção da massa celular foi maior do que no meio sem extrato de levedura e a enzima foi produzida 60% a mais, em relação à atividade da enzima e massa celular. Para o *Bacillus polymyxa*, a produção da  $\beta$ -amilase foi 4,6 vezes maior em relação à atividade de enzima e massa celular. Esta influência, provavelmente, se deve a algum composto do extrato de levedura (2, 11), tais como, aminoácidos, íons, nucleotídeos e vitaminas.

### 3.3. Fermentação

#### *Bacillus polymyxa*

A fermentação pelo *Bacillus polymyxa* por nós isolado demonstrou um comportamento semelhante àquela produzida pelo *Bacillus polymyxa* NCIB8158 (21). A produção da  $\beta$ -amilase come-

çou quando o pH no meio de cultura, a partir de 5,4, começou a aumentar, quando a fonte de carbono em maltose já tinha sido consumida e a concentração celular estava no máximo (fase estacionária). Portanto, a  $\beta$ -amilase foi produzida depois do crescimento do *Bacillus polymyxa* atingir a fase estacionária. A esporulação do *Bacillus polymyxa* foi acompanhada de um decréscimo da medida da massa celular a 660nm.

O estudo da fermentação com o meio de cultura contendo maltose-glicose mostrou que a glicose é consumida antes que a maltose. Somente após o consumo da maltose, a enzima passou a ser produzida. No meio de cultura contendo glicose, a produção da  $\beta$ -amilase foi bastante inibida, sendo este efeito conhecido como repressão catabólica (34). O comportamento quanto ao pH no meio de cultura foi característico de uma fermentação de *Bacillus* (22), onde ocorre esporulação.

A fermentação pelos dois métodos anteriormente descritos mostrou que a agitação rotatória produziu mais massa celular do que a mini-fermentação.

#### *Bacillus megaterium*

A produção da  $\beta$ -amilase iniciou com o aumento da massa celular e atingiu o máximo na fase estacionária, estando, portanto, a enzima associada com o crescimento celular. O com-

portamento do pH no meio de cultura foi característico de uma fermentação de *Bacillus* (22) onde ocorre esporulação. A observação microscópica das células bacterianas mostrou que a esporulação se iniciou na fase de declínio.

A fermentação pelos dois métodos não mostrou diferença quanto à produção da  $\beta$ -amilase.

#### 4. Purificação da $\beta$ -amilase microbiana

A  $\beta$ -amilase do *Bacillus polymyxa* e a do *Bacillus megaterium* por nós isolados, quando purificadas, depois de precipitadas com sulfato de amônio e fracionadas em coluna de DEAE-celulose e coluna CM-celulose, Quadros 9. e 10., apresentaram 16,4 e 20,7 vezes mais atividade específica para  $\beta$ -amilase do *Bacillus polymyxa* e 21,2 e 23,5 vezes mais atividade específica para  $\beta$ -amilase do *Bacillus megaterium*. Estes resultados, quando comparados com a  $\beta$ -amilase produzida por outros *Bacillus*, mostraram concordância com a  $\beta$ -amilase do *Bacillus cereus* (55) e diferença em relação à  $\beta$ -amilase do *Bacillus megaterium*, cepa n<sup>o</sup>32 (23), que apresentou 106 vezes mais atividade específica, depois de fracionada em coluna de Sephadex G-100. A  $\beta$ -amilase do *Bacillus polymyxa* ATCC8523 (47) foi diferente, isto é, 13 vezes mais ativa, depois de purificada por solventes orgânicos (butanol e propanol). Essas diferenças, provavelmente, se de-

vem ao fato de que a amilase do *Bacillus megaterium*, cepa nº 32, não seja uma  $\beta$ -amilase, ou que a amilase do *Bacillus polymyxa* estudado por Robyt & French (47) sofreu outro processo de purificação.

A  $\beta$ -amilase de soja, estudada por Gertler & Birk (19), que sofreu a mesma seqüência de purificação que a do presente trabalho, apresentou 22,2 e 23,6 vezes mais atividade específica, em concordância com os nossos resultados.

## 5. Estudo das características enzimáticas da $\beta$ -amilase microbiana

### 5.1. Efeito do pH

O efeito do pH na atividade e na estabilidade da  $\beta$ -amilase do *Bacillus polymyxa* e da  $\beta$ -amilase do *Bacillus megaterium* por nós isolados foi semelhante a outras  $\beta$ -amilases microbianas, quando comparadas (23, 47, 49, 55), ilustradas no Quadro 14. O pH ótimo entre 6,0 e 7,0 e a estabilidade entre a faixa de pH 5,0 e 9,0, foram diferentes das  $\beta$ -amilases vegetais (5, 19, 32, 44).

### 5.2. Efeito da temperatura

O efeito da temperatura na atividade e na termoestabilidade das  $\beta$ -amilases microbianas por nós estudadas também

foi semelhante ao das  $\beta$ -amilases microbianas estudadas por outros autores (21, 23, 47, 49, 55) que tiveram uma temperatura ótima entre 45° e 50°C e estáveis a temperatura menores a 45°C, sendo inativadas acima de 60°C. Foram semelhantes às  $\beta$ -amilases dos vegetais quanto à temperatura ótima. O Quadro 14. ilustra essas comparações.

### 5.3. Efeitos dos sais metálicos e p-cloromercuriobenzoato

As amilases do *Bacillus megaterium* e *Bacillus polymyxa* por nós estudadas tiveram comportamento semelhante ao das  $\beta$ -amilases do *Bacillus cereus* (55) e *Bacillus megaterium* (23), quando sofreram efeito dos íons  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Hg}^{++}$ ,  $\text{Fe}^{++}$  e p-cloromercuriobenzoato. Portanto, os grupos -SH estão envolvidos no centro ativo da enzima, sendo então semelhantes às  $\beta$ -amilases dos vegetais.

### 5.4. Características de ação hidrolítica da $\beta$ -amilase

As  $\beta$ -amilases purificadas do *Bacillus megaterium* e do *Bacillus polymyxa* hidrolisaram 55,5 e 62,2% do amido, respectivamente, sendo próximas às hidrólises da  $\beta$ -amilase dos vegetais, 60 a 70% (25, 57) e *Bacillus polymyxa* (47). Os produtos de hidrólise da reação da  $\beta$ -amilase com amido, de acordo com os cromatogramas, foram semelhantes aos da enzima bruta.

### 5.5. Efeito da concentração do substrato na velocidade de reação

O valor do  $K_m$  da  $\beta$ -amilase do *Bacillus megaterium*, 0,52mg/ml, foi menor do que o  $K_m$  da  $\beta$ -amilase do *Bacillus polymyxa*, 1,92mg/ml, mostrando que a  $\beta$ -amilase do *Bacillus megaterium* tem mais afinidade ao substrato que a  $\beta$ -amilase do *Bacillus polymyxa*. As velocidades máximas de reação enzimática foram semelhantes, 1,04 e 1,02 $\mu$ mol/min/mg, respectivamente.

Quadro 2. Características morfológicas e fisiológicas da cepa nº197

---

Forma	bastão, tamanho 0,5-1,2/1,8-6,0 $\mu$
Esporo	tamanho: 1,0-1,5/1,5-6,0 $\mu$ forma: oval e esférico posição: terminal esporângio: definido e deforma a parede celular
Gram (cultura de 18-24h)	variável
Motilidade	móvel
Agar nutriente	colonias tamanho (1-2mm), translúcidas, lobadas e aderentes ao meio
Agar nutriente com amido	halo de hidrólise de 6 a 7mm
Agar batata	semelhante ao agar nutriente
Gelatina	fraca liquefação
Caseína	hidrolisa
Lecitinase	positiva
Nitrato	reduz
Indol	negativo
V.P.	positivo
V.M.	positivo
Citrato	negativo
Catalase	positivo
Respiração	anaeróbio-facultativa
Produção de ácido+gás	glucose, anaerobicamente
Temperatura crescimento	ótima: 30°-35°C máxima: 44°-45°C

---

As técnicas empregadas segundo o Manual de Laboratório (24).

Quadro 3. Características morfológicas e fisiológicas da cepa n<sup>o</sup>472

---

Forma	bastão, tamanho 1,0-1,5/2,0-5,0 $\mu$
Esporo	tamanho: 0,8-1,5/1,0-2,0 $\mu$ forma: oval e irregular posição: central e para-central esporângio: não definido
Gram (cultura 18-24h)	positivo e variável
Motilidade	móvel
Agar nutriente	colonias tamanho (3-4mm), lisas, convexas, cor creme e amarelada
Agar nutriente amido	halo de hidrólise de 2 a 3mm
Agar batata	colonias lisas e de cor creme
Gelatina	liquefaz
Caseína	hidrolisa
Lecitinise	negativa
Nitrato	reduz
V.P.	negativo
V.M.	positivo
Citrato	positivo
Catalase	positivo
Respiração	aeróbia
Produção ácido, não gás	glucose, sacarose, manitol
Temperatura crescimento	ótima: 25 <sup>o</sup> -38 <sup>o</sup> C máxima: 44 <sup>o</sup> -45 <sup>o</sup> C

---

As técnicas empregadas segundo o Manual de Laboratório (24).

Quadro 4. Efeito de algumas fontes de nitrogênio na produção da  $\beta$ -amilase microbiana

Fonte nitrogênio 1%	<i>Bacillus megaterium</i> *			<i>Bacillus polymyxa</i> **		
	massa celular g/l	atividade $\mu\text{mol/ml}$	pH	massa celular g/l	atividade $\mu\text{mol/ml}$	pH
Triptona	8,75	648	8,3	2,8	6605	8,6
Peptona	8,50	241	8,4	2,5	4532	8,6
Caseína	-***	100	8,3	-***	8040	8,6
Farinha de soja (desengordurada)	-***	1461	8,5	-***	5847	8,4
Extrato de carne	2,6	120	7,9	1,70	1900	7,8
Meio base (a)	2,5	197	7,8	1,5	2100	7,8

\* Incubação por 24h a 28°C em agitador rotatório a 250r.p.m.

\*\* Incubação por 24h a 35°C em agitador rotatório a 250r.p.m.

\*\*\* Prejudicado devido a substâncias insolúveis

(a) Extrato de levedura 1%, amido 1%, pH7,0

Quadro 5. Efeito da fonte de carbono na produção da  $\beta$ -amilase microbiana

Fonte Carbono 1%	<i>Bacillus megaterium</i> *			<i>Bacillus polymyxa</i> **		
	massa celular g/l	atividade $\beta$ -amilase/ml	pH	massa celular g/l	atividade $\beta$ -amilase/ml	pH
Amido	8,70	850	8,4	2,80	8590	8,6
Amido hidrolisado (a)	8,71	324	8,4	2,90	5386	8,5
Amilose	8,75	602	8,3	3,00	6579	8,4
Amilopectina (b)	8,72	703	8,4	2,82	8040	8,3
Dextrina	8,35	638	8,3	2,73	6817	8,2
Extrato malte	3,02	42	7,6	0,52	45	8,1
Frutose	6,00	57	6,0	1,68	120	6,2
Glucose	8,42	58	6,2	2,79	650	6,1
Galactose	8,41	29	8,1	2,30	827	8,3
Lactose	4,95	0	6,0	1,91	0	6,3
Maltose	8,73	404	8,2	2,76	4362	8,4
Manose	5,03	0	6,2	2,52	0	6,1
Sacarose	4,54	0	6,1	2,63	0	6,8
Sorbitol	5,10	28	7,6	1,94	87	7,5
Xilana	-***	29	6,7	-***	95	6,2
Meio base (c)	4,45	25	8,0	1,70	410	8,0

\* Incubado por 24h a 28°C em agitador rotatório a 250r.p.m.

\*\* Incubado por 24h a 35°C em agitador rotatório a 250r.p.m.

\*\*\* Prejudicado devido a substâncias insolúveis

(a) Hidrolisado com  $\alpha$ -amilase até ponto acromático

(b) Amido de Waxy Corn (1% amilose)

(c) Extrato de leveduras 1%, triptona 1%, pH7,0

Quadro 6. Efeito da concentração do amido na produção da  $\beta$ -amilase microbiana\*

Concentração amido (%)	<i>Bacillus megaterium</i> **		<i>Bacillus polymyxa</i> ***	
	Atividade $\beta$ -amilase $\mu\text{mol/ml}$	pH	Atividade $\beta$ -amilase $\mu\text{mol/ml}$	pH
0,5	1280	8,5	4192	8,6
1,0	842	8,5	8800	8,5
2,0	132	8,6	9772	8,5
3,0	143	8,4	5116	8,4
5,0	89	8,3	512	8,3
meio base	120 (a)	8,0	640 (b)	8,0

\* Massa celular: prejudicada devido a substâncias insolúveis

\*\* Incubação por 24h a 28°C em agitador rotatório a 250r.p.m.

\*\*\* Incubação por 24h a 35°C em agitador rotatório a 250r.p.m.

(a) Farinha de soja 1%, extrato de levedura 1%, pH7,0

(b) Caseína 1%, extrato de levedura 1%, pH7,0

Quadro 7. Efeito da concentração da fonte de proteína na produção da  $\beta$ -amylase microbiana\*

Determinação	<i>Bacillus megaterium</i> **					<i>Bacillus polymyxa</i> ***				
	Concentração da Farinha Soja (%) (a)					Concentração da Caseína (%) (b)				
	0,5	1,0	2,0	3,0	5,0	0,5	1,0	2,0	3,0	5,0
Atividade da $\beta$ -amilase ( $\mu\text{mol/ml}$ )	830	1230	720	470	420	4234	9750	6730	2192	860
pH	8,5	8,4	8,4	8,4	8,2	8,6	8,5	8,5	8,4	8,4

\* Massa celular: prejudicada devido a substâncias insolúveis

\*\* Incubado por 24h a 28°C em agitador rotatório a 250r.p.m.

\*\*\* Incubado por 24h a 35°C em agitador rotatório a 250r.p.m.

(a) Meio cultura: amido 0,5%, extrato de levedura 1%, pH7,0

(b) Meio cultura: amido 2%, extrato de levedura 1%, pH7,0

Quadro 8. Efeito do extrato de levedura na produção da  $\beta$ -amilase microbiana

Meio de cultura*	<i>Bacillus megaterium</i> **			<i>Bacillus polymyxa</i> ***		
	Massa celular g/l	Atividade $\beta$ -amilase /ml	pH	Massa celular g/l	Atividade $\beta$ -amilase /ml	pH
Com extrato levedura 1%	8,2	890	8,4	2,82	8620	8,4
Sem extrato levedura	4,7	289	8,2	1,7	930	8,3

\* Composto de triptona 1%, amido 1%, pH7,0

\*\* Incubado por 24h a 28°C no agitador rotatório a 250r.p.m.

\*\*\* Incubado por 24h a 35°C no agitador rotatório a 250r.p.m.

Quadro 9. Purificação da  $\beta$ -amilase do *Bacillus megaterium*

Procedimento	Atividade/ml ( $\mu\text{mol/ml}$ )	mg proteína/ml	Atividade específica (UA/mg prot.)
Precipitação com ( $\text{NH}_4$ ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> a 80%	412	0,272	1515
Fracionamento em coluna DEAE-celu- lose	1350	0,042	32143
Fracionamento em coluna de CM-ce- lulose	1250	0,035	35714

UA: unidade de atividade

Quadro 10. Purificação da  $\beta$ -amilase do *Bacillus polymyxa*

Procedimento	Atividade/ml ( $\mu\text{mol/ml}$ )	mg proteína/ml	Atividade específica (UA/mg prot.)
Precipitação com ( $\text{NH}_4$ ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> a 80%	3310	0,267	12397
Fracionamento em coluna de DEAE- celulose	9150	0,045	203044
Fracionamento em coluna de CM-celu- lose	9760	0,038	256885

UA: unidade de atividade

Quadro 11. Efeito dos sais metálicos na atividade da  $\beta$ -amilase microbiana\*

Íon metálico $1 \times 10^{-3}$ M	Atividade relativa da $\beta$ -amilase (%)	
	<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Bacillus polymyxa</i>
Nenhum	100	100
AgNO <sub>3</sub>	4,2	6,4
BaCl <sub>2</sub>	98	99
CaCl <sub>2</sub>	100	101
CuSO <sub>4</sub>	2,3	2,1
CoCl <sub>2</sub>	97	100
FeCl <sub>2</sub>	52	48
HgCl <sub>2</sub>	1,8	2,0
MgSO <sub>4</sub>	100	100
MnSO <sub>4</sub>	84	86

\* Mistura enzimática: tampão fosfato: 0,05M, pH7,0, com amido 1% e 0,001M do íon do metal e enzima (4,5 $\mu$ g proteína/ml)

Quadro 12. Efeito inibitório do p-cloromercuriobenzoato sobre a  $\beta$ -amilase microbiana e subsequente reativação com cisteína\*

Componentes		Atividade relativa da $\beta$ -amilase (%)	
PCMB $10^{-4}$ M	Cisteína $10^{-3}$ M	<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Bacillus polymyxa</i>
0,0	0,0	100	100
2	0,0	4,3	4,2
4	0,0	3,0	2,8
2	2	92	98
4	2	88	95

\* Mistura enzimática: 5ml (1ml PCMB 0,001M ou 0,002M; 1,5ml tampão fosfato 0,1M, pH7,0; 2,5ml solução enzimática, 90mg proteína /ml), incubada a 25°C por 1h. Na reativação re-incubou-se 2,5 ml da mistura enzimática por 1 hora a 25°C + 2,5ml de solução de cisteína em tampão fosfato 0,05M, pH7,0.

Quadro 13. Influência da temperatura na produção da  $\beta$ -amilase do *Bacillus polymyxa* por 60h no mini-fermentador

Temperaturas °C	Massa celular* g/l	Atividade da $\beta$ -amilase	
		$\mu\text{mol/ml}$	UA/mg MC
25	2,5	3500	1400
30	3,4	5000	1470
35	4,1	7500	1829
40	2,2	0	0
42	2,1	0	0

\*Correspondente à máxima produção da enzima

Meio de cultura: amido 1%, triptona 1%, extrato de levedura 1%, pH7,0; aeração 1 volume/volume.

