

## PRODUÇÃO DE AMILASES POR UM ISOLADO DE RIZÓBIO NATIVO DA AMAZÔNIA CENTRAL

Danielle Braule Pinto RAMOS<sup>1</sup>; Arlem Nascimento de Oliveira<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Bolsista PIBIC/CNPq/INPA; <sup>2</sup>Orientador CPCA/INPA

### 1. Introdução

As amilases estão entre as mais importantes enzimas industriais, sendo de grande relevância na biotecnologia atual. Além de serem usadas como aditivos em detergentes, elas podem ser aplicadas nas indústrias de alimentos, fermentação, papel e têxtil. Com o advento de novas fronteiras biotecnológicas, o espectro de uso das amilases tem se expandido para muitas outras áreas, incluindo a clínica, farmacêutica, médica e químico-analítica (Pandey *et al.* 2000).

Entre os vários fatores que estimulam a produção de amilases, a composição do meio tem recebido atenção especial. As fontes de carbono, nitrogênio e minerais são constituintes essenciais ao crescimento e síntese de enzimas pelos microrganismos. Estudos têm mostrado que alterações nas concentrações desses variáveis nutricionais afetam em grande extensão a produção de amilases (Kiran *et al.* 2005; Saxena *et al.* 2007). A síntese de amilases é afetada, também, em grande extensão por diversos surfactantes, como Tween-80, SDS, Triton X-100, PEG (Arnesen *et al.* 1998; Ulger e Cirakoglu 2001; Rao e Satyanarayana 2003; Gupta *et al.* 2008), além de outros. Por variarem amplamente entre microrganismos, torna-se necessário conhecer as condições nutricionais e químicas ideais para a máxima produção enzimática das diferentes fontes microbianas.

Os meios de cultivo microbiano respondem entre 30 e 40% dos custos de produção das enzimas industriais (Joo *et al.* 2002). Por essa e outras razões, os processos que objetivem otimizá-los são de grande importância às indústrias, uma vez que permitem aumentar os rendimentos das enzimas e reduzir os custos de produção das mesmas.

Reverendo a literatura, nota-se que os estudos sobre as condições de produção de amilases por rizóbios são raros e insuficientes. Avaliando o efeito de diferentes fontes de carbono na síntese de amilases por essas bactérias, Oliveira *et al.* (2007) reportaram maltose, amido de milho (maizena<sup>®</sup>) e farinha de pupunha como os melhores substratos. Considerando o potencial biotecnológico e a escassez de informações sobre as condições de crescimento e produção de amilases extracelulares por rizóbios nativos da Amazônia Central, o objetivo do presente estudo foi determinar as condições ótimas de cultivo e produção de amilases por um isolado de rizóbio nativo da região.

### 2. Material e Métodos

O estudo foi realizado nas dependências do Laboratório de Genômica de Microrganismos de Interesse Agrossilvicultural, do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA.

O isolado INPA R-110 faz parte da "coleção" de rizóbio do próprio Laboratório de Microbiologia da CPCA/ INPA. Por ter exibido uma grande atividade amilolítica em meio sólido (Flor *et al.* 2008), essa bactéria foi selecionada para o presente estudo. Antes dos ensaios enzimáticos, o isolado foi mantido em meio YMA (Yeast Mannitol Agar) (Vincent 1970) a 4 °C.

O meio YM (Yeast Mannitol) (Vincent 1970) usado para o crescimento e produção de amilases pelo rizóbio consistiu em 0,2 g de MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O; 0,4 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,1 g de NaCl; 0,4 g de extrato de levedura e 10 g de manitol por litro. Antes da esterilização por autoclavagem (120 °C por 15 min.), ajustou-se o pH do meio para 6,8, usando uma solução de KOH (1%, p/v). Para os estudos iniciais de otimização do meio, o manitol foi substituído, nas mesmas concentrações, por diferentes fontes de carbono e nitrogênio.

Com auxílio de uma alça de platina, as colônias do R-110 foram assepticamente transferidas para frascos de Erlenmeyer, contendo 30 mL do meio YM. Os frascos foram incubados em agitador rotatório (75 rpm) a 25 °C por 72 h (Oliveira 2006). Após esse tempo, o número de unidades formadoras de colônia (UFC) em 1 mL do meio, estimado segundo o método de diluição em placas

constituiu o inóculo bacteriano. Para os estudos de produção enzimática, inoculou-se 1 mL da suspensão bacteriana, contendo  $7 \times 10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup> em 49 mL do meio YM, e os frascos foram incubados por 48 h, nas mesmas condições anteriormente descritas (Oliveira 2006).

Visando otimizar o meio de produção, foram avaliadas as seguintes fontes de carbono e nitrogênio. Fontes de carbono: maltose, sacarose, glicose, lactose, amido solúvel, amido de milho, galactose e arabinose. Por sua vez, as fontes de nitrogênio estudadas foram: caseína, gelatina, peptona, triptona, farinha de soja, uréia, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> e KNO<sub>3</sub>.