UA: unidade de atividade

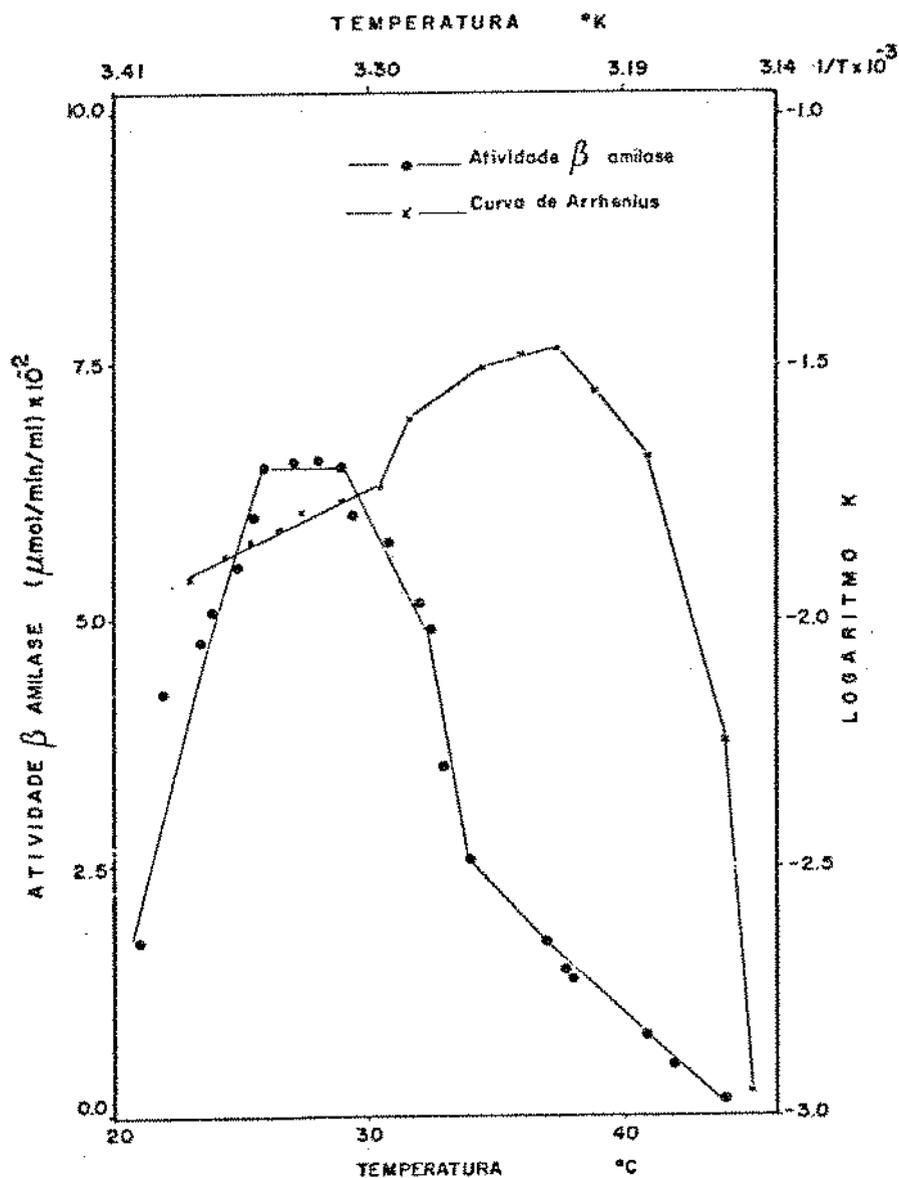
MC: meio de cultura

Quadro 14. Algumas propriedades da  $\beta$ -amilase

Características	<i>Bacillus megaterium</i> * (23)	<i>Bacillus megaterium</i> (23)	<i>Bacillus polymyxa</i> * (47)	<i>Bacillus polymyxa</i> ATCC8523 (47)	<i>Bacillus cereus</i> (55)	<i>Bacillus cereus</i> BQ10 (51)	<i>Pseudomonas</i> BQ6 (50)	Cevada (malte) (44)	Trigo (32)	Soja (19)	Batata doce (5)
Faixa de pH ó- timo	6,5	6,5	7,0	6,8	6,5-7	6-7	6,5-7,4	5,2	5,3	5-6	4,8
Faixa de esta- bilidade	5-9	5-7,5	6-8	-	-	-	6,5-8	4,5-8	4,5-9,2	4-9	3,5-6
Faixa de tempe- ratura ótima (°C)	50	-	45-50	45	50	45-55	45-55	50	40-50	50-55	40-45
Estabilidade térmica (°C)	abaixo 45	abaixo 55	abaixo 45	abaixo 55	abaixo 45	-	abaixo 55	60	60	60	60-65

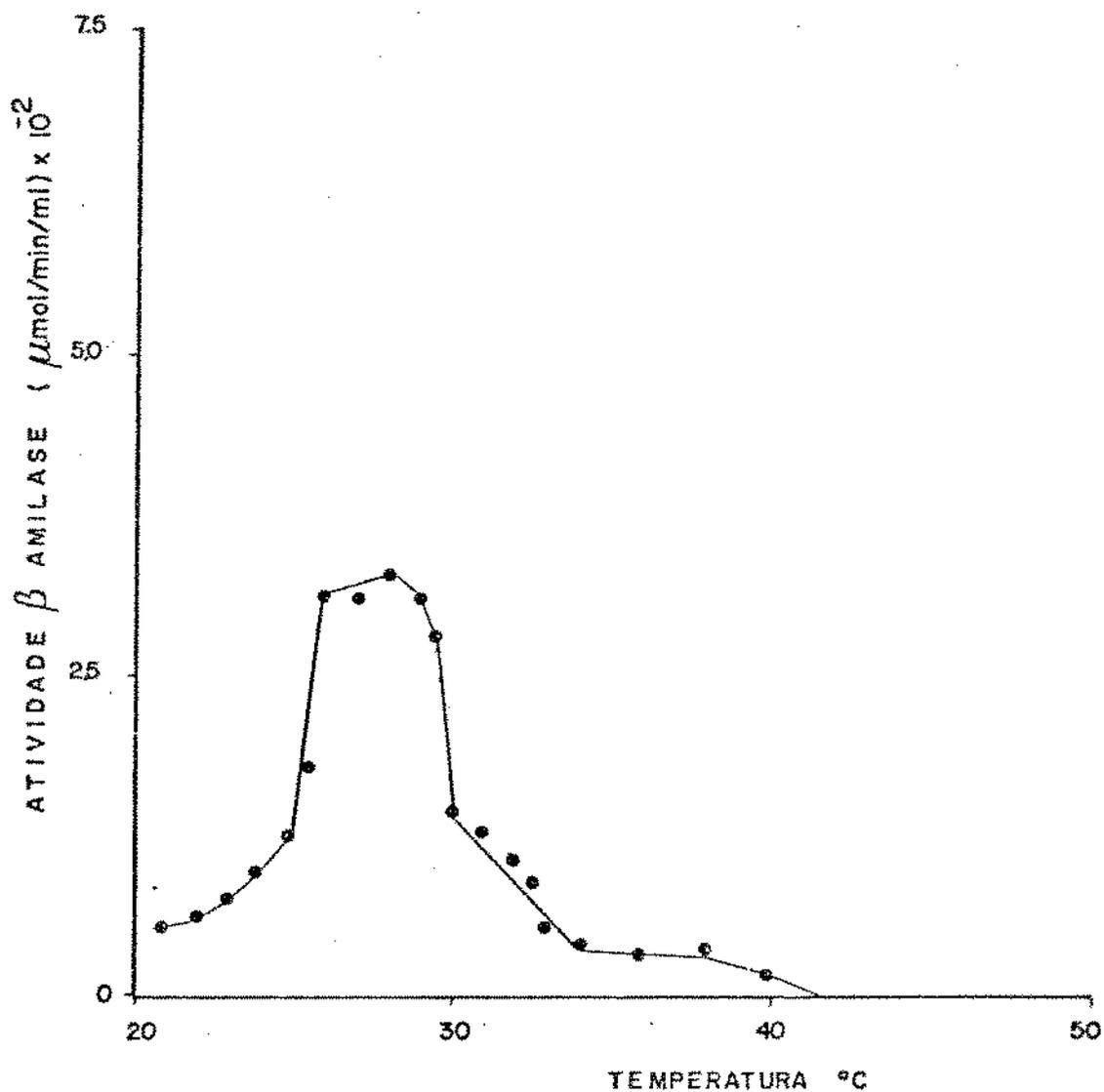
\* Cepas por nós isoladas

FIGURA 2. CORRELAÇÃO ENTRE O EFEITO DA TEMPERATURA NA PRODUÇÃO DA  $\beta$ -AMILASE PELO *Bacillus megaterium* E A CURVA DE ARRHENIUS



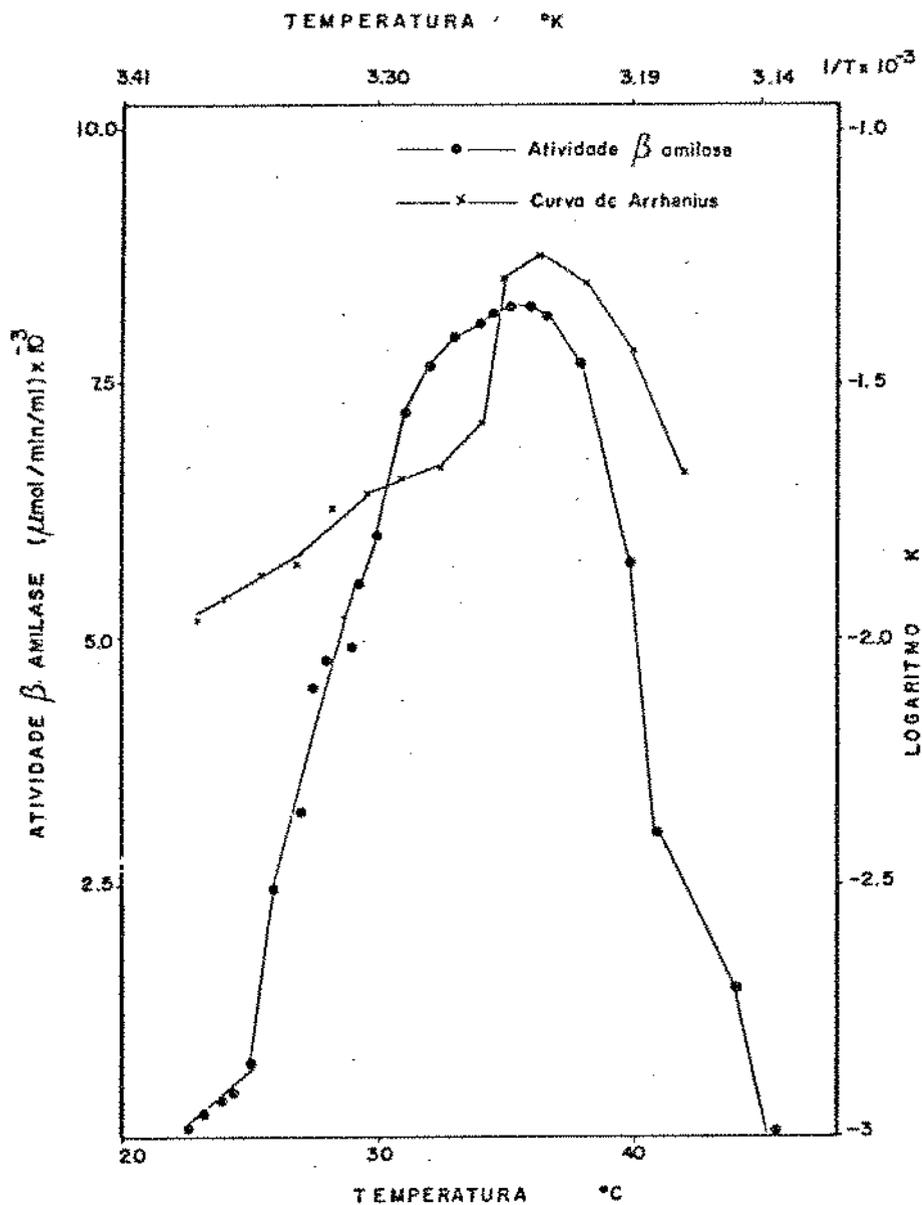
Meio de cultura: amido 1%, triptona 1%, extrato de levedura 1%, pH7,0, incubado por 24h no incubador de temperatura gradiente, com uma agitação de 70 ciclos/min.

FIGURA 3. EFETIO DA TEMPERATURA NA PRODUÇÃO DA  $\beta$ -AMILASE PELO *Bacillus megaterium*

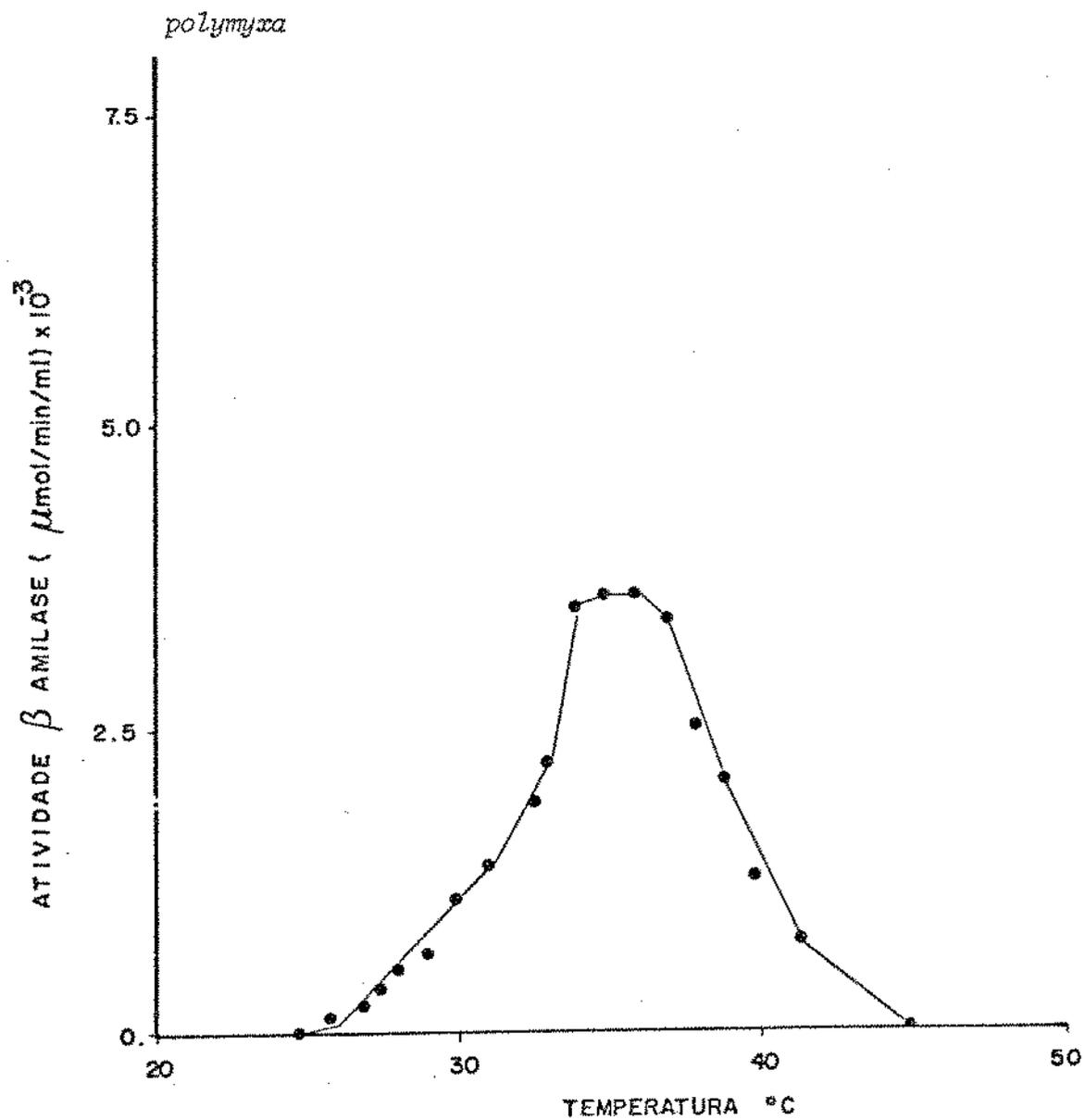


Meio de cultura: maltose 1%, triptona 1%, extrato de levedura 1%, pH7,0, incubado por 24h no incubador de temperatura gradiente, com uma agitação de 70 ciclos/min.

FIGURA 4. CORRELAÇÃO ENTRE O EFEITO DA TEMPERATURA NA PRODUÇÃO DA  $\beta$ -AMILASE PELO *Bacillus polymyxa* E A CURVA DE ARRHENIUS

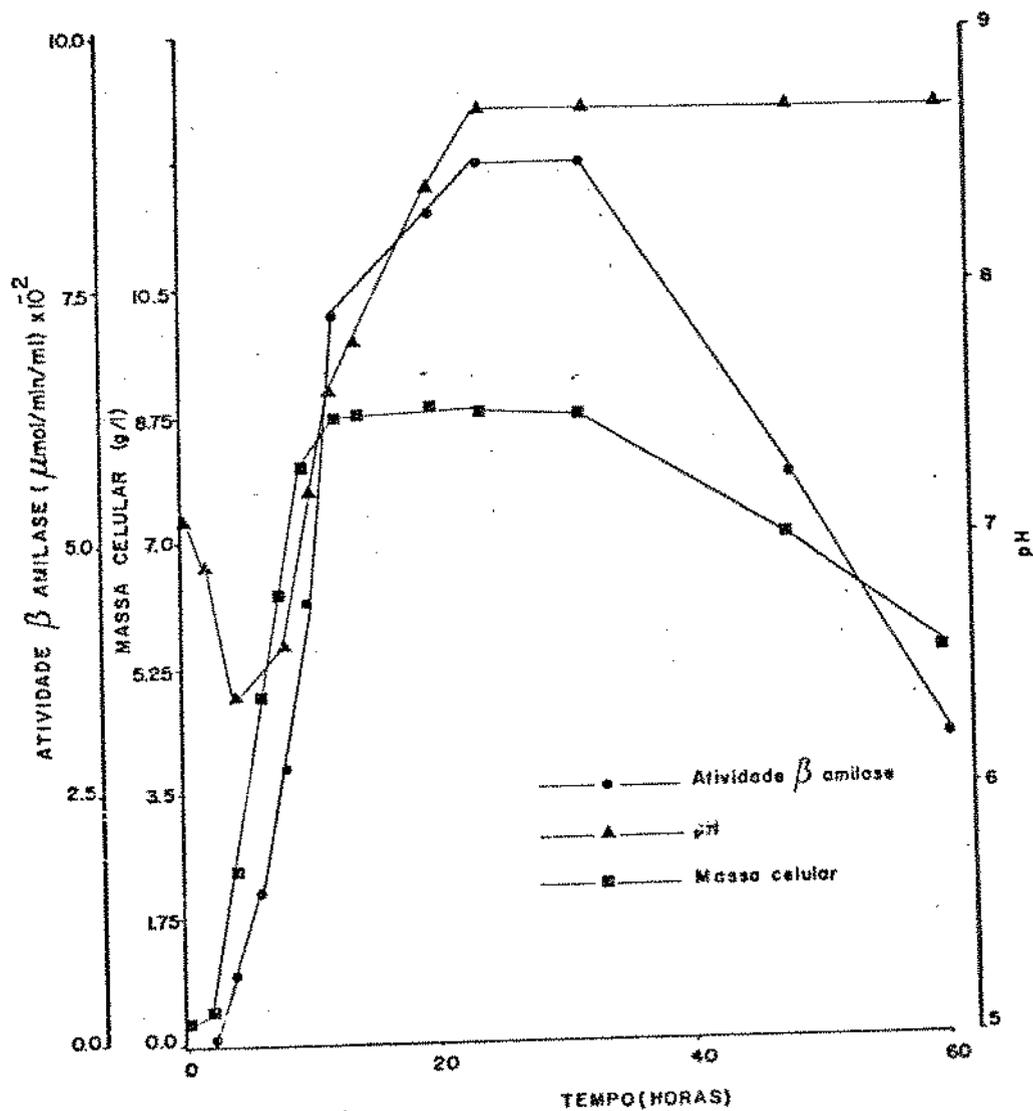


Meio de cultura: amido 1%, triptona 1%, extrato de levedura 1%, pH7,0, in cubado por 24h no incubador de temperatura gradiente com agitaçãõ de 70 ciclos/min.

FIGURA 5. EFEITO DA TEMPERATURA NA PRODUÇÃO DA  $\beta$ -AMILASE PELO *Bacillus*

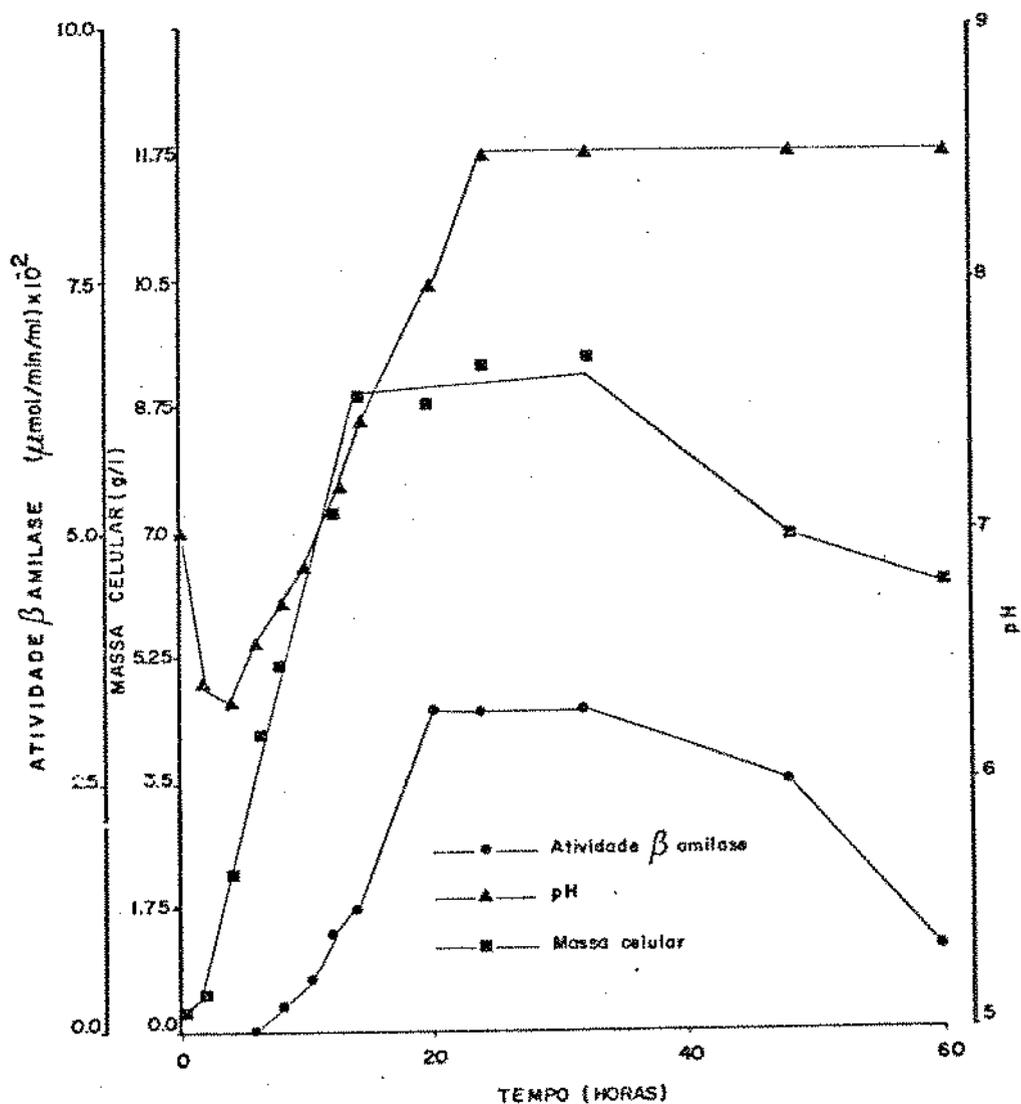
Meio de cultura: maltose 1%, triptona 1%, extrato de levedura 1%, pH7,0, incubado por 24h no incubador de temperatura gradiente, com uma agitação de 70 ciclos/min.

FIGURA 6. ESTUDO DA RELAÇÃO ENTRE O TEMPO DE FERMENTAÇÃO E PRODUÇÃO DA  $\beta$ -AMILASE, MASSA CELULAR E pH PELO *Bacillus megaterium*



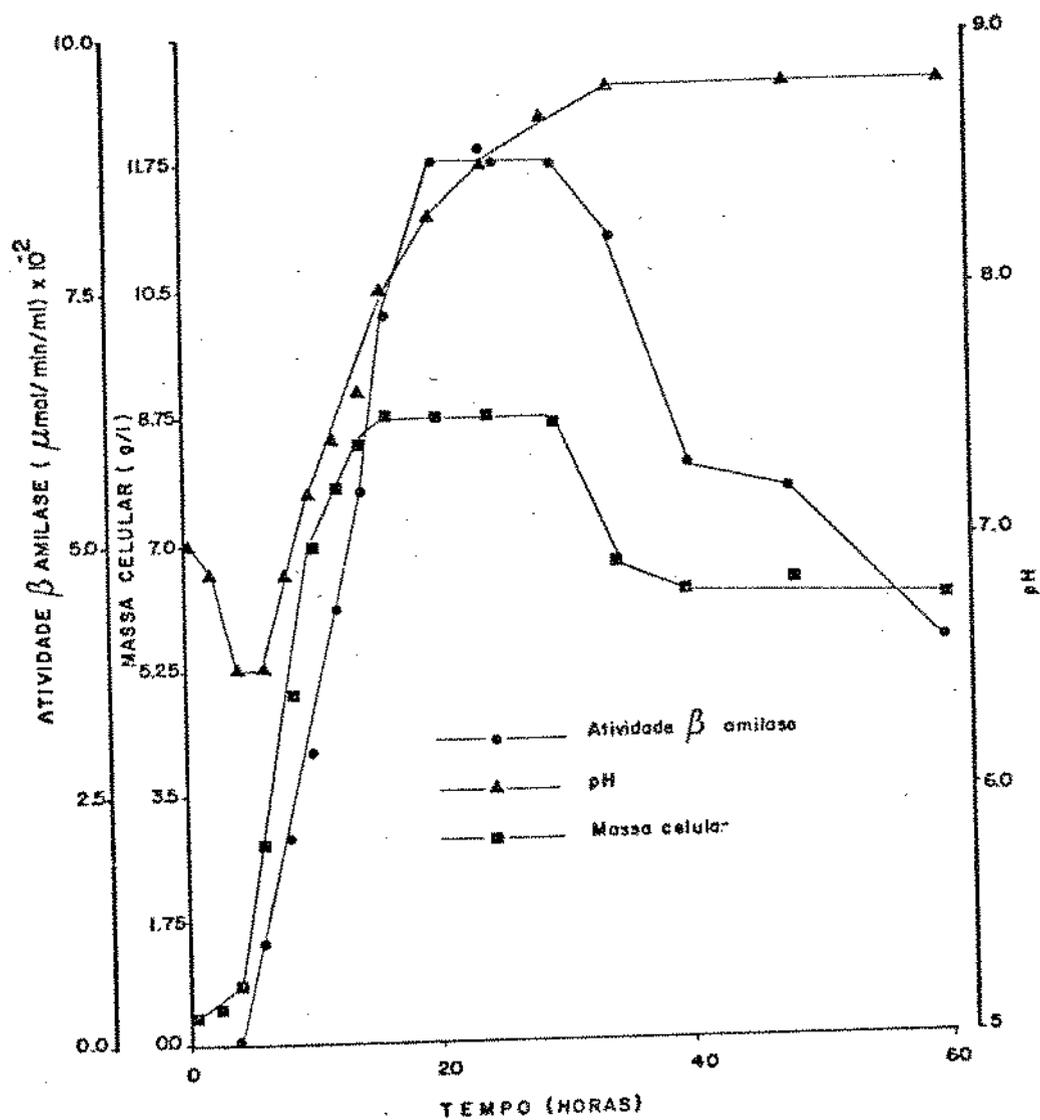
Meio de cultura: amido 1%, triptona 1%, extrato de levedura 1%, pH7,0, incubado a 28°C no mini-fermentador.

FIGURA 7. ESTUDO DA RELAÇÃO ENTRE O TEMPO DE FERMENTAÇÃO E PRODUÇÃO DA  $\beta$ -AMILASE, MASSA CELULAR E pH PELO *Bacillus megaterium*



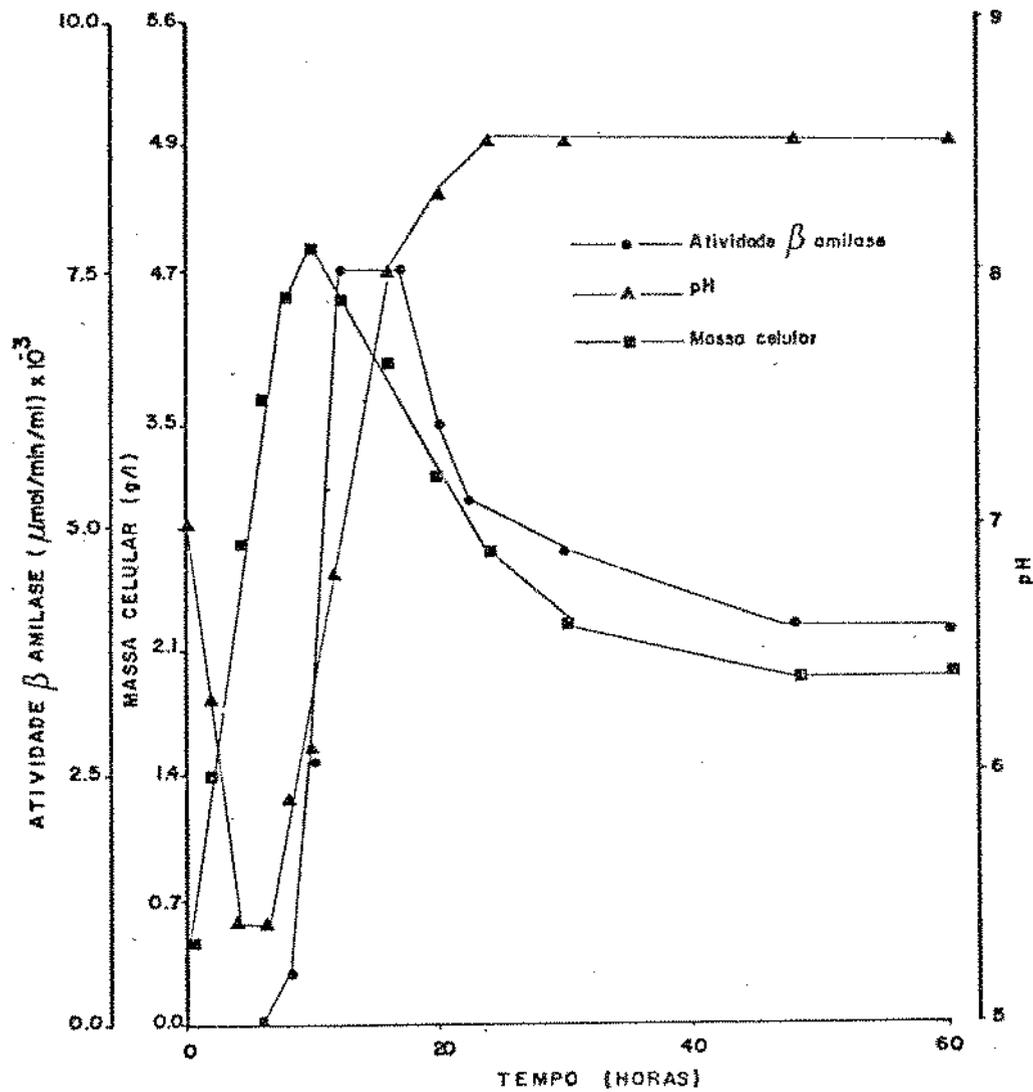
Meio de cultura: maltose 1%, triptona 1%, extrato de levedura 1%, pH7,0, incubado a 28°C no mini-fermentador.

FIGURA 8. ESTUDO DA RELAÇÃO ENTRE O TEMPO DE FERMENTAÇÃO E PRODUÇÃO DA  $\beta$ -AMILASE, MASSA CELULAR E pH PELO *Bacillus megaterium*



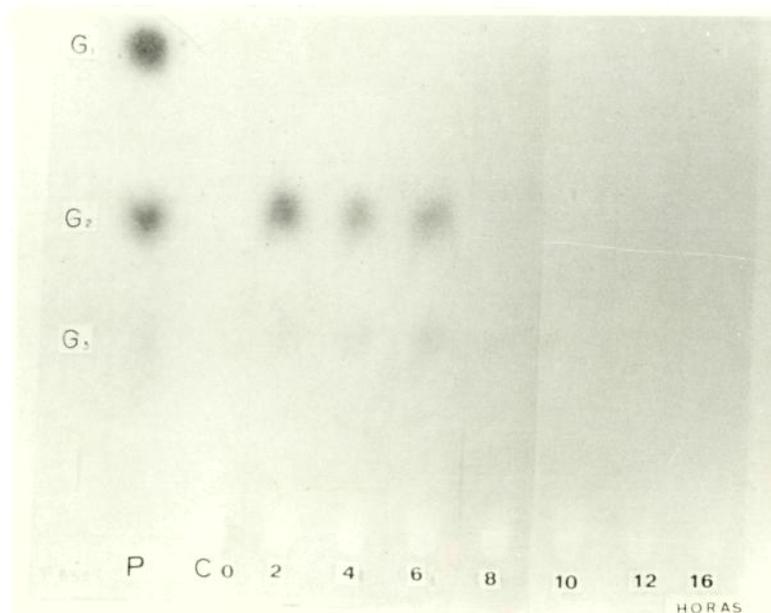
Meio de cultura: amido 1%, triptona 1%, extrato de levedura 1%, pH7,0, incubado a 28°C no agitador rotatório.

FIGURA 9. ESTUDO DA RELAÇÃO ENTRE O TEMPO DE FERMENTAÇÃO E PRODUÇÃO DA  $\beta$ -AMILASE, MASSA CELULAR E pH PELO *Bacillus megaterium*



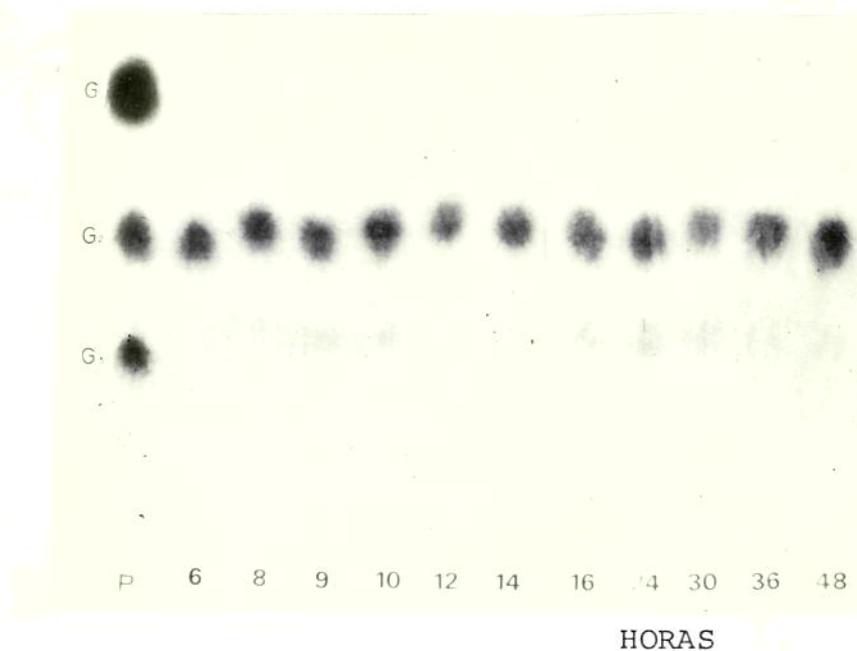
Meio de cultura: maltose 1%, triptona 1%, extrato de levedura 1%, pH7,0 incubado a 28°C no agitador rotatório.

FIGURA 10. CROMATOGRAMA DO CONSUMO DOS PRODUTOS DE HIDRÓLISE DO AMIDO NO MEIO DE CULTURA COM O TEMPO DE FERMENTAÇÃO PARA O *Bacillus megaterium*



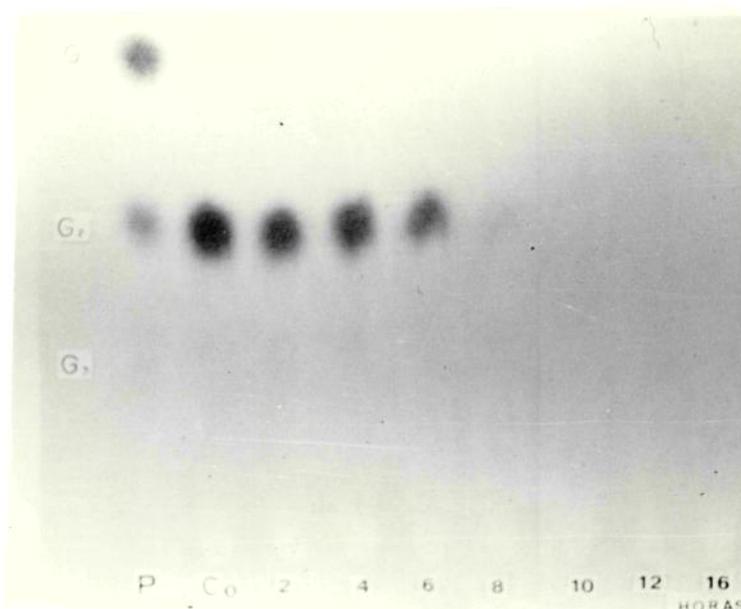
Meio de cultura: amido 1%, triptona 1%, extrato de levedura 1%, pH7,0, - incubado a 28°C no mini-fermentador . G<sub>1</sub> - glicose; G<sub>2</sub> - maltose; G<sub>3</sub> - maltotriose; P - padrão de açúcares.

FIGURA 11. CROMATOGRAMA DA PRODUÇÃO DA ENZIMA NO MEIO DE CULTURA COM O TEMPO DE FERMENTAÇÃO PARA O *Bacillus megaterium*



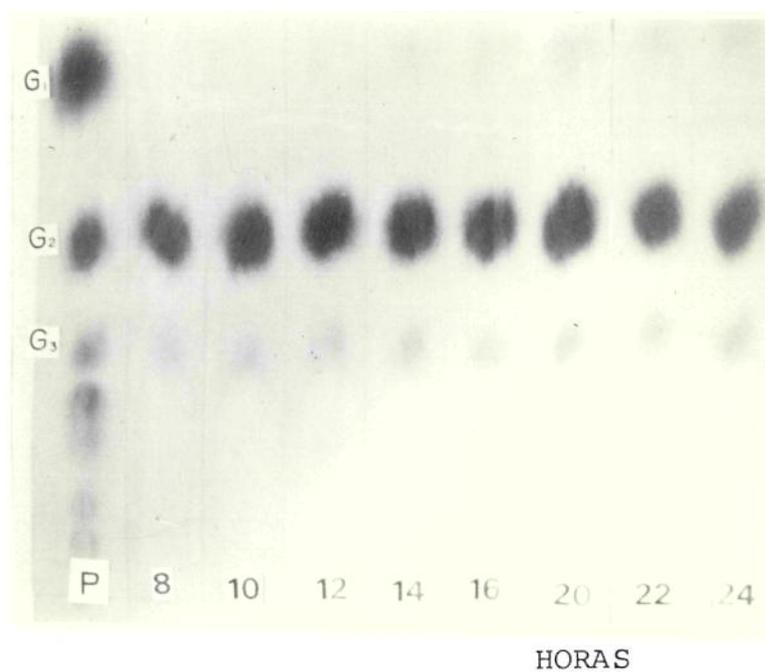
Meio de cultura: amido 1%, triptona 1%, extrato de levedura 1%, pH7,0, incubado a 28°C no mini-fermentador. G<sub>1</sub> - glicose; G<sub>2</sub> - maltose; G<sub>3</sub> - maltotriose; P - padrão de açúcares.

FIGURA 12. CROMATOGRAMA DO CONSUMO DE MALTOSE, NO MEIO DE CULTURA COM O TEMPO DE FERMENTAÇÃO PARA *Bacillus megaterium*



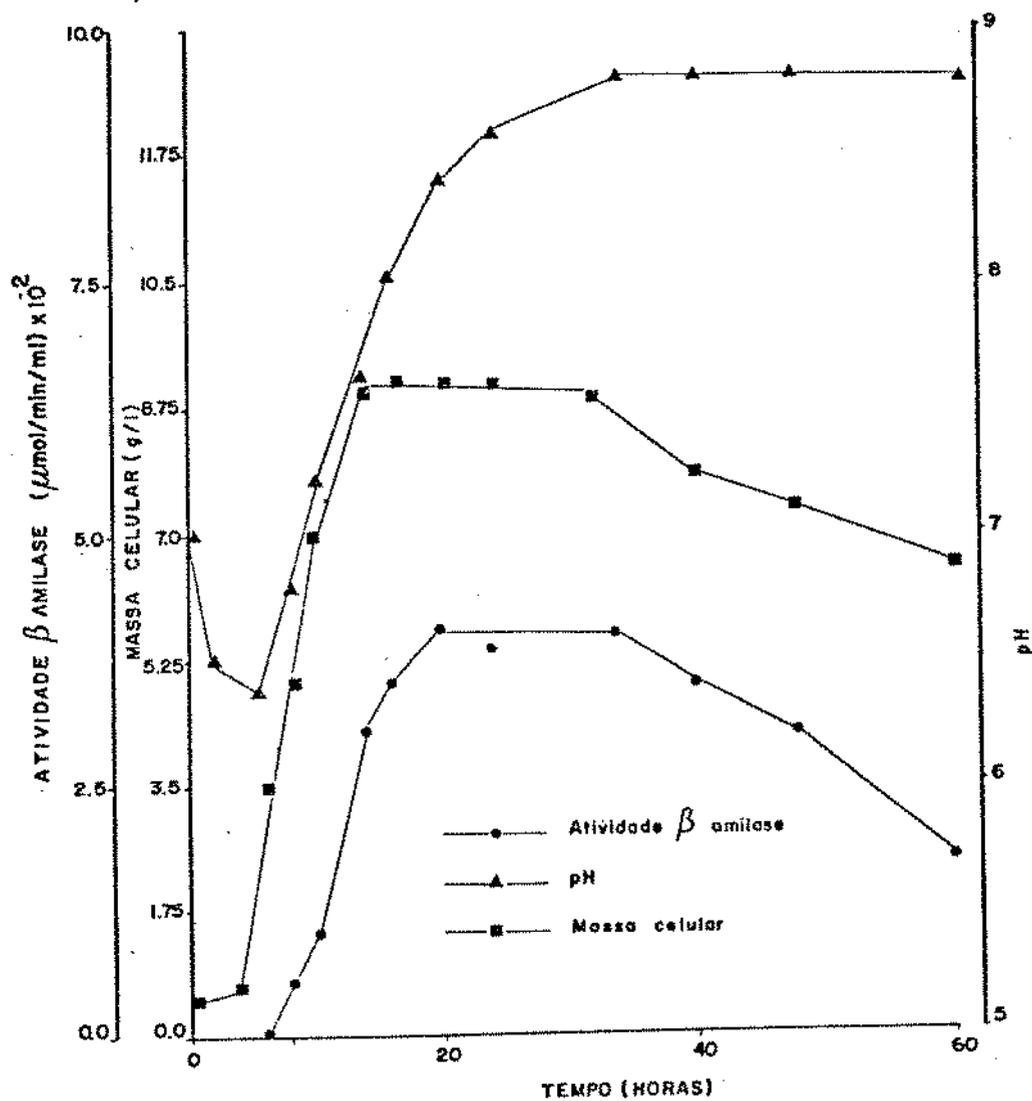
Meio de cultura: maltose 1%, triptona 1%, extrato de levedura 1%, pH7,0, incubado a 28°C no mini-fermentador. G<sub>1</sub> - glicose; G<sub>2</sub> - maltose; G<sub>3</sub> - maltotriose; P - padrão de açúcares.