Para avaliar o crescimento microbiano e a produção de amilases, amostras do meio foram centrifugadas a 10.000 rpm por 10 min. A massa celular foi resuspendida em tampão fosfato 0,1 M, pH 6,5 e a absorbância determinada a 540nm. O sobrenadante claro, por sua vez, foi usado como extrato enzimático bruto (Oliveira 2006). A concentração de proteína extracelular total de 1 mL de extrato bruto foi determinada pelo método do biureto (Gornall *et al.* 1949), usando albumina de soro bovino (BSA) na elaboração da curva padrão.

A atividade amilolítica foi determinada com base no método DNS (Mamo e Gessesse 1997), usando amido solúvel como substrato. O volume final da mistura de reação foi de 1 mL, contendo 0,3 mL de extrato enzimático bruto e 0,7 mL de solução de amido solúvel (1%, p/v) preparada em tampão fosfato (0,1 M, pH 6,5). Para a reação enzimática, a mistura foi incubada a 37 °C por 15 min. Após a incubação, a reação foi interrompida com 1 mL de DNS (1%, p/v), e os tubos contendo as amostras foram aquecidos por 5 min. em banho fervente e resfriados em temperatura ambiente. Após a adição de 8 mL de água destilada, os açúcares redutores liberados do substrato foram quantificados colorimetricamente a 540 nm, a partir de uma curva padrão elaborada com glicose. O branco foi preparado da mesma maneira, porém, com o tampão fosfato substituindo o extrato enzimático na mistura de reação. A atividade de uma unidade de enzima (U) foi definida como a quantidade de extrato bruto necessária para liberar 1 μM de glicose em 1 minuto, nas condições experimentais acima descritas.

Todos os experimentos foram conduzidos em triplicata e as médias de três repetições, com seus respectivos desvios-padrão foram obtidos com auxílio do programa SigmaPlot 11.0.

### 3. Resultados e discussão

O efeito de várias fontes de carbono (10 g.L<sup>-1</sup>) sobre o crescimento e produção de amilases pelo isolado INPA R-110 foi estudado. Entre as fontes testadas, galactose, arabinose, lactose e maltose foram as que mais estimulam o crescimento microbiano e produção de amilases (Tabela 1). Por outro lado, amido de milho (maizena®) e sacarose pouco favoreceram a síntese de enzimas. Esses resultados são similares aos registrados por outros autores, que reportaram lactose (Sudharhsan *et al.* 2007), galactose (Thippeswami *et al.* 2006) e maltose (Qader *et al.* 2006) como as melhores fontes de carbono para a síntese de amilases por *Bacillus* spp. Entretanto, aumento na produção de amilases também foi reportado na presença de amido solúvel e sacarose, indicando que a melhor fonte de carbono para a produção de enzimas varia de acordo com o microrganismo.

Tabela 1 - Crescimento e atividade de amilases do isolado INPA R-110, cultivado em meio acrescido individualmente de várias fontes de carbono, mantido por 48h a 25°C.

Fontes de carbono	D.O <sub>540nm</sub>	Atividade específica (U.mg de proteína <sup>-1</sup> )
Amido de milho	0,31 ± 0,06	2,4±0,4
Amido solúvel	0,15 ± 0,01	28,0±3,2
Arabinose	0,98 ± 0,07	363,0±19,0
Lactose	1,38 ± 0,17	333,0±27
Galactose	0,82 ± 0,07	473,4±18,4
Glicose	0,66 ± 0,02	77,5±13,3
Maltose	1,27 ± 0,09	262,0±17,0
Sacarose	0,62 ± 0,08	13,0±2,7

Os valores são as médias de dois experimentos individuais, com três repetições por tratamento.

A Tabela 2 mostra a influência de diferentes fontes orgânicas e inorgânicas de nitrogênio sobre o crescimento a produção de amilases pelo isolado de rizóbio. Vários autores têm reportado os componentes orgânicos de nitrogênio como os melhores para a produção de amilases (Qader *et al.* 2006). Neste estudo, a maior produção de amilases foi registrada na presença de KNO<sub>3</sub>,

confirmando o trabalho de Thippeswami *et al.* (2006), que também relataram essa fonte inorgânica como a melhor para síntese de amilases por *Bacillus* sp. Entre as fontes orgânicas de nitrogênio, o extrato de soja foi o que proporcionou o maior crescimento e produção de enzimas. De acordo com Dharani Aiyer (2004), a natureza e a concentração das fontes de nitrogênio são de grande importância na síntese de amilases. No meio de crescimento, o baixo nível de nitrogênio é inadequado para a produção de enzimas e o excesso é igualmente detrimental, causando inibição da enzima. No presente estudo, a concentração usada foi de 0,4 g.L<sup>-1</sup>, nível considerado baixo quando comparada com outros trabalhos (Qader *et al.* 2006).

Tabela 2 - Crescimento e atividade de amilases do isolado INPA R-110, cultivado em meio acrescido individualmente de várias fontes de nitrogênio, mantido por 48h a 25°C.