FIGURA 13. CROMATOGRAMA DA PRODUÇÃO DA ENZIMA NO MEIO DE CULTURA COM O TEMPO DE FERMENTAÇÃO PARA O *Bacillus megaterium*



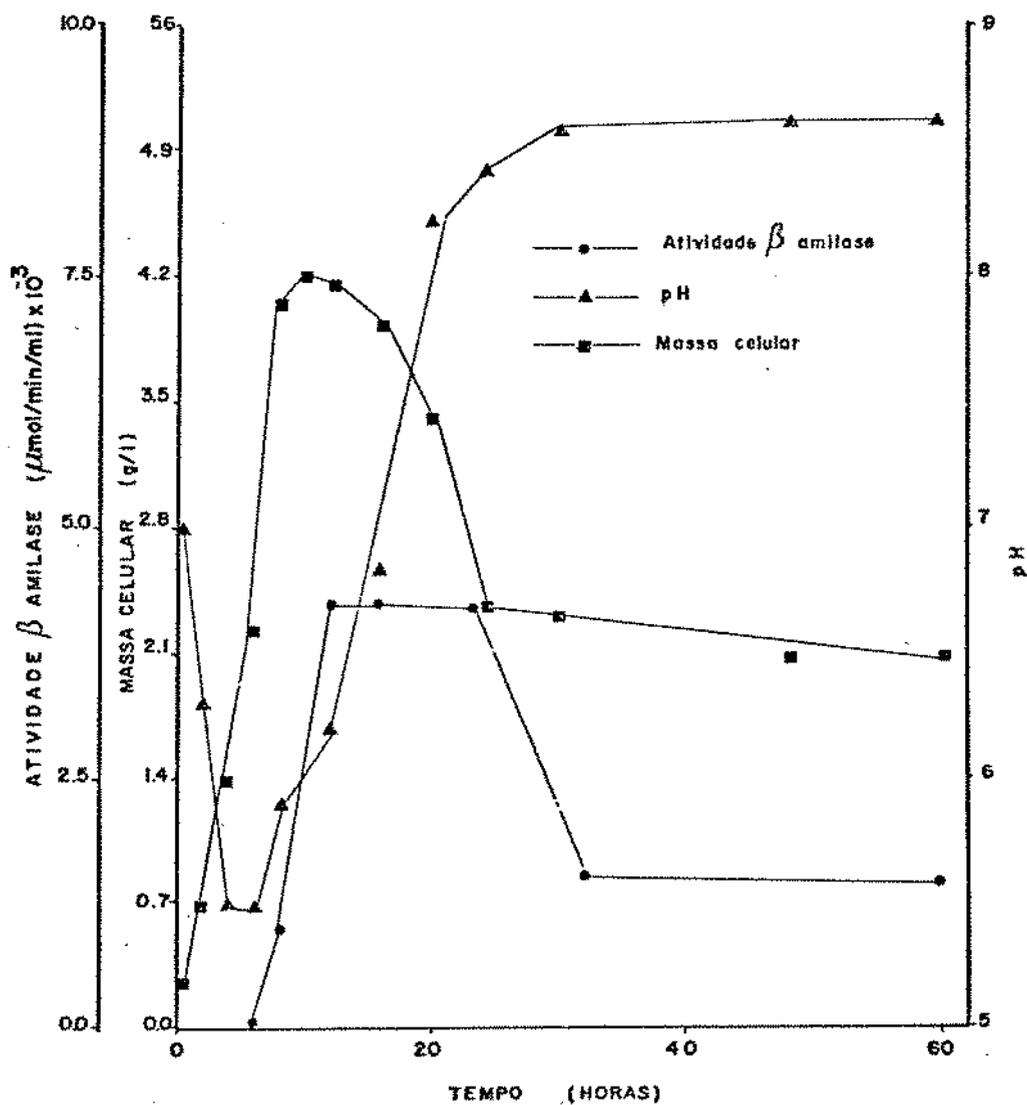
Meio de cultura: maltose 1%, triptona 1%, extrato de levedura 1%, pH7,0. incubado a 28°C no mini-fermentador. G<sub>1</sub> - glicose; G<sub>2</sub> - maltose; G<sub>3</sub> - maltotriose; P - padrão de açúcares.

FIGURA 14. ESTUDO DA RELAÇÃO ENTRE O TEMPO DE FERMENTAÇÃO E PRODUÇÃO DA  $\beta$ -AMILASE, MASSA CELULAR E pH PELO *Bacillus polymyxa*



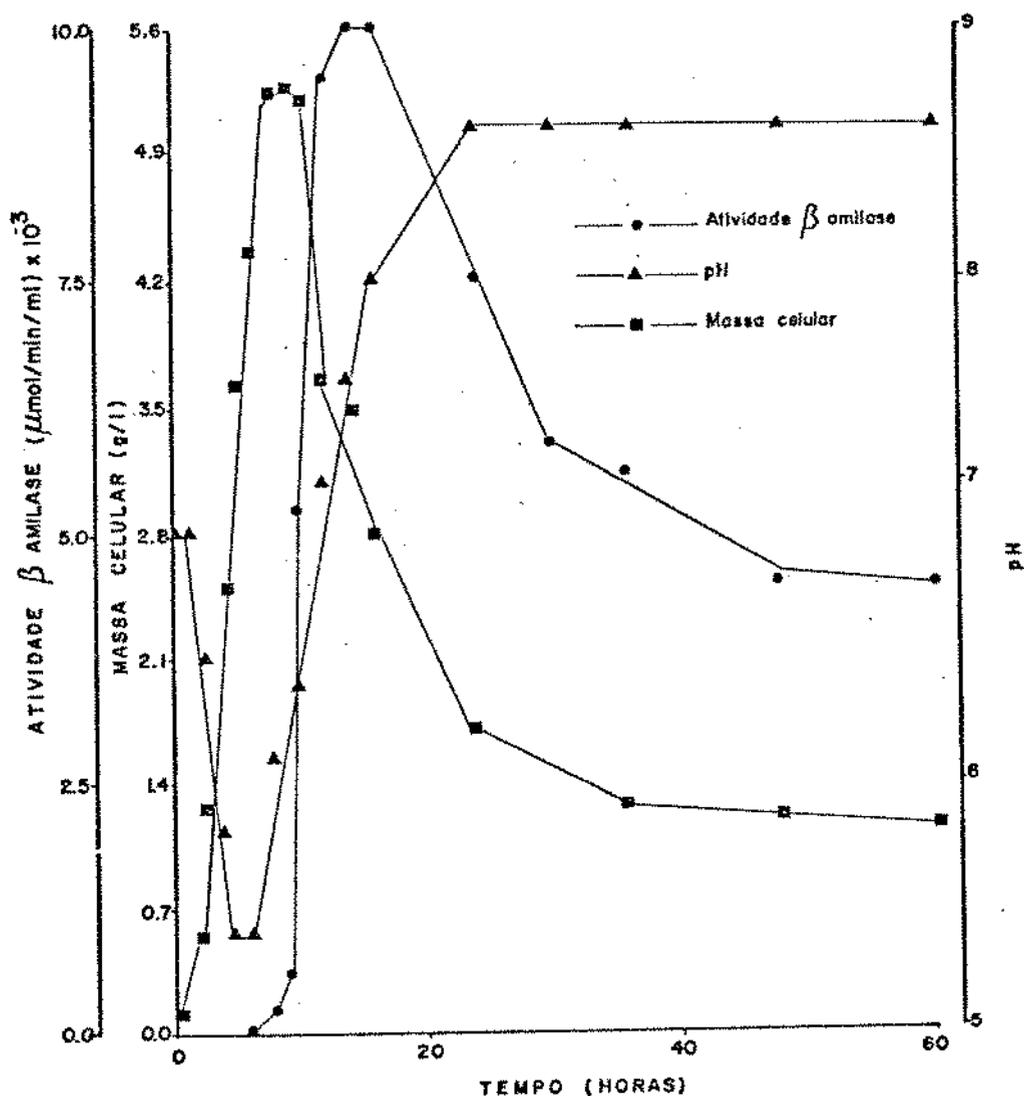
Meio de cultura: amido 1%, triptona 1%, extrato de levedura 1%, pH7,0, incubado a 35°C no mini-fermentador.

FIGURA 15. ESTUDO DA RELAÇÃO ENTRE O TEMPO DE FERMENTAÇÃO E PRODUÇÃO DA  $\beta$ -AMILASE, MASSA CELULAR E pH PELO *Bacillus polymyxa*



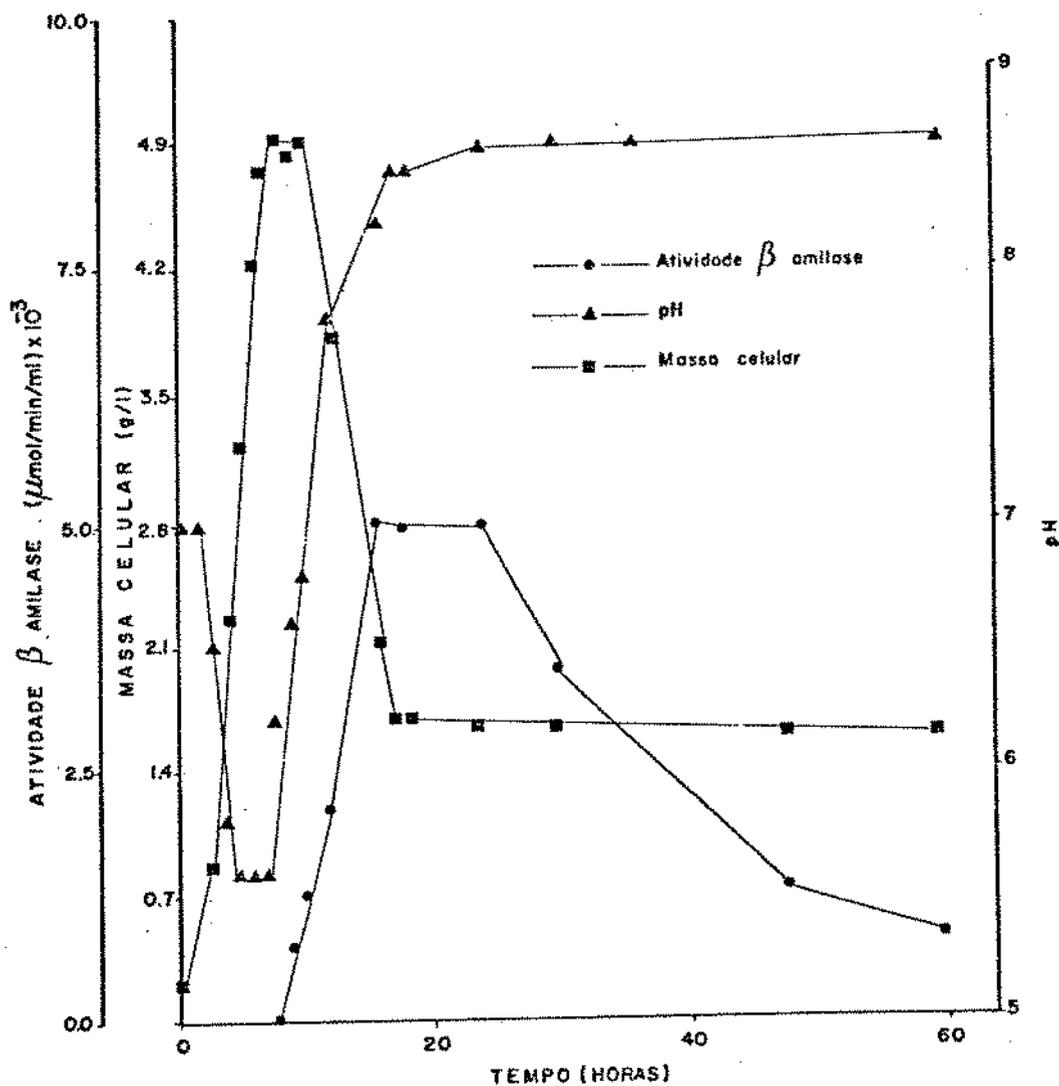
Meio de cultura: maltose 1%, triptona 1%, extrato de levedura 1%, pH7,0, incubado a 35°C no mini-fermentador.

FIGURA 16. ESTUDO DA RELAÇÃO ENTRE O TEMPO DE FERMENTAÇÃO E PRODUÇÃO DA  $\beta$ -AMILASE, MASSA CELULAR E pH PELO *Bacillus polymyxa*



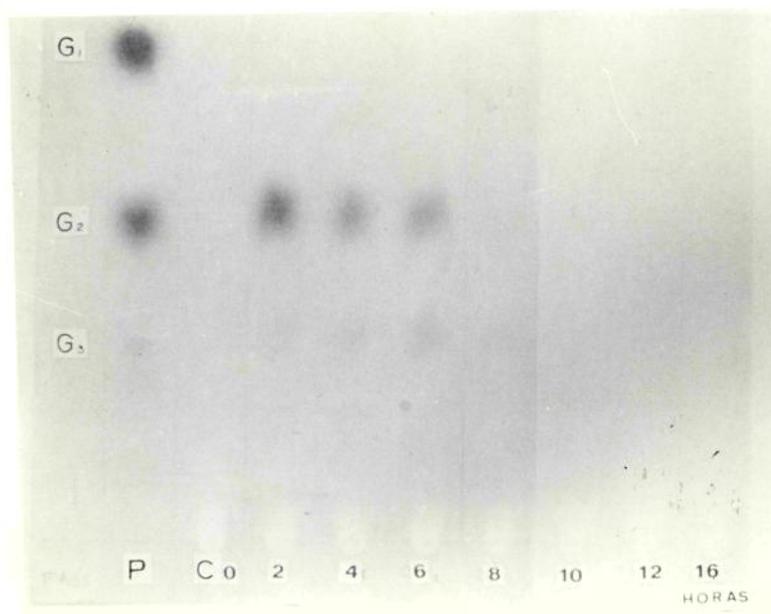
Meio de cultura: amido 1%, triptona 1%, extrato de levedura 1%, pH7,0, incubado a 35°C no agitador rotatório.

FIGURA 17. ESTUDO DA RELAÇÃO ENTRE O TEMPO DE FERMENTAÇÃO E PRODUÇÃO DA  $\beta$ -AMILASE, MASSA CELULAR E pH PELO *Bacillus polymyxa*



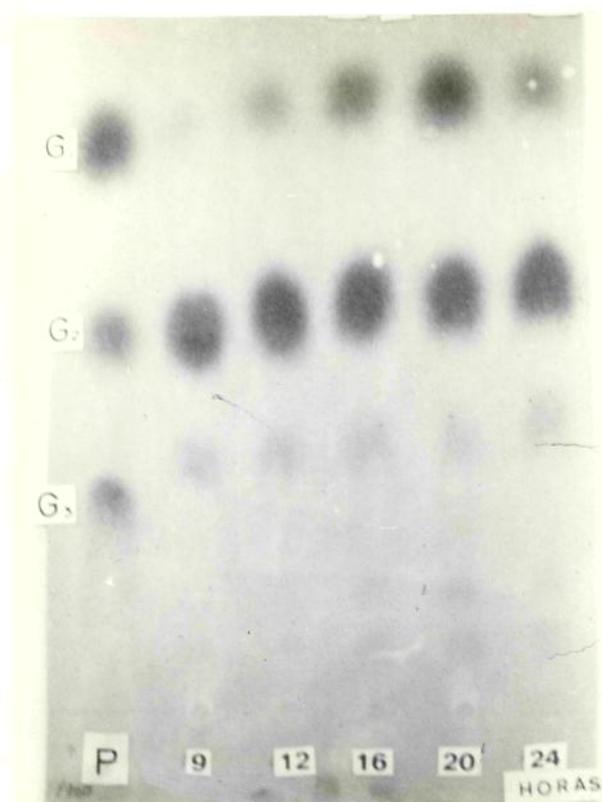
Meio de cultura: maltose 1%, triptona 1%, extrato de levedura 1%, pH 7,0, incubado a 35°C no agitador rotatório.

FIGURA 18. CROMATOGRAMA DOS PRODUTOS DA HIDRÓLISE DO AMIDO COM O TEMPO DE FERMENTAÇÃO PARA O *Bacillus polymyxa*



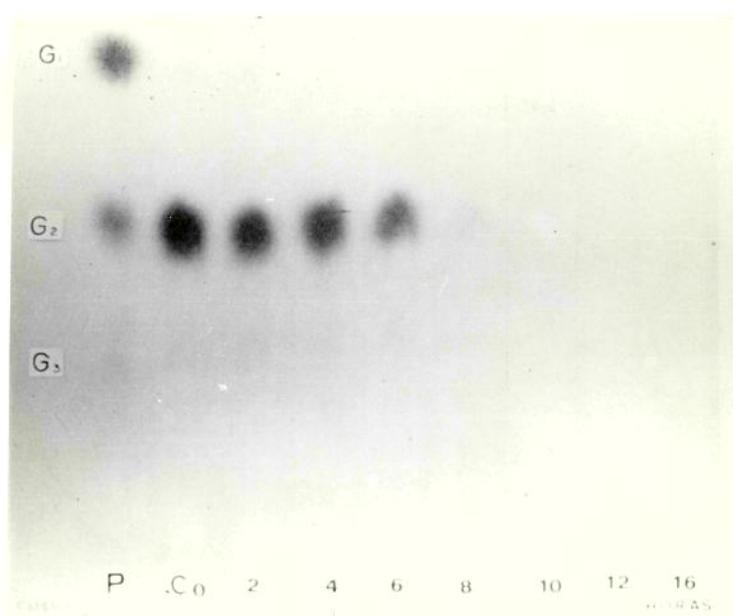
Meio de cultura: amido 1%, triptona 1%, extrato de levedura 1%, pH7,0, incubado a 35°C no mini-fermentador. G<sub>1</sub> - glicose; G<sub>2</sub> - maltose; G<sub>3</sub> - maltotriose; P - padrão de açúcares.

FIGURA 19. CROMATOGRAMA DA PRODUÇÃO DA ENZIMA NO MEIO DE CULTURA COM O TEMPO DE FERMENTAÇÃO PARA O *Bacillus polymyxa*



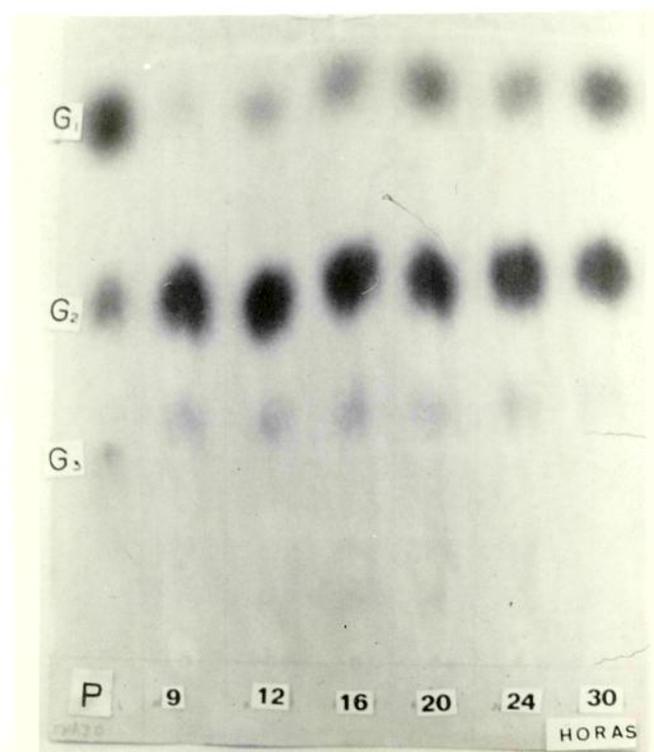
Meio de cultura: amido 1%, triptona 1%, extrato de levedura 1%, pH7,0, incubado a 35°C no mini-fermentador. G<sub>1</sub> - glicose; G<sub>2</sub> - maltose; G<sub>3</sub> - maltotriose; P - padrão de açúcares.

FIGURA 20. CROMATOGRAMA DO CONSUMO DA MALTOSE NO MEIO DE CULTURA COM O TEMPO DE FERMENTAÇÃO PARA O *Bacillus polymyxa*



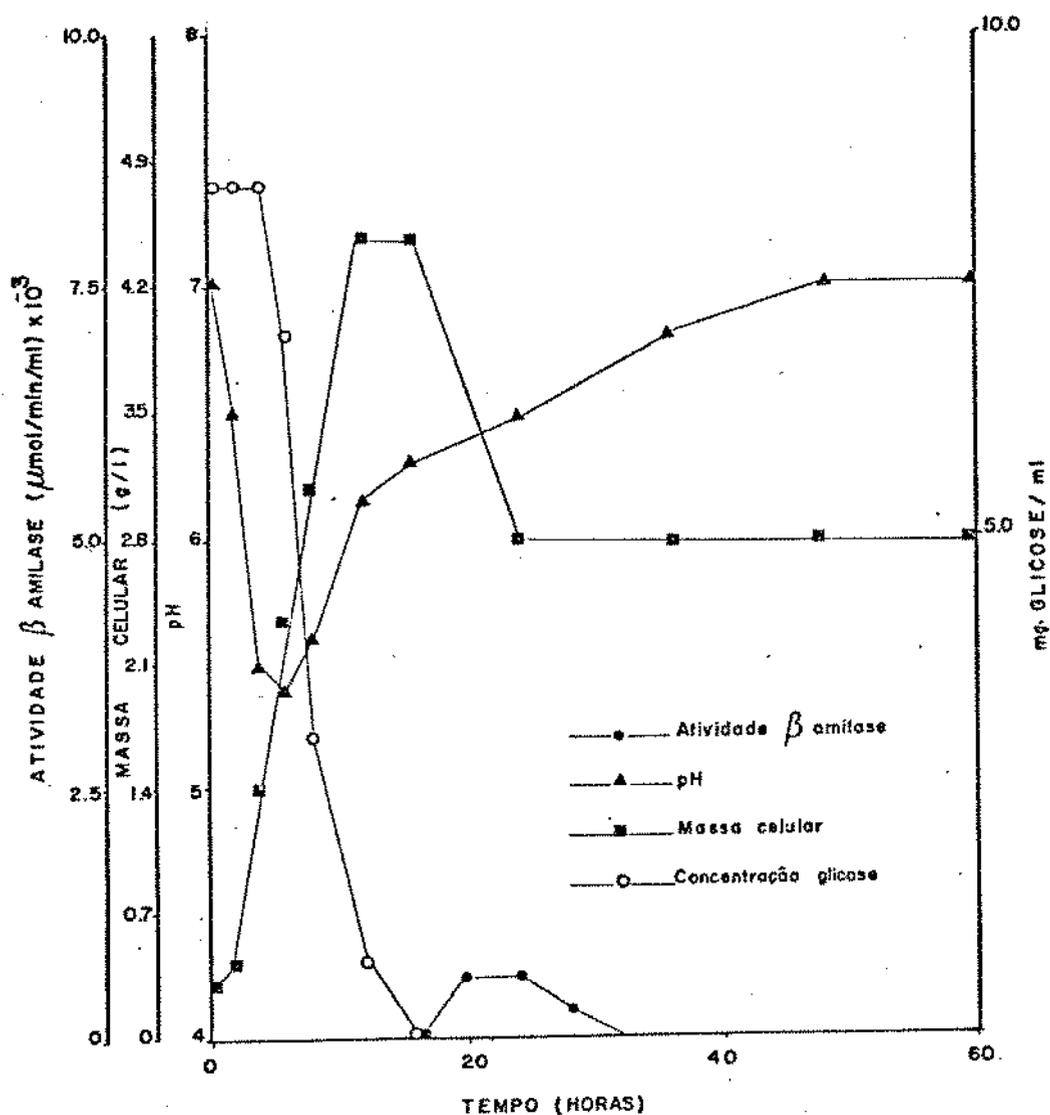
Meio de cultura: maltose 1%, triptona 1%, extrato de levedura 1%, pH7,0, incubado a 35°C no mini-fermentador. G<sub>1</sub> - glicose; G<sub>2</sub> - maltose; G<sub>3</sub> - maltotriose; P - padrão de açúcares.

FIGURA 21. CROMATOGRAMA DA PRODUÇÃO DA ENZIMA NO MEIO DE CULTURA COM O TEMPO DE FERMENTAÇÃO PARA O *Bacillus polymyxa*



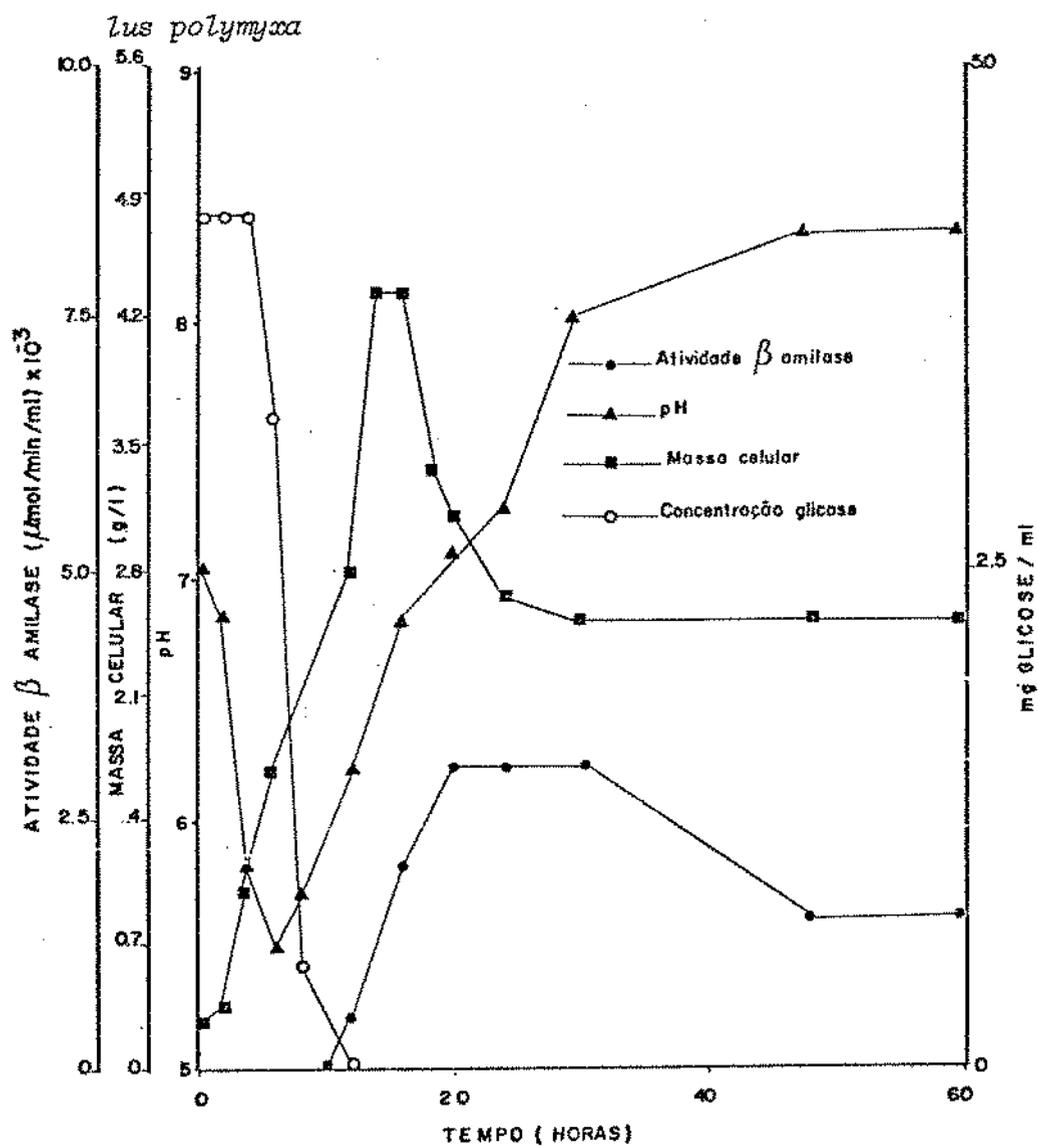
Meio de cultura: maltose 1%, triptona 1%, extrato de levedura 1%, pH7,0, incubado a 35°C no mini-fermentador. G<sub>1</sub> - glicose; G<sub>2</sub> - maltose; G<sub>3</sub> - maltotriose; P - padrão de açúcares.

FIGURA 22. ESTUDO DA RELAÇÃO ENTRE O TEMPO DE FERMENTAÇÃO E PRODUÇÃO DA  $\beta$ -AMILASE, MASSA CELULAR, pH E CONSUMO DA GLICOSE PELO *Bacillus polymyxa*



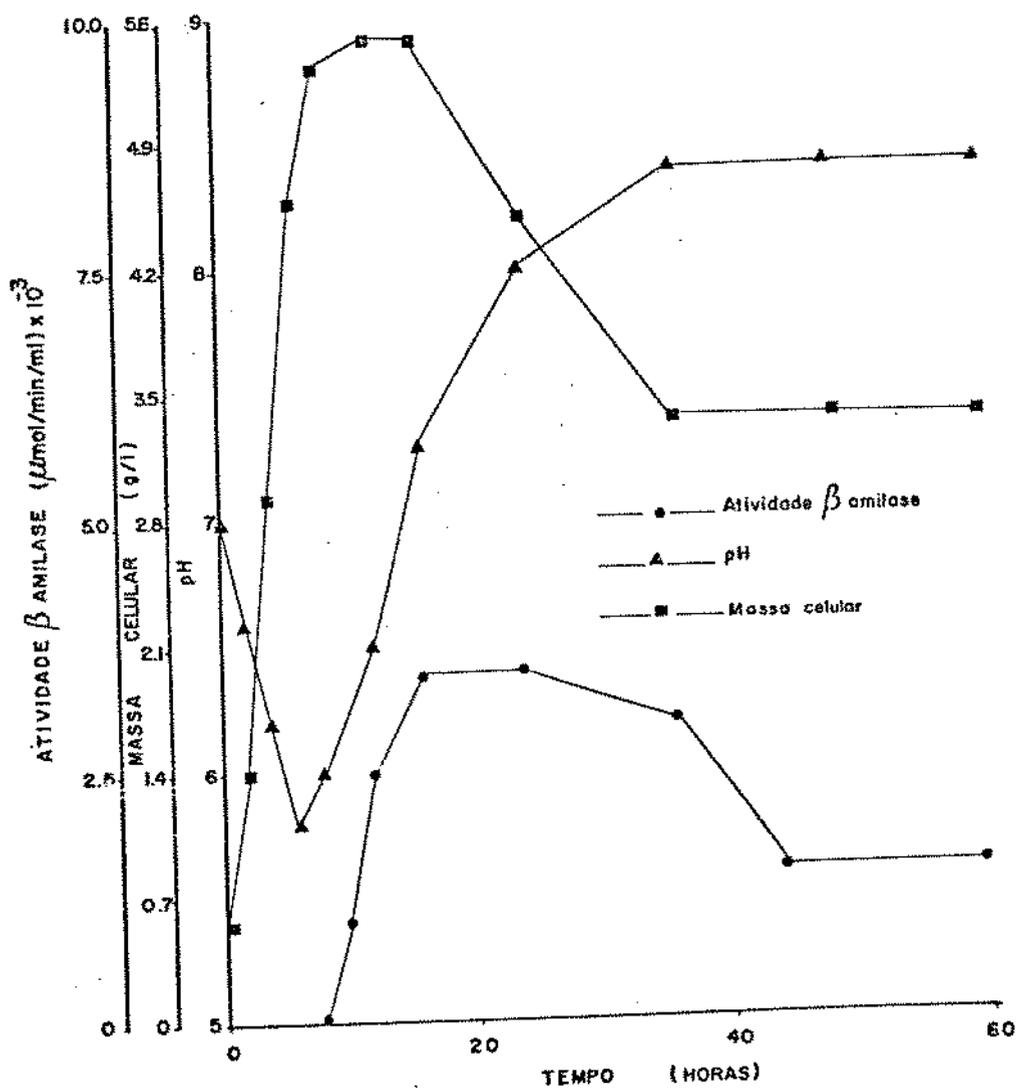
Meio de cultura: glicose 1%, triptona 1%, extrato de levedura 1%, pH7,0, incubado a 30°C no mini-fermentador.

FIGURA 23. ESTUDO DA RELAÇÃO ENTRE O TEMPO DE FERMENTAÇÃO E PRODUÇÃO DA  $\beta$ -AMILASE, MASSA CELULAR, pH E CONSUMO DA GLICOSE PELO *Bacillus polymyxa*



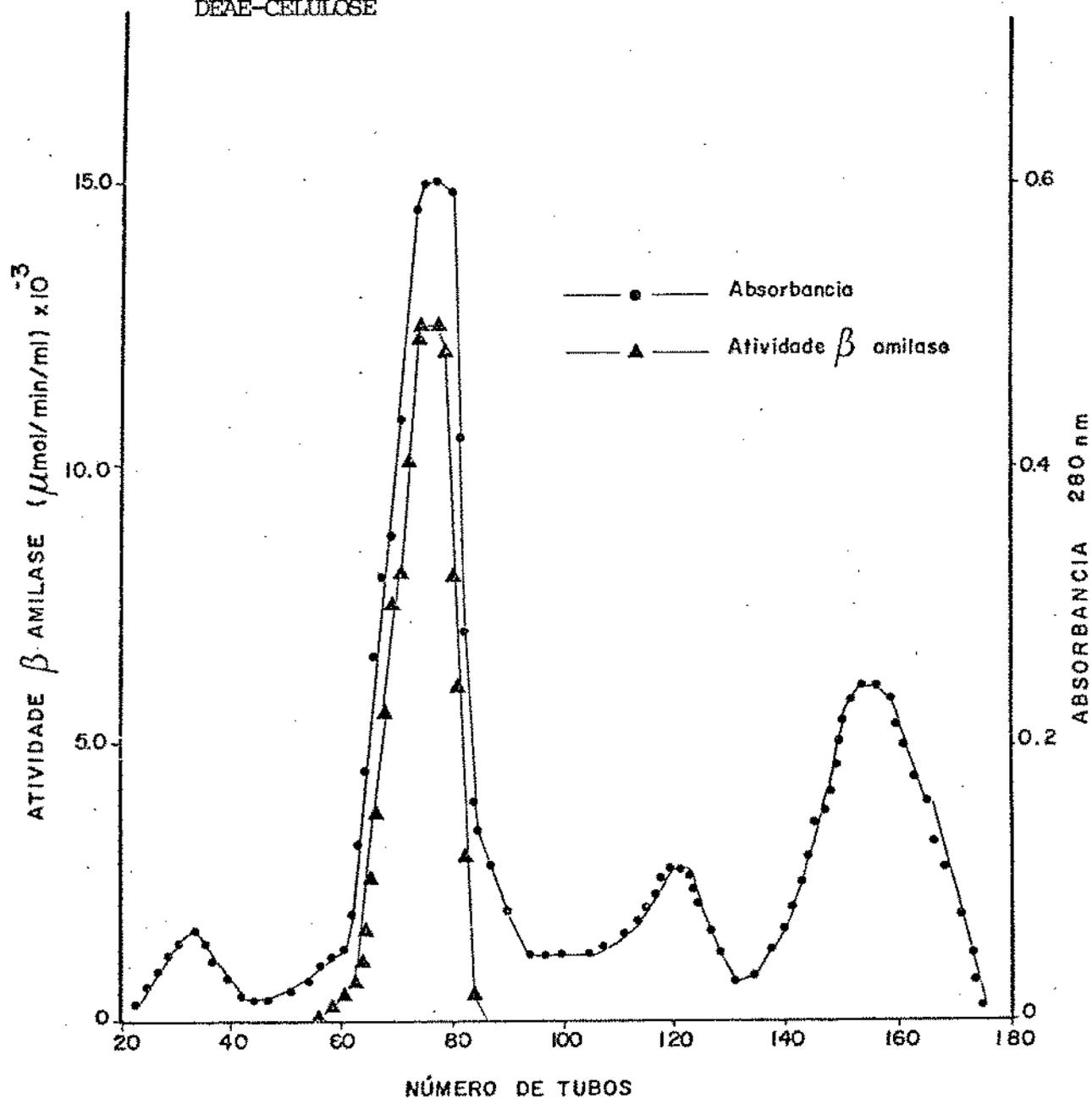
Meio de cultura: maltose 0,5%, glicose 0,5%, triptona 1%, extrato de levedura 1%, pH7,0, incubado a 30°C no mini-fermentador.

FIGURA 24. ESTUDO DA RELAÇÃO ENTRE O TEMPO DE FERMENTAÇÃO E PRODUÇÃO DA  $\beta$ -AMILASE, MASSA CELULAR E pH PELO *Bacillus polymyxa*



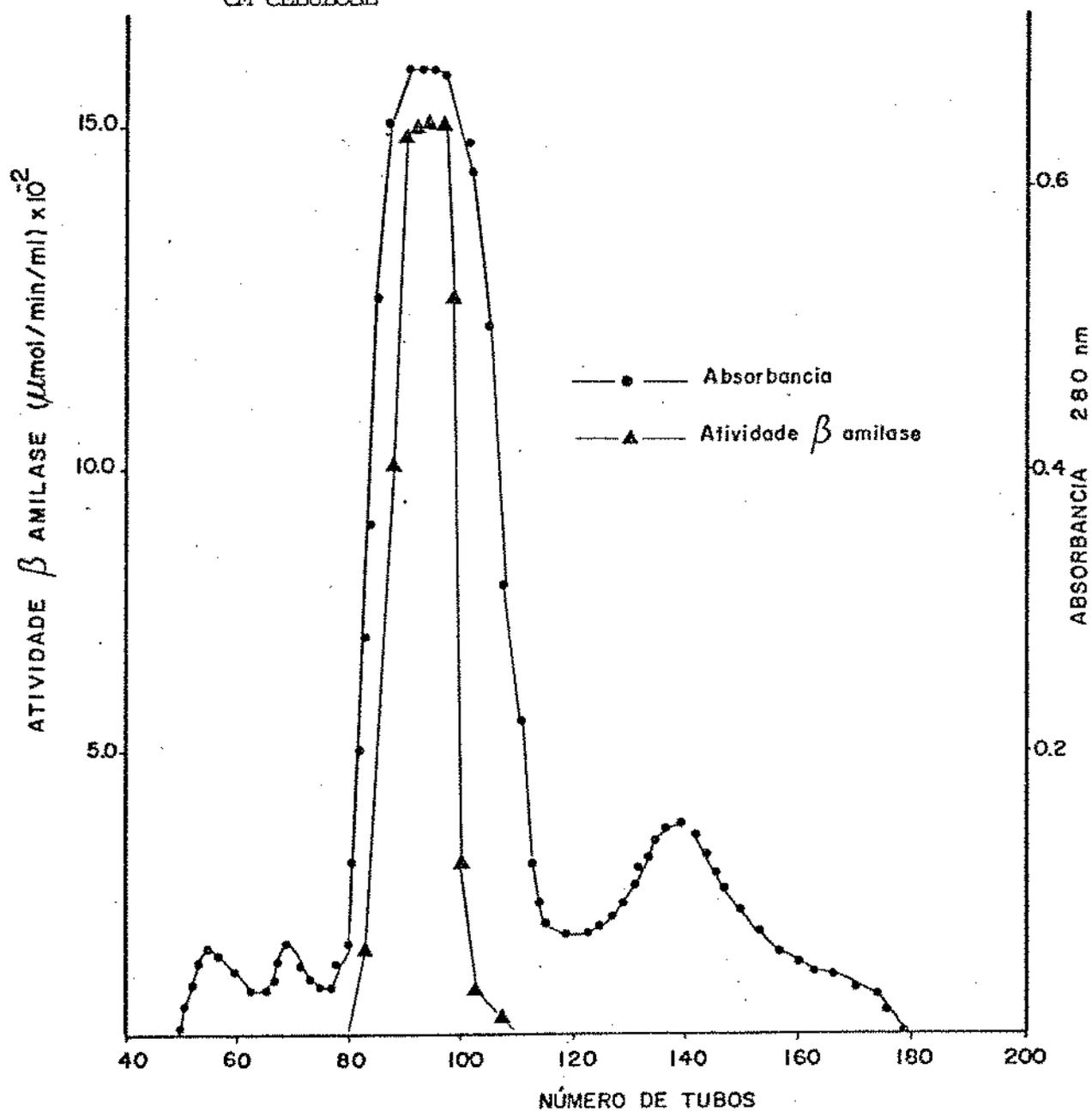
Meio de cultura: maltose 1%, triptona 1%, extrato de levedura 1%, pH7,0, incubado a 30°C no mini-fermentador.