Fontes de nitrogênio	D.O <sub>540nm</sub>	Atividade específica (U.mg de proteína <sup>-1</sup> )
Extrato de soja	1,03 ± 0,05	16,4±0,5
Caseína	0,4 ± 0,01	6,2±0,6
Gelatina	0,45 ± 0,02	0,5±0,0
Peptona	0,47 ± 0,04	0,9±0,01
Triptona	0,83 ± 0,06	1,4±0,2
KNO <sub>3</sub>	0,56 ± 0,02	23,0±2,1
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,22 ± 0,01	3,0±1,4
Uréia	0,25±0,01	0,0±0,0

Os valores são as médias de pelos dois experimentos individuais, com três repetições por tratamento.

#### 4. Conclusão

Galactose e extrato de soja, nas concentrações de 1% (473,4 U ± 18,4) e 0,08% (22,5 U ± 3,4), foram considerados os substratos de carbono e nitrogênio ideais para a produção de amilases pelo INPA R-110.

#### 5. Referências Bibliográficas

- Arnesen, S.; Eriksen, S.H.; Olsen, J.; Jensen, B. 1998. Increased production of alpha-amylase from *Thermomyces lanuginosus* by the addition of Tween 80. *Enzyme Microb. Technol.*, 23:249-252.
- Dharani, Aiyer, P.V. 2004. Effect of C:N ratio on alpha amylase production by *Bacillus licheniformis* SPT 27. *Afr. J. Biotechnol.*, 3:519-522.
- Flor, N.S.; Oliveira, A.N.; Oliveira, L.A. 2008. Atividades amilolíticas e proteolíticas de rizóbios nativos da Amazônia Central. In: Anais da XVI Jornada de Iniciação Científica do PIBIC/INPA, Manaus, AM, p.474-475.
- Gornall, A.G.; Bardawill, C.J; David, M.M. 1949. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. Biol. Chem.*, 177:751-66.
- Gupta, A.; Gupta, V.K.; Modi, D.R.; Yadava, L.P. 2008. Production and Characterization of alpha Amylase from *Aspergillus niger*. *Biotechnology*, 7:551-556.
- Joo, H.S, Kuma, C.G.; Park, C.G, Paik, S.R.; Chang, C.S. 2002. Optimization of the production of an extracellular alkaline protease from *Bacillus horikoshii*. *Process Biochem.* 38:155-159.
- Kiran, O.; Comlekcioglu.; Akiran, B. 2005. Effects of carbon sources and various chemicals on the production of a novel amylase from a thermophilic *Bacillus* sp. K-12. *Turk. J. Biol.*, 29:99-103.
- Mamo, G.; Gessesse, A. 1997. Thermostable amylase production by immobilized thermophilic *Bacillus* sp. *Biotechnol. Techniques*, 11:447-450.
- Oliveira, A.N. 2006. *Caracterização de amilases e proteases em isolados de rizóbio nativos da Amazônia Central, AM, Brasil*. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas, 160pp.

- Oliveira, A.N.; Oliveira, L.A.; Andrade, J.S.; Chagas Júnior, A.F. 2007. Rhizobia amylase production using various starchy substances as carbon substrates. *Braz. J. Microbiol.*, 38:208-216.
- Pandey, A.; Nigam, P.; Soccol, C. R.; Soccol, V. T.; Singh, D.; Mohanohanohanohan, R. 2000. Advances in microbial amylases. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 31:135-152.
- Qader, A.A.U.; Bano, S.; Aman, A.; Syed, N.; Azhar, A. 2006. Enhanced Production and Extracellular Activity of Commercially Important Amylolytic Enzyme by a Newly Isolated Strain of *Bacillus* sp. AS-1. *Turk. J. Biochem.*, 31: 137-142.
- Sudharhsan, S.; Senthilkumar, S.; Karunasena, R. 2007. Physical and nutritional factors affecting the production of amylase from species of bacillus isolated from spoiled food waste. *Afr. J. Biotechnol.*, 6: 430-435.
- Rao, J.L.U.M.; Satyanarayana, T. 2003. Enhanced secretion and low temperature stabilization of a hyperthermostable and Ca<sup>2+</sup>-independent alpha-amylase of *Geobacillus thermoleovorans* by surfactants. *Let. Appl. Microb.*, 36: 191-196.
- Saxena, R.K.; Dutt, K.; Agarwal, L.; Neyyar, P. 2007. A highly thermostable and alkaline amylase from a *Bacillus* sp. PN5. *Biores. Technol.*, 98: 260-265.
- Thippeswami, S.; Girogowda, K.; Mulimani, H. 2006. Isolation and identification of alpha amylase producing *Bacillus* sp. from dhal industry waste. *Indian J. Biochem, Biophys.*, 43: 295-298.
- Ulger, C.; Cirakoglu, C. 2001.  $\alpha$ -Amylase production in aqueous two-phase systems with *Bacillus amyloliquefaciens*. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 17: 553-555
- Vincent, J.M. 1970. *A manual for the practical study of root-nodules bacteria*. Blackwell Science Publication, Oxford, UK. 164pp.