FIGURA 25. CROMATOGRAMA DA  $\beta$ -AMILASE DO *Bacillus megaterium* EM COLUNA DE DEAE-CELULOSE



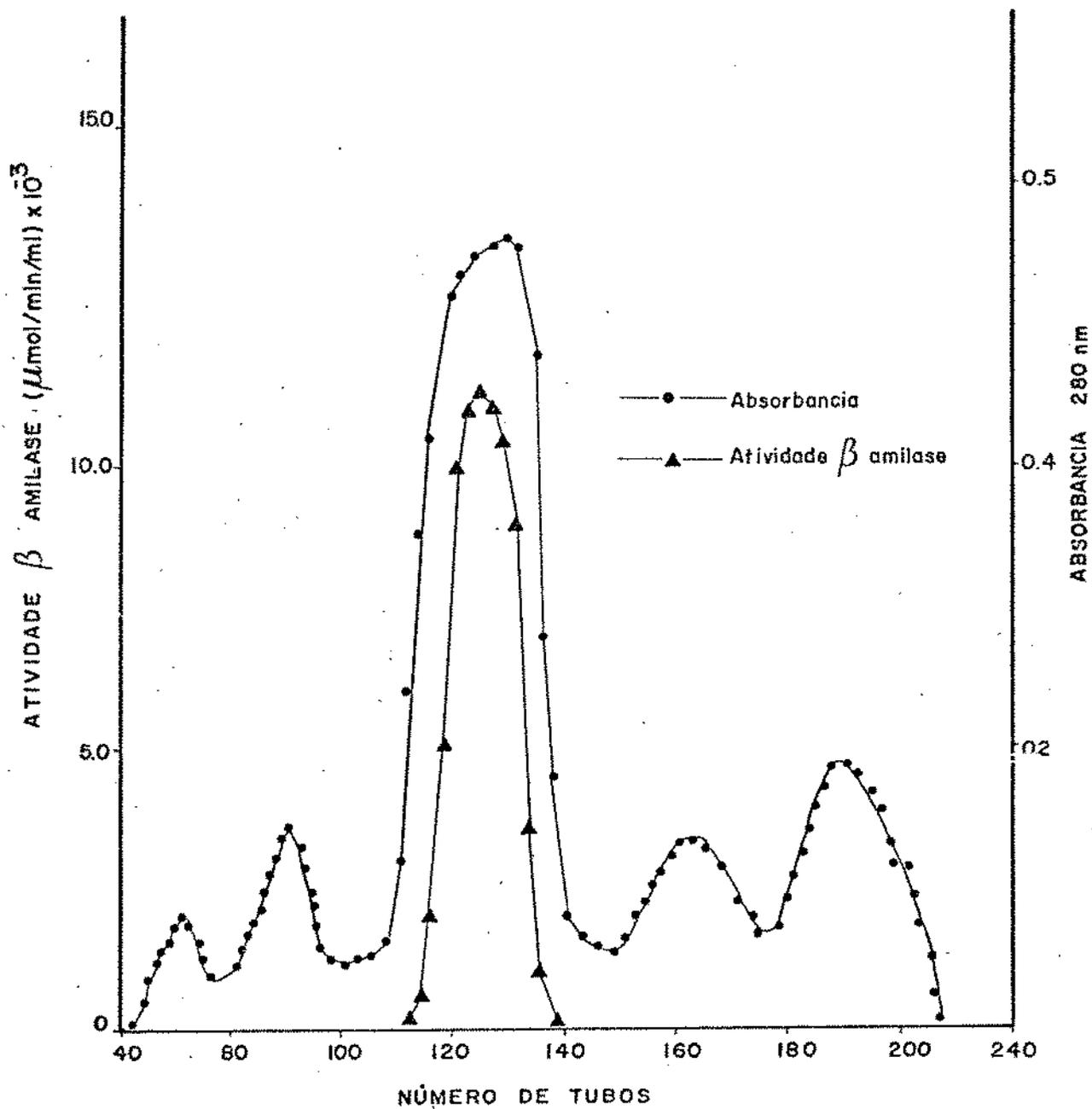
Fluxo de 10ml/h,coletando-se 5ml/tubo.

FIGURA 26. CROMATOGRAMA DA  $\beta$ -AMILASE DO *Bacillus megaterium* EM COLUNA DE CM-CELULOSE



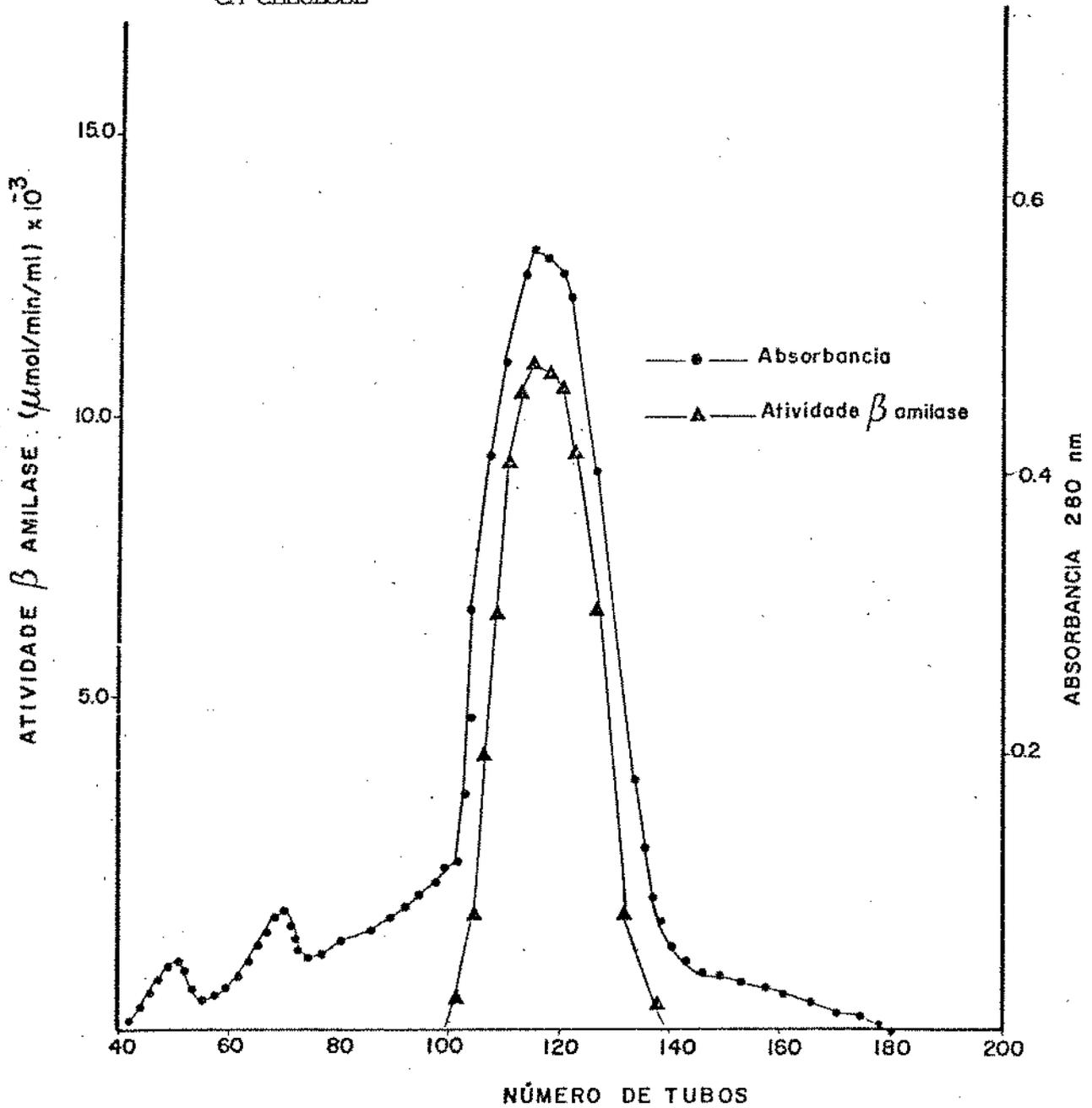
Fluxo de 10ml/h, coletando-se 5ml/tubo.

FIGURA 27. CROMATOGRAMA DA  $\beta$ -AMILASE DO *Bacillus polymyxa* EM COLUNA DE DEAE-CELULOSE

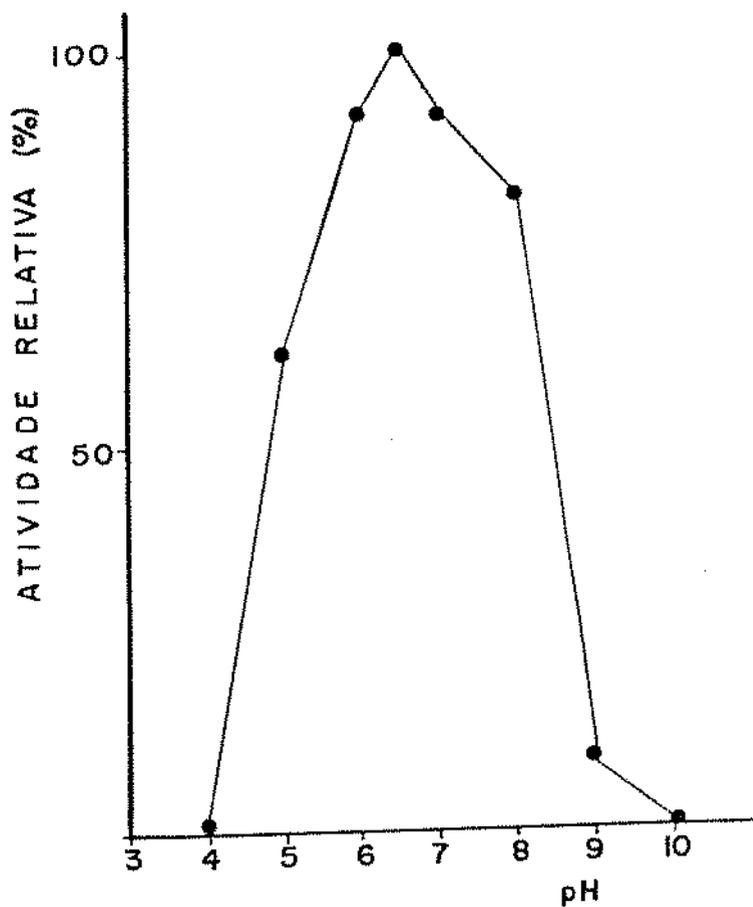


Fluxo de 10ml/h, coletando-se 5ml/tubo.

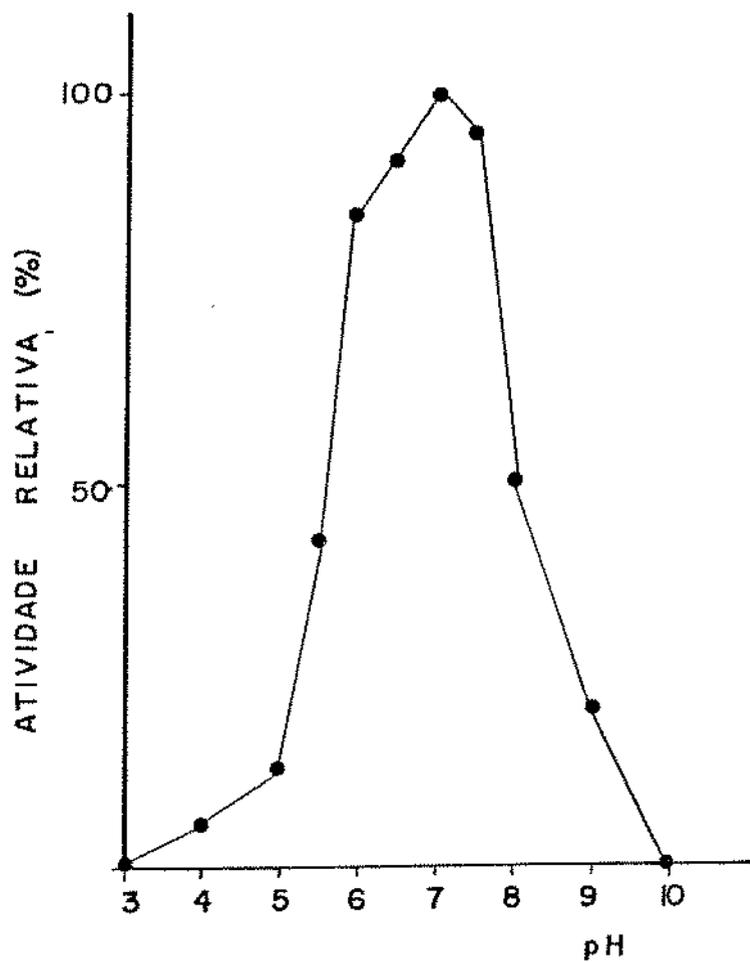
FIGURA 28. CROMATOGRAMA DA  $\beta$ -AMILASE DO *Bacillus polymyxa* EM COLUNA DE CM-CELULOSE



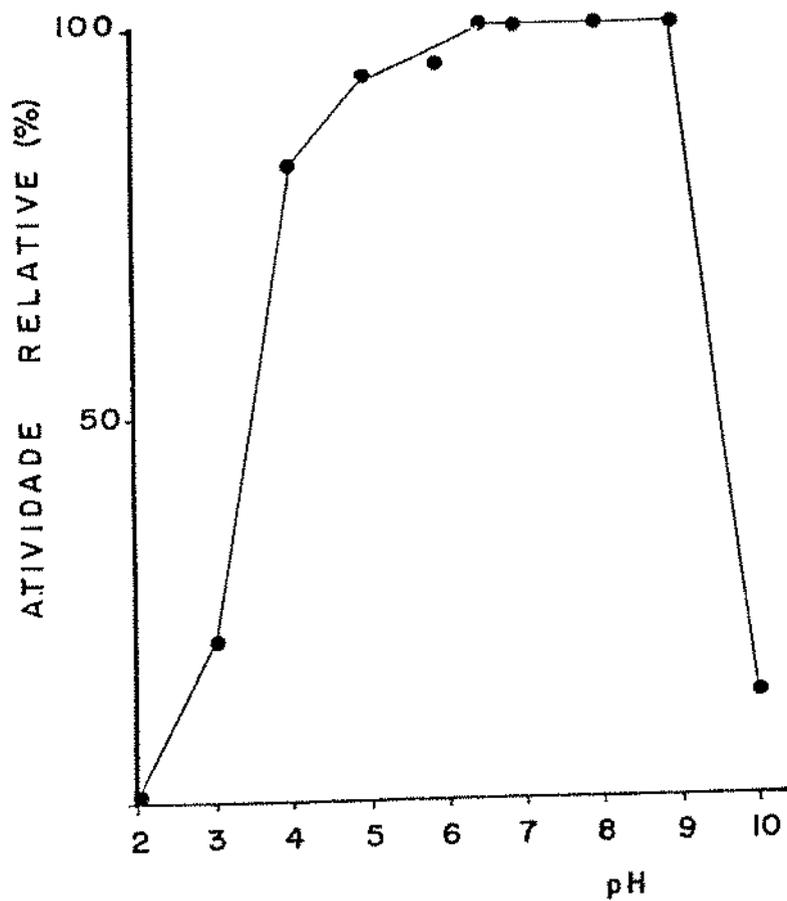
Fluxo 10ml/h, coletando-se 5ml/tubo.

FIGURA 29. EFEITO DO pH NA ATIVIDADE DA  $\beta$ -AMILASE DO *Bacillus megaterium*

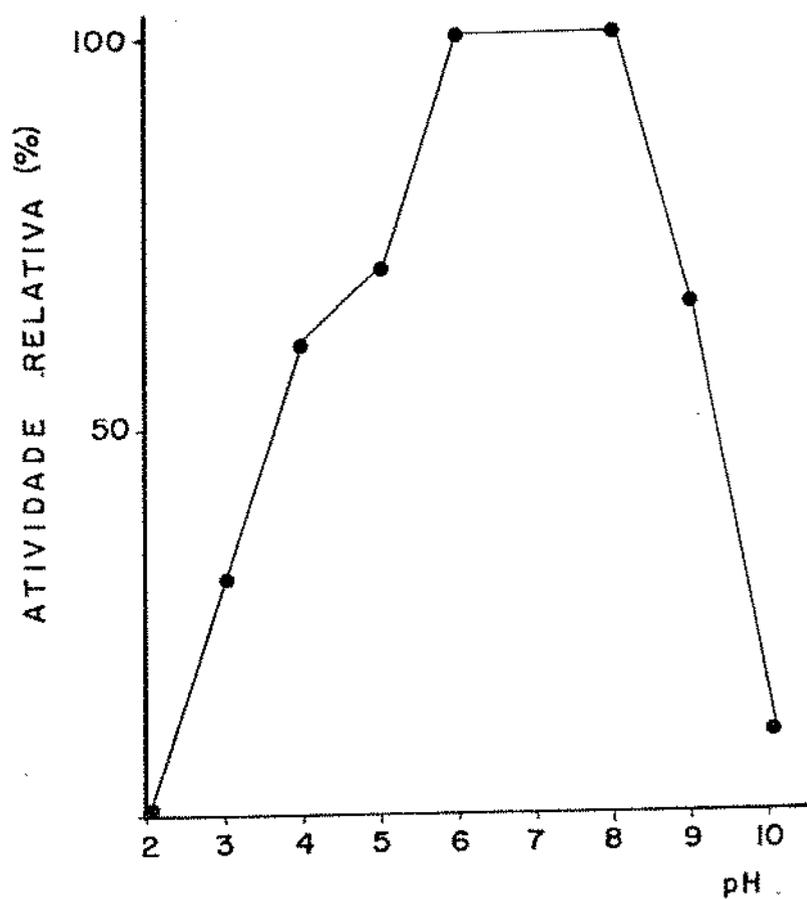
Incubou-se 1ml da solução enzimática (45 $\mu$ g proteína/ml) em 9ml da solução de amido a 1% a 40°C por 30 minutos.

FIGURA 30. EFEITO DO pH NA ATIVIDADE DA  $\beta$ -AMILASE DO *Bacillus polymyxa*

Incubou-se 1ml da solução enzimática (45 $\mu$ g proteína/ml) em 9ml da solução de amido a 1% a 40°C por 30 minutos.

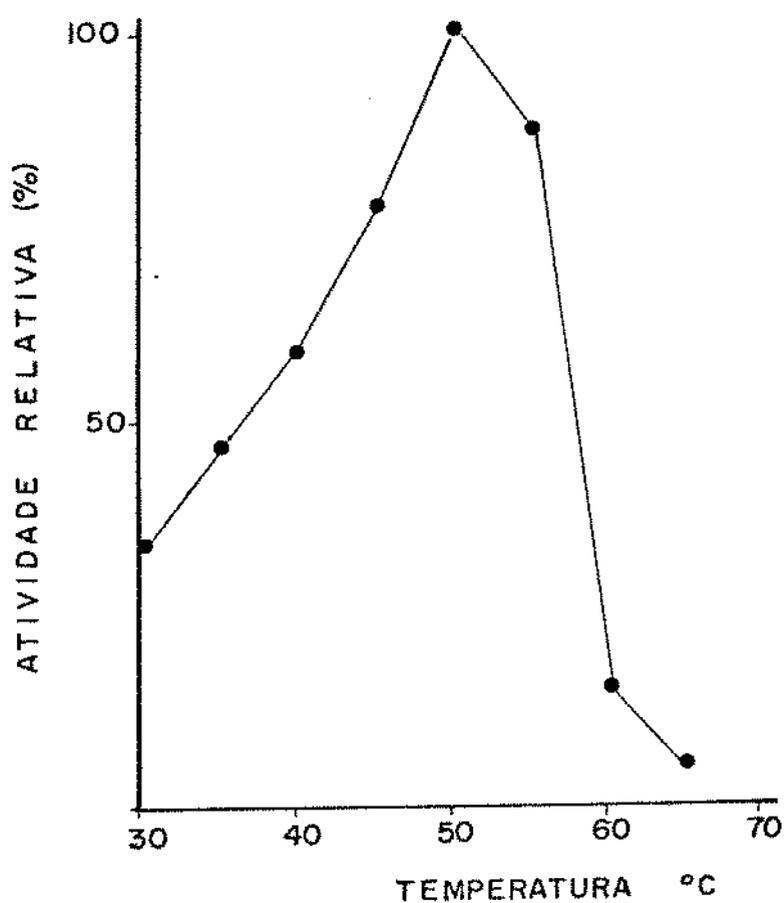
FIGURA 31. EFEITO DO pH NA ESTABILIDADE DA  $\beta$ -AMILASE DO *Bacillus megaterium*

Incubou-se 5ml da solução enzimática (45 $\mu$ g proteína/ml) + 5ml da solução tampão a temperatura de  $\pm 28^{\circ}\text{C}$  por 12 horas.

FIGURA 32. EFEITO DO pH NA ESTABILIDADE DA  $\beta$ -AMILASE DO *Bacillus polymyxa*

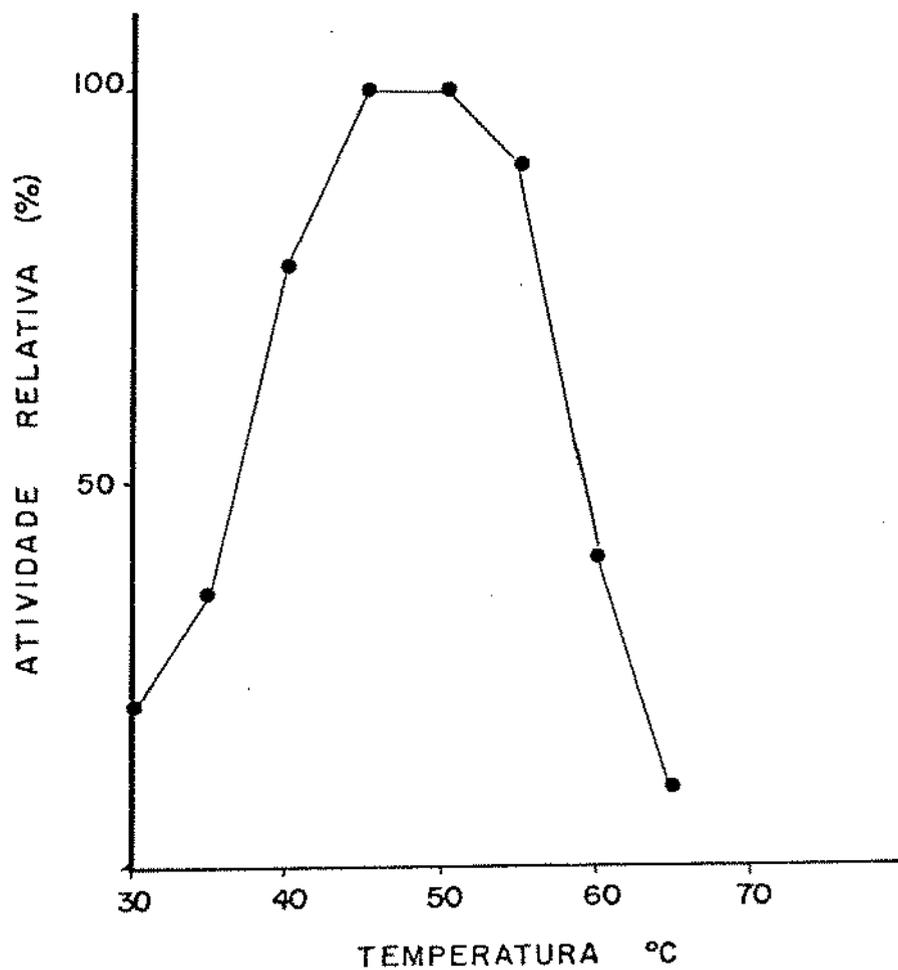
Incubou-se 5ml da solução enzimática (45 $\mu$ g proteína/ml) + 5ml da solução tampão a temperatura  $\pm 28^{\circ}\text{C}$  por 12 horas.

FIGURA 33. EFEITO DA TEMPERATURA NA ATIVIDADE DA  $\beta$ -AMILASE DO *Bacillus megaterium*



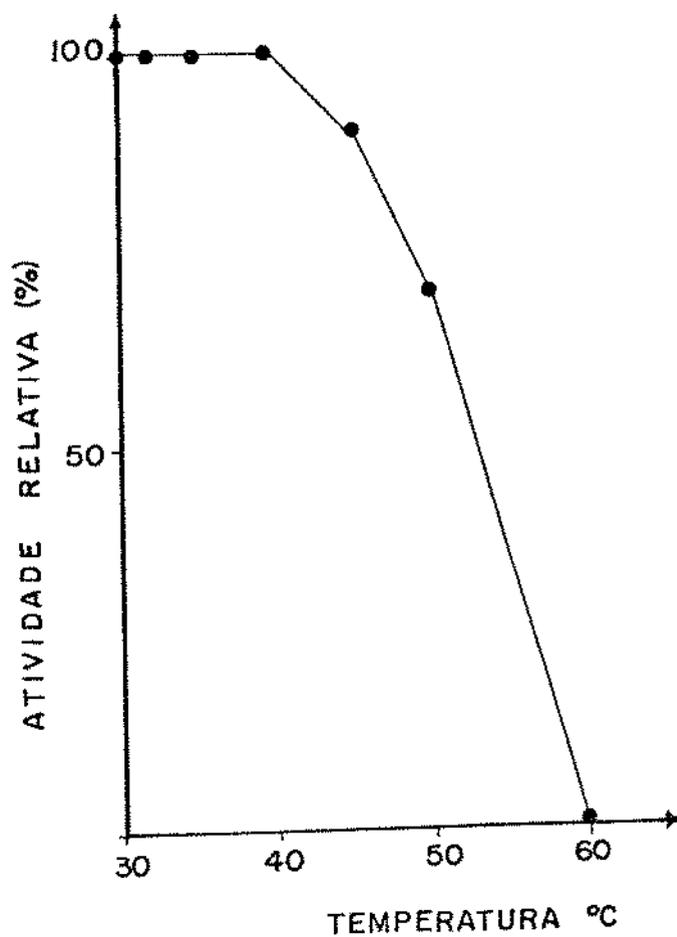
Incubou-se 1ml da solução enzimática (45 $\mu$ g proteína/ml) em solução de amido a 1%, pH6,5 por 30 minutos.

FIGURA 34. EFEITO DA TEMPERATURA NA ATIVIDADE DA  $\beta$ -AMILASE DO *Bacillus polymyxa*



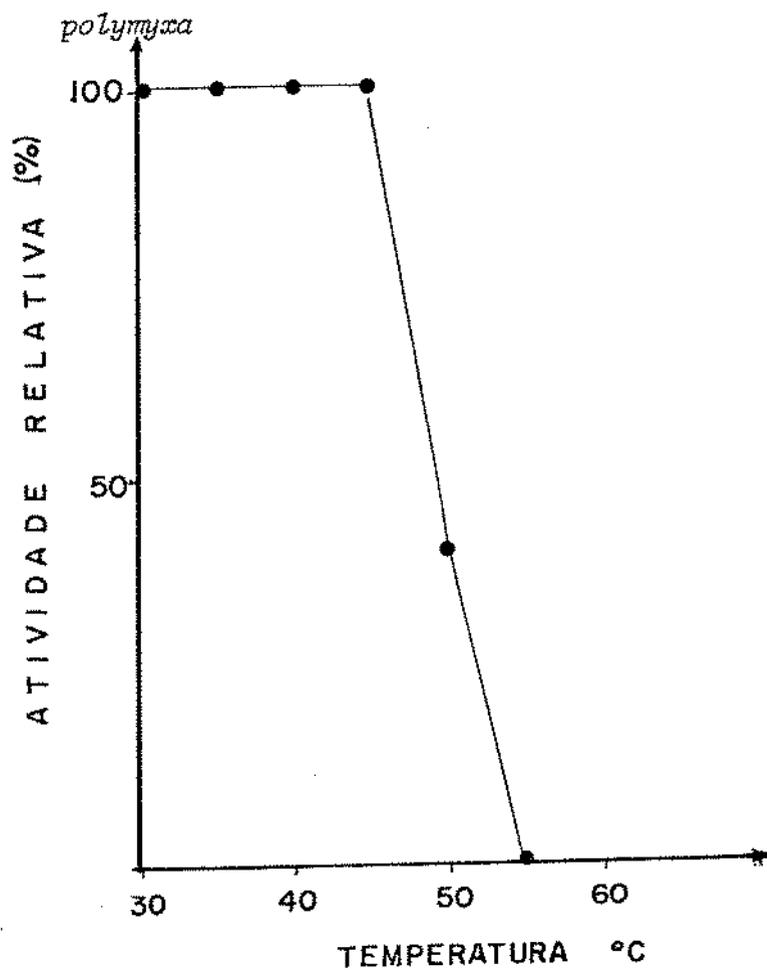
Incubou-se 1ml da solução enzimática (45 $\mu$ g proteína/ml) em solução de amido 1%, pH7,0, por 30 minutos.

FIGURA 35. EFEITO DA TEMPERATURA NA ESTABILIDADE DA  $\beta$ -AMILASE DO *Bacillus megaterium*

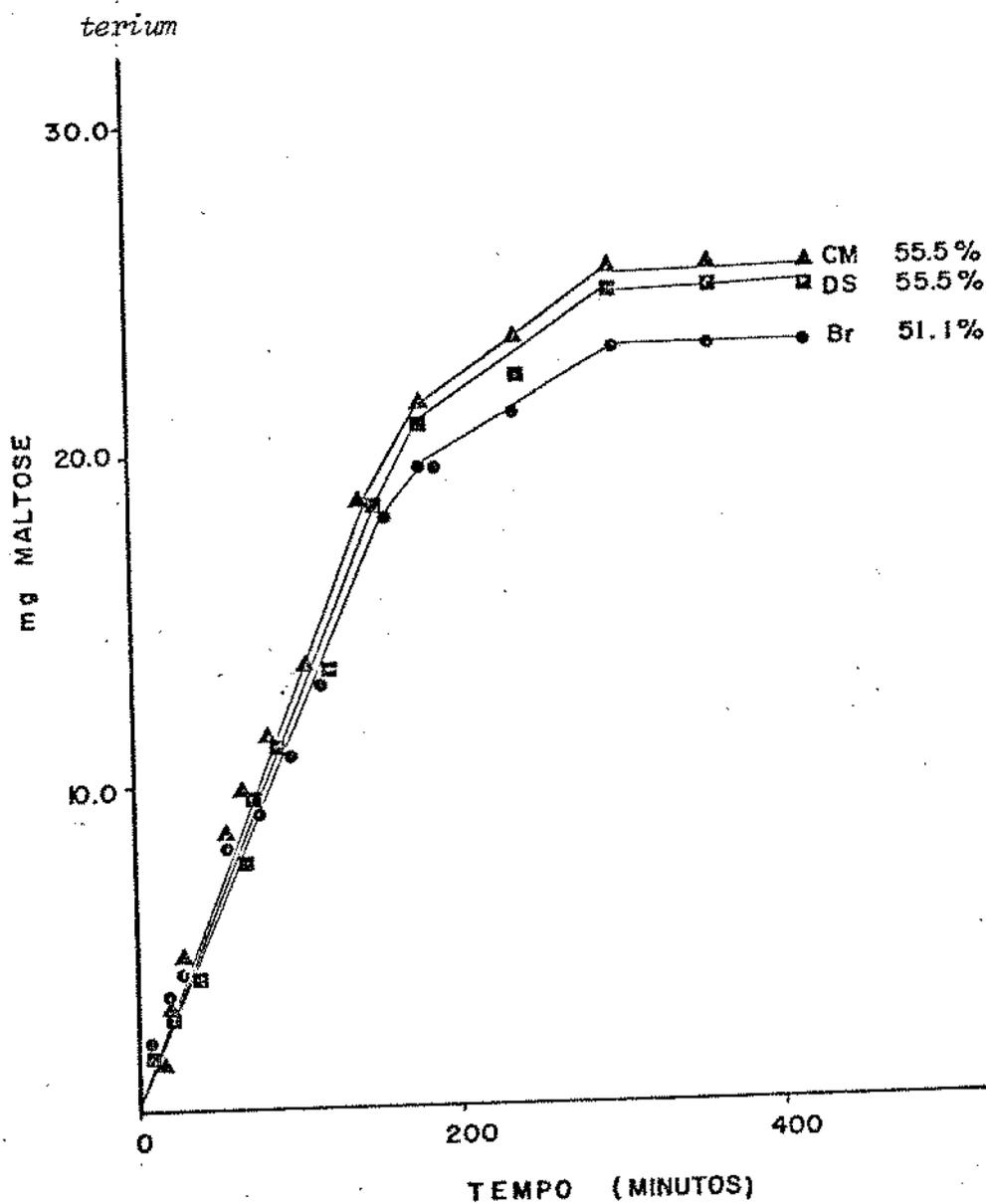


Incubou-se 5ml de solução enzimática (90 $\mu$ g proteína/ml) a diferentes temperaturas por 30 minutos

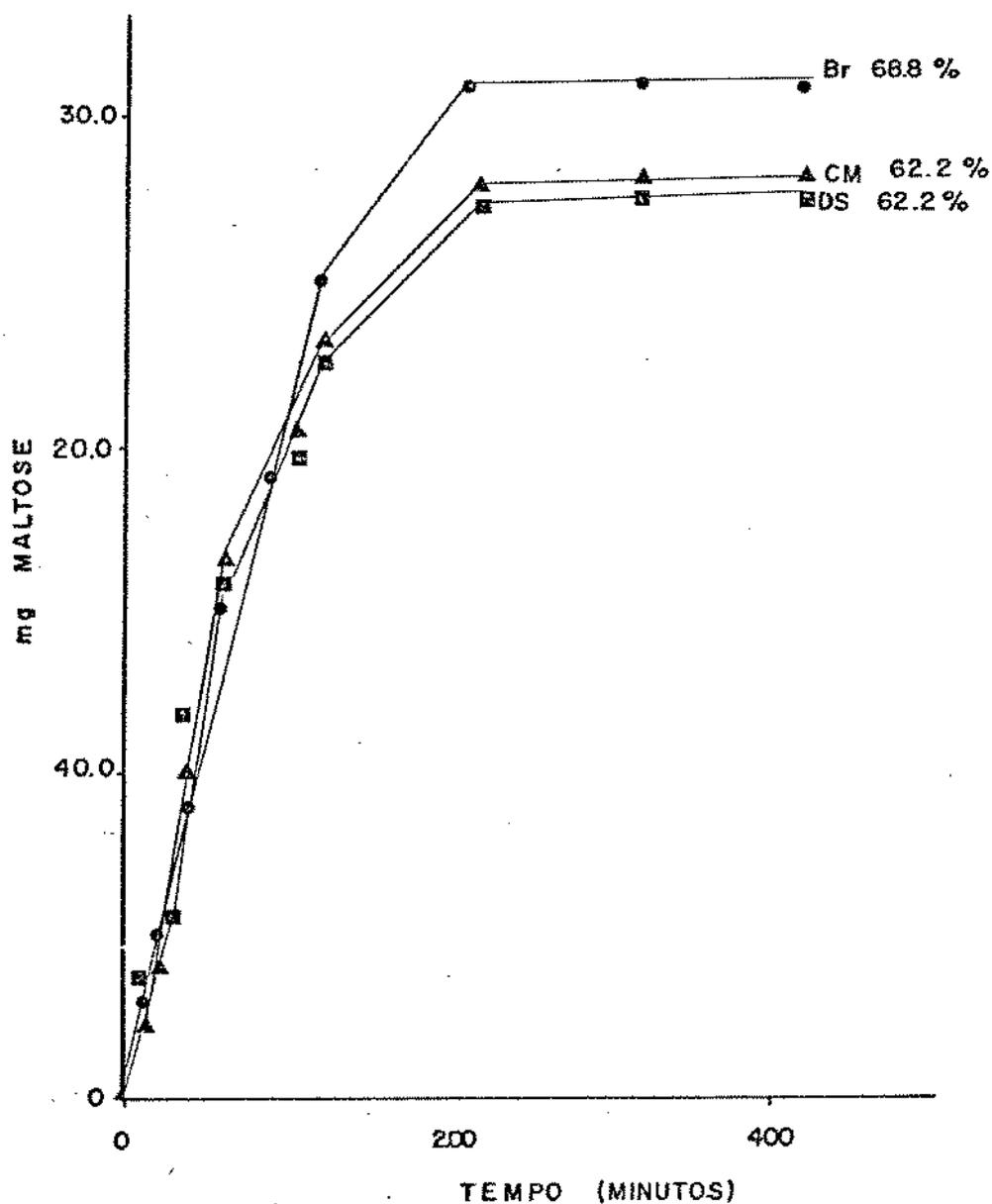
FIGURA 36. EFEITO DA TEMPERATURA NA ESTABILIDADE DA  $\beta$ -AMILASE DO *Bacillus polymyxa*



Incubou-se 5ml da solução enzimática (90 $\mu$ g proteína/ml) a diferentes temperaturas por 30 minutos.

FIGURA 37. HIDRÓLISE DO AMIDO PELA AÇÃO DA  $\beta$ -AMILASE DO *Bacillus megaterium*

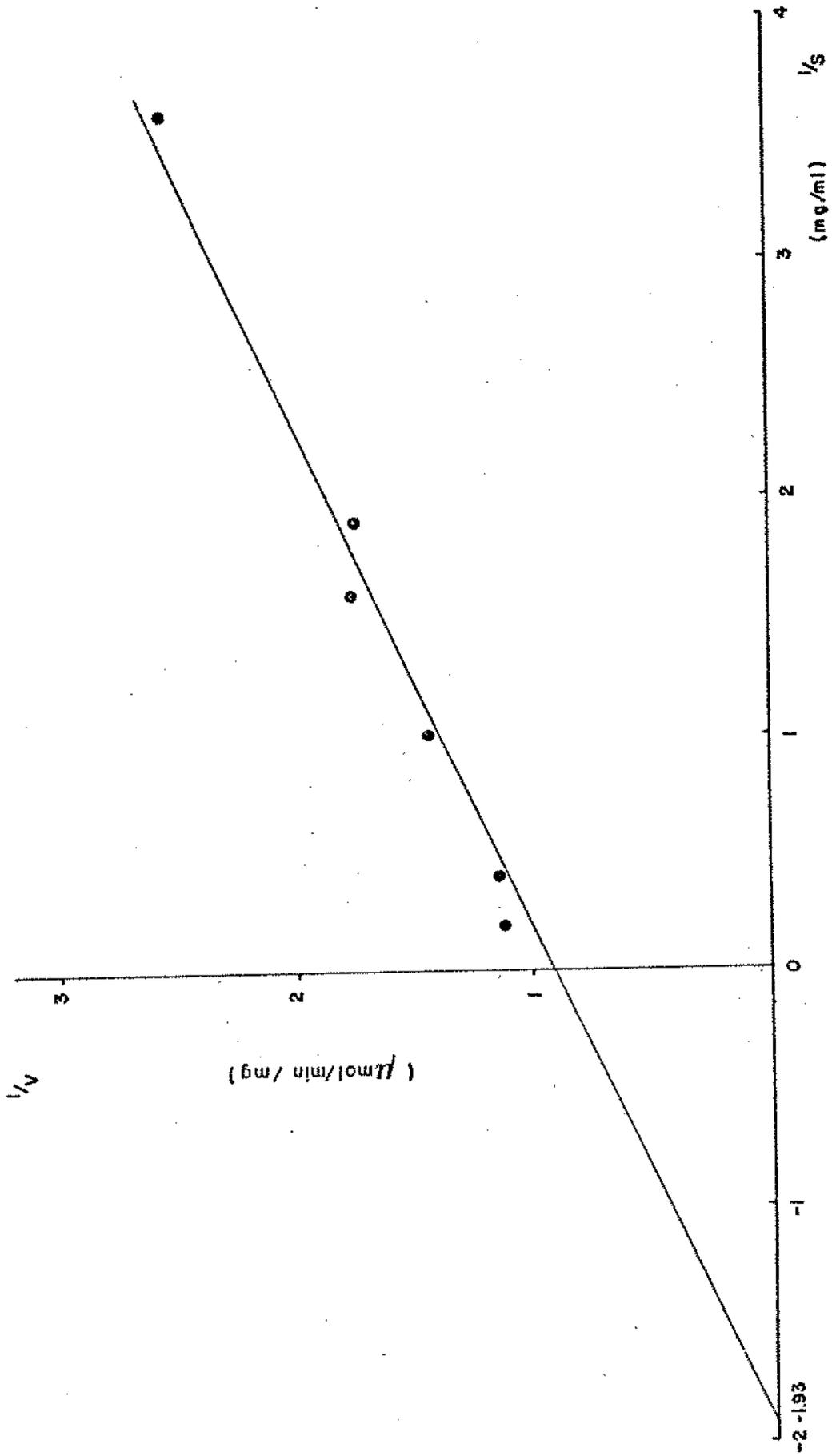
Mistura da reação: solução de amido 0,5% em tampão fosfato 0,05M, pH7,0, com enzima (330U.A./ml). BR - enzima bruta, precipitação  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . DS - enzima purificada com DEAE-celulose. CM - enzima purificada com CM-celulose.

FIGURA 38. HIDRÓLISE DO AMIDO PELA AÇÃO DA  $\beta$ -AMILASE DO *Bacillus polymyxa*

Mistura da reação: solução de amido 0,5% em tampão fosfato 0,05M, pH7,0, com enzima (330U.A./ml). BR - enzima bruta, precipitação  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; DS - enzima purificada com DEAE-celulose; CM - enzima purificada com CM-celulose.

FIGURA 39. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DO SUBSTRATO NA VELOCIDADE DE REAÇÃO DA  $\beta$ -AMILASE DO

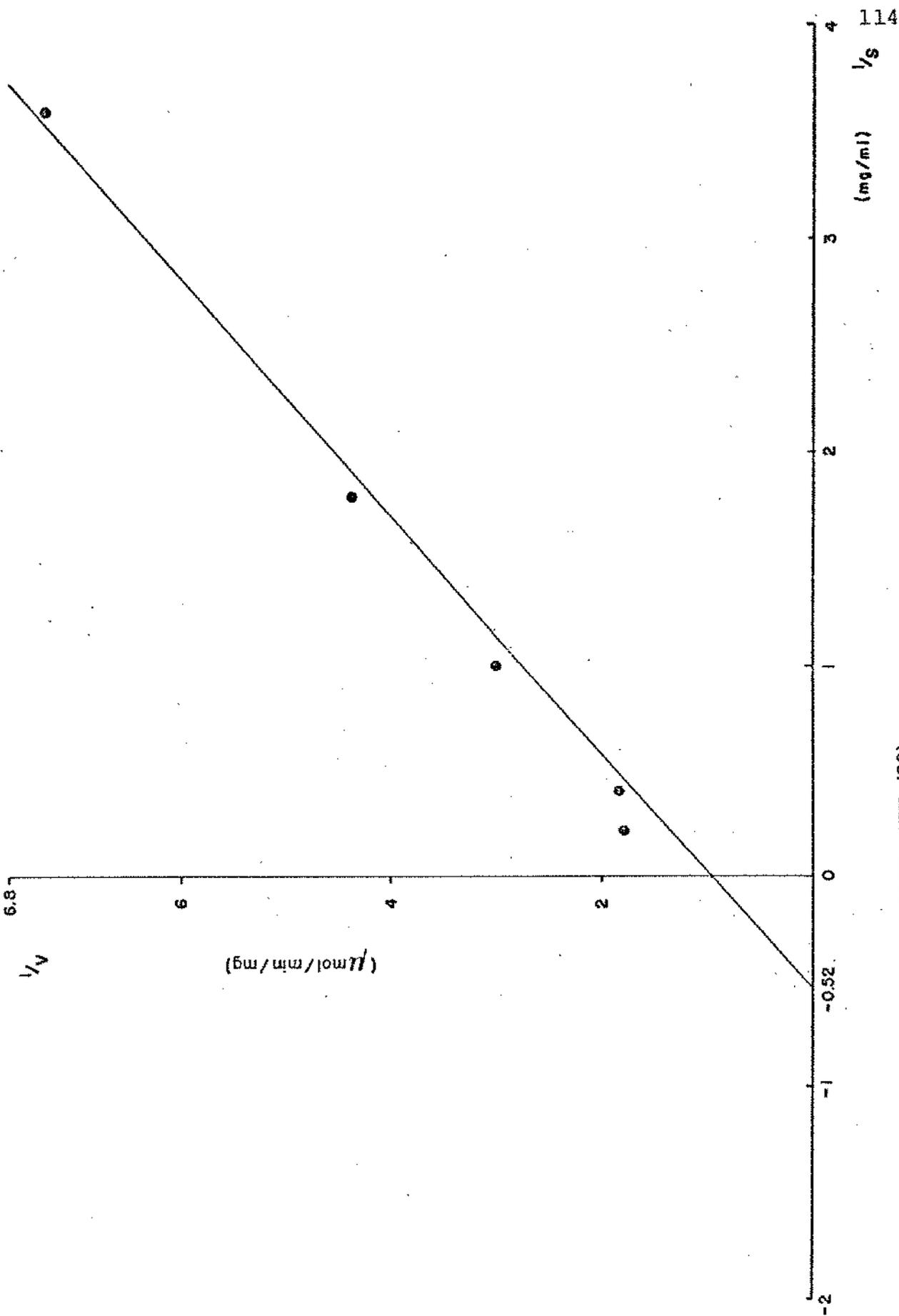
*Bacillus megaterium*



Segundo LINEWEAVER-BURK (28).

FIGURA 40. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DO SUBSTRATO NA VELOCIDADE DA REAÇÃO DA  $\beta$ -AMILASE DO

*Bacillus polymyxa*



Segundo LINEWEAVER-BURK (28).

## CONCLUSÕES

1. Dos 851 microrganismos isolados de várias fontes, apenas duas bactérias do solo, identificadas como *Bacillus polymyxa* e *Bacillus megaterium*, produziram  $\beta$ -amilase.
2. A  $\beta$ -amilase do *Bacillus polymyxa* por nós estudada, apresentou semelhança em relação aos produtos de hidrólise da  $\beta$ -amilase do *Bacillus polymyxa* ATCC8523.
3. A  $\beta$ -amilase do *Bacillus megaterium* por nós estudada, apresentou característica semelhante com relação aos produtos de hidrólise da  $\beta$ -amilase dos vegetais e diferente da  $\beta$ -amilase do *Bacillus megaterium*, cepa nº32 (23).
4. A melhor faixa de temperatura para a produção da  $\beta$ -amilase do *Bacillus megaterium* foi entre 26° e 29°C e para a produção da  $\beta$ -amilase do *Bacillus polymyxa* entre 34° e 36°C.
5. a) O amido no meio de cultura foi o melhor indutor das  $\beta$ -amilases microbianas por nós estudadas.  
b) A caseína foi a melhor fonte de nitrogênio para o *Bacil-*

*lus polymyxa*, enquanto que a farinha de soja, usada como fonte de nitrogênio, foi melhor para o *Bacillus megaterium*.

6. As  $\beta$ -amilases microbianas purificadas apresentaram semelhanças nas suas propriedades físico-químicas:

6.1. apresentaram um pH ótimo entre 6,5 e 7,0 e a temperatura ótima entre 45° e 50°C.

6.2. foram estáveis na faixa de pH entre 6,5 e 9,0 e termoestáveis a temperatura abaixo de 50°C.

6.3. as atividades foram inibidas pelos íons metálicos  $Hg^{++}$ ,  $Fe^{++}$ ,  $Ag^+$  e p-cloromercuriobenzoato.

6.4. a inibição pelo p-cloromercuriobenzoato foi reativada pela cisteína.

6.5. as enzimas  $\beta$ -amilase purificadas apresentaram semelhanças na percentagem de hidrólise: 61,8% para *Bacillus megaterium* e 68,8% para *Bacillus polymyxa*. Esta percentagem para o *Bacillus megaterium* foi quase que totalmente em maltose. Entretanto, para o *Bacillus polymyxa*, a percentagem de maltose foi 84,2%.

6.6. os valores de  $K_m$  e  $V_{max}$  da  $\beta$ -amilase do *Bacillus megaterium*

um e do *Bacillus polymyxa* para o substrato amido foram de 0,52mg/ml e 1,04 $\mu$ mol/min/mg, e 1,92mg/ml e 1,02 $\mu$ mol/min/mg, respectivamente.

BIBLIOGRAFIA

1. ARTOM, C. & ORESTANO, G. Cinetique comparee de la liquefaction et de la saccharification enzymatique de l'amidon. I-amilase des graines de soja. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 13:516-541, 1931.
2. B.B.L. manual of products and laboratory procedures. 5.ed., Cockeysville, BBL Division of Beeton Dickson and Company, 1972, 211p.
3. BALDWIN, E. Glycoside hydrolases. In \_\_\_\_\_. Dynamic aspect of biochemistry. Inglaterra, Cambridge Univer.Press, 1967, p.70-78.
4. BALLS, A.K.; WALDEN, M.K. & THOMPSON, R.R. A crystalline protein with  $\beta$ -amylase activity, prepared from sweet potatoes. *J. Biol. Chem.*, 163:571-572, 1946.
5. BALLS, A.K.; THOMPSON, R.R. & WALDEN, M.K. A crystalline  $\beta$ -amylase from sweet potatoes. *J. Biol. Chem.*, 173:9-19, 1948.
6. BERNFELD, P. Amylase,  $\alpha$  and  $\beta$ . In COLOWICK, S.P. & KAPLAN, N.D. Methods in enzymology. New York Academic Press, 1955, p.149-158.
7. BERNFELD, P. & GURTHUR, P. Recherches sur l'amidon XXXVIII. Methode perfectionnee de degradation  $\beta$ -amylatique de l'amylase et de amylopectin. *Helv. Chim. Acta*, 31:106-108, 1948.
8. BIRD, R. & HOPKINS, R.H. The mechanism of  $\beta$ -amylase fission products. *Biochemical Journal*, 56:140-146, 1954.
9. BUCHANAN, R.E. & GIBBONS, N.E. Bergey's manual of determinative bacteriology. 8.ed., Baltimore, The Williams & Wilkins

Company, 1975, 1268p.

10. DAHLQUIST, A. Method for assay of intestinal disaccharide. *Anal. Biochem.*, 7:18-21, 1964.
11. DIFCO manual of dehydrated culture media and reagents, for microbiological and chemical laboratory procedures. 9.ed. Detroit Difco Laboratories, 1972, 350p.
12. DUNN, C.G. *et al.* Production of amylolytic enzymes in natural and synthetic media. *Appl. Microbiol.*, 7:212-218, 1959.
13. ENGLARD, S. & SINGER, T.D. Physicochemical studies in  $\beta$ -amylases. *J. Biol. Chem.*, 187:213-219, 1950.
14. ENGLARD, S.; SOROF, S. & SINGER, T.P. Intramolecular nature of the oxidative inactivation of crystalline  $\beta$ -amylase. *J. Biol. Chem.*, 189:217-226, 1951.
15. FIELDS, M. Método para estudo das bactérias *termófilas esporulantes*. Trad. de F. Yokoya e V.P. Canhos. Campinas, Fundação Centro Tropical de Pesquisas e Tecnologia de Alimentos, 1975, 202p.
16. FISCHER, E.H. *et al.* The purification and crystallization of malt  $\beta$ -amylase. *Arch. Biochem.*, 27:235-237, 1950.
17. FUKUMOTO, J. & TSUJISAKA, Y. Purification and crystallization of the  $\beta$ -amylase of soybean. *Kagaku to Kōgyō*, Osaka, 28: 282-287, 1954.
18. FUKUMOTO, J. & TSUJISAKA, Y. Purification and recrystallization of the  $\beta$ -amylase of soybean. *Kagaku to Kōgyō*, Osaka, 29:124-130, 1955.
19. GERTLER, A. & BIRK, Y. Purification and characterization of a  $\beta$ -amylase from soya beans. *Biochem. J.*, 95:621-627, 1965.

20. GORDON, R.E.; HAYNES, W.C. & HOR-NAYPANG, C. *The Genus Bacillus*. Washington, D.C., USDA, 1973, 283p. (Agricultural Research Service, manual, 427).
21. GRIFFIN, J.P. & FORGARTY, W.M. Production of an amylolytic enzyme by *Bacillus polymyxa* in batch cultures. *J. Appl. Chem. Biotechnol.*, 23:301-308, 1973.
22. HANSON, R.S.; BLICHAURSKA, J. & SZULMAJSTER, J. Relationship between the tricarboxylic acid cycle enzymes and sporulation of *Bacillus subtilis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 17(1): 1-6, 1964.
23. HIGASHIHARA, M. & OKADA, S. Studies on  $\beta$ -amylase of *Bacillus megaterium* strain n932. *Agr. Biol. Chem.*, 38(51):1023-1029, 1974.
24. KNEEN, E. & BECKORD, L.D. Quantity and quality of amylase produced by various bacterial isolates. *Arch. Biochem.*, 10:41-54, 1946.
25. KULP, K. Carbohydrases. In REED, G. *Enzyme in food processing*. 2.ed. New York Academic Press, 1975, p.54-117.
26. LABORATORY Manual for Food Canners and Processors. Microbiology and processing. Westport, Connecticut, The AVI Publishing, 1968, v.1.
27. LEHNINGER, A.L. Sugar, storage polysaccharides and cell walls, In \_\_\_\_\_. *Biochemistry*. New York, Worth, 1976, p.249-277.
28. LINEWEAVER, H. & BURK, D. The determination of enzyme dissociation constants. *J. Am. Chem. Soc.*, 56:658-666, 1934.

29. LOWRY *et al.* Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193:265-271, 1951.
30. MARSHALL, J.J. Characterization of *Bacillus polymyxa* amylase as an exoacting (1-4) $\alpha$ -D-Glucan maltohydrolase. *Febs Letters* 46(1):1-4, 1974.
31. MARTIN, V.D.; NAYLOR, N.M. & HIZON, R.M. Action of  $\beta$ -amylase, from soybeans on various starches. *Cereal Chemistry*, 16(5): 565-573, 1939.
32. MEYER, K.H.; FISCHER, E.H. & PIQUET, A. Purification et cristallisation de la  $\beta$ -amylase de malt sur les enzymes amylolytiques XVL. *Helv. Chim. Acta*, 34:316-324, 1951.
33. MEYER, K.H.; SPAHR, P.F. & FISCHER, E.H. Purification, cristallisation et propriété de la  $\beta$ -amylase de blé. Sur les enzymes amylolytiques 22. *Helv. Chim. Acta*, 36:1924-1936, 1953.
34. NAKADA, D. & MAGASANIK, B. The roles of inducer and catabolite repressor in synthesis of  $\beta$ -galactosidase by *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.*, 8:105-127, 1964.
35. NELSON, N.J. A photometric adaptation of the Somogy method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.*, 153:375-380, 1944.
36. NEWTON, J.M.; FARLEY, F.F. & NAYLOR, N.M. The use of soybean  $\beta$ -amylase to follow the modification of starch. *Cereal Chemistry*, 17:342-355, 1940.
37. NEWTON, J.M.; HIXON, R.M. & NAYLOR, N.M. Soybean amylase II - further purification of crude soybean  $\beta$ -amylase concentrates. *Cereal Chemistry*, 20:23-31, 1943.

38. NEWTON, J.M. & NAYLOR, N.M. Soybean characterization of soybean amylase. *Cereal Chemistry*, 16:71-78, 1939.
39. NIKU-PAALOVA, M.L. *et al.* The isoelectric focusing electrophoresis of wheat  $\beta$ -amylases. *Cereal Chemistry*, 49:580-585, 1972.
40. OHLSSON, E. Über die beiden Komponenten der Malzdiastase, besonders mit Rücksicht auf die Mutarotation der beider Hydrolyse der starke gebildeten Produkte. *Z. Physiol. Chem.*, 189:17-63, 1930.
41. ORESTANO, G. Fluidificazione e saccarificazione dell'amido sotto l'azione di amilase di varia origine. *Arch. Farmacol. Sper.*, 56:383-406, 1933.
42. ORESTANO, G. & ZUMMO, C. Fluidificazione e saccarificazione dell'amido da parte dell'amilasi dei semi di soja. *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.*, 5:246-249, 1930.
43. PETER, B. Enzymes of starch degradation and synthesis. In NORD, F.F. *Advances in enzymology*. New York, Interscience, 1951, v.12, p.380-428.
44. PIQUET, A. & FISCHER, E.H. Propriétés de la  $\beta$ -amylolytique 21. *Helv. Chim. Acta*, 35:257-262, 1952.
45. PRIBAM, E. Klassifikation der Schizomyten. Leipzig, Franz Deuticke, 1933.
46. RICHARDSON, T. Enzymes. In FENNEMA, O.R. *Principles of food science*. Part 1. New York, Marcel Dekker, 1976, p.285-435.
47. ROBYT, J. & FRENCH, D. Purification and action pattern of an amylase from *Bacillus polymyxa*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 104:338-345, 1964.

48. ROSE, D. The amylase of *Bacillus polymyxa*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 16:349-355, 1948.
49. SHINK, R.; KUNIMI, Y. & NISHIRA, H. Isolation and characterization of  $\beta$ -amylase producing microorganisms. *J. Ferment. Technol.*, 53(10):687-692, 1975.
50. \_\_\_\_\_. Production and some enzymatic properties of  $\beta$ -amylase of *pseudomonas* sp BQ6. *J. Ferment. Technol.*, 53(10):698-702, 1975.
51. \_\_\_\_\_. Production and some enzymatic properties of *Bacillus* sp BQ10. *J. Ferment. Technol.*, 53(10):693-697, 1975.
52. SOMOGY, M. A reagent for the copper-iodometric determination of very small amount of sugar. *J. Biol. Chem.*, 117:771-776, 1937.
53. STREET, J.P. & BAILEY, E.M. The carbohydrates and the enzymes of the soybean. *J. Industrial and Engineering Chemistry*, 7(10):853-858, 1915.
54. TAKASAKI, Y. Productions and utilizations of  $\beta$ -amylase and pullulanase from *Bacillus cereus* var. *mycoides*. *Agr. Biol. Chem.*, 40(8):1515-1522, 1976.
55. TAKASAKI, Y. Purifications and enzymatic properties of  $\beta$ -amylase and pullulanase from *Bacillus cereus* var. *mycoides*. *Agr. Biol. Chem.*, 40(8):1523-1530, 1976.
56. THOMA, J.A. *et al.* Influence of sulfhydryl groups on the activity of sweet potato  $\beta$ -amylase. *Biochemistry*, 4(4):714-722, 1965.
57. THOMA, J.A.; SPRADLIN, J.E. & DYGERT, S. Plant and animal amylases. In BOYER, P.D. The enzymes. New York Academic Press, 1971, p.115-191.

58. TILDEN, B.E. & HUDSON, C.S. Preparation and properties of the amylases produced by *Bacillus macenans* and *Bacillus polymyxa*. *J. Bacteriol.*, 43:527-544, 1942.
59. TIPPLES, K.H. & THACHUK, R. Wheat  $\beta$ -amylases. I . Isolation . *Cereal Chemistry*, 42(2):111-124, 1965.
60. \_\_\_\_\_ . Wheat  $\beta$ -amylases. II . Characterization. *Cere*  
*al Chemistry*, 43(2):62-79, 1966.
61. TREVELYAN, W.E.; PROCTER, D.P. & HARRISON, J.S. Detection of sugars in paper chromatograms. *Nature*, 166:444-445, 1950.
62. UNDERKOFER, L.A. Microbiological enzymes. In MILLER, B.M. & LITSKY, W. Industrial microbiology. New York, McGraw Hill, 1976, p.128-135.
63. VENTURA, M.M. Germinação de sementes. In VILLELA, G.; BACILA, M. & TASTALDI, M. Bioquímica. Rio de Janeiro, Guanabara, Koogma, 1966, p.778-785.
64. WHARTON, D.C. & McCARTY, R.E. Carbohydrates. Characterization of glycogen and amylopectin. In \_\_\_\_\_. Experiments and methods in biochemistry. New York, MacMillian, 1972 , p.192-205.
65. WHITAKER, J.R. The glycoside hydrolases. In \_\_\_\_\_. Prin  
ciples of enzymology for the food sciences. New York, Mar  
cel Dekker, 1972, p.433-467.
66. WINDHOLZ, M. ed. The Merck index: an encyclopedia of chemical and drugs, 9.ed. Rahway, Merck, 1976, p.81-82.
67. WOLF, J. & BAKER, A. The genus *Bacillus*: aids to the identif  
ication of its species. In GIBBS, B.M. & SHAPTON, D.A. I-  
dentification methods microbiologists. London, Academic  
Press, 1968, p.93-109.