

# INFLUÊNCIA DE FATORES FÍSICOS SOBRE A PRODUÇÃO DE AMILASES POR UM RIZÓBIO NATIVO DA AMAZÔNIA CENTRAL

Catriana Figueiredo de SOUZA<sup>1</sup>; Arlem Nascimento de OLIVEIRA<sup>2</sup>; Luiz Antonio de OLIVEIRA<sup>3</sup>  
<sup>1</sup>Bolsista PIBIC/CNPq/INPA; <sup>2</sup>Orientadora CPCA /INPA; <sup>3</sup>Colaborador 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).

Vários estudos têm mostrado que o crescimento e a produção de enzimas são significativamente influenciadas pela temperatura (Sudharhsan *et al.*, 2007; Sexena *et al.*, 2007), pH (Sudharhsan *et al.*, 2007), aeração (Rahman *et al.*, 2005), concentração e idade do inóculo (Elibol e Moreira, 2005), etc. Como essas condições variam amplamente entre microrganismos, torna-se necessário conhecer as condições ambientais ideais à máxima produção enzimática das diferentes fontes microbianas.

Segundo Joo *et al.* (2002), os meios de cultivo microbiano respondem entre 30 e 40% dos custos de produção das enzimas industriais. Por essa e outras razões, os processos que visem 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 físicas de produção de amilases por rizóbios são inexistentes. Nesse sentido, o presente estudo teve como objetivo determinar as condições ótimas de cultivo e produção de amilases por um isolado de rizóbio nativo da Amazônia Central.

## 2. Material e Métodos

*Isolados de Rizóbio* - O isolado INPA R-110 faz parte da "coleção" de rizóbio do Laboratório de Microbiologia da Coordenação de Pesquisas em Ciências Agrônômicas do INPA. Por ter apresentado a maior atividade amilolítica em meio solidificado (Flor *et al.*, 2008), essa bactéria foi selecionada para o presente estudo. Antes dos ensaios enzimáticos, o isolado foi mantido em meio YMA - extrato de levedura, manitol e ágar (Vincent, 1970) a 4 °C.

*Preparação do inóculo de rizóbio* - Com auxílio de uma alça de platina, as colônias do INPA R-110 foram assepticamente transferidas para frascos de Erlenmeyer, contendo 50 mL do meio YM (Vincent, 1970). Os frascos foram incubados em agitador rotatório (100 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.

*Produção de amilases* - A composição do meio de produção consistiu, em g.L<sup>-1</sup>: 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 maltose (Oliveira, 2006). Antes da esterilização por autoclavagem a 120 °C por 15 min., ajustou-se o pH do meio para 6,8, usando uma solução de KOH (1%, p/v). Depois, inoculou-se 1 mL de suspensão bacteriana em 49 mL do meio (2%, v/v), e então, os frascos foram incubados em agitador rotatório (100 rpm) a 25 °C por 48 h.

*Crescimento microbiano, extrato enzimático bruto e proteína extracelular total* - Para avaliar o crescimento microbiano e a produção de amilases, amostras do meio foram centrifugadas a 12.000 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.

*Otimização das condições físicas de cultivo* - Os fatores físicos a serem estudados, foram: 1 - pH inicial: A fim de investigar esse fator ambiental sobre a produção enzimática, o pH dos meios foi ajustado para 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0; 8,5 e 9,0, antes da esterilização. 2 - Concentração

do inoculo: Esse estudo foi feito em condições ótimas de pH, variando, no entanto, o tamanho dos inoculos (1, 2, 4, 6, 8 e 10%, v/v).

**Atividade enzimática** - 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 min., nas condições experimentais acima descritas.

**Análise estatística** - Todos os experimentos foram conduzidos em triplicata e as médias de três repetições, com seus respectivos desvios-padrão foram plotadas em gráficos, com auxílio do programa GraphPad Prism Trial version 5.0. A análise de correlação foi realizada, usando o Statistica Trial Version 9.0.

### 3. Resultados e Discussão

**Influência do pH inicial do meio de cultivo sobre a produção de amilases** - O pH do meio de cultivo é um dos fatores físicos mais importantes para o crescimento microbiano e suas atividades metabólicas (Shaheen *et al.*, 2008). No presente estudo, o pH na variação de 5,0 a 9,0 afetou significativamente a produção de amilases (Figura 1), mostrando que o extrato enzimático do INPA R-111 é muito sensível às mudanças no pH do meio. De acordo com a Figura 1, a produção de enzimas foi aumentando gradualmente até o pH 8,5, no qual foi observado a maior produção de amilases ( $244 \pm 27$  U.mg de proteína<sup>-1</sup>). Similarmente, Carvalho *et al.* (2008) observaram a maior produção de amilases por *Bacillus* sp. SMIA-2 em pH 8,5. Em pH 8,5, também foi observado o maior crescimento bacteriano ( $D.O_{540nm} = 1,15$ ; Figura 1), revelando uma relação significativa entre o crescimento microbiano e a produção de amilases ( $R = 0,72$ ,  $P = 0,0105$ ,  $N = 27$ ). Asgher *et al.* (2007) reportaram, também, esse tipo de relação para amilases de *Bacillus* spp. Em pH 5,0 e 9,0, as atividades foram, respectivamente, 14 ( $34 \pm 2$  U.mg de proteína<sup>-1</sup>) e 26% ( $60 \pm 2$  U.mg de proteína<sup>-1</sup>) menores com relação ao pH ótimo de produção (Figura 1).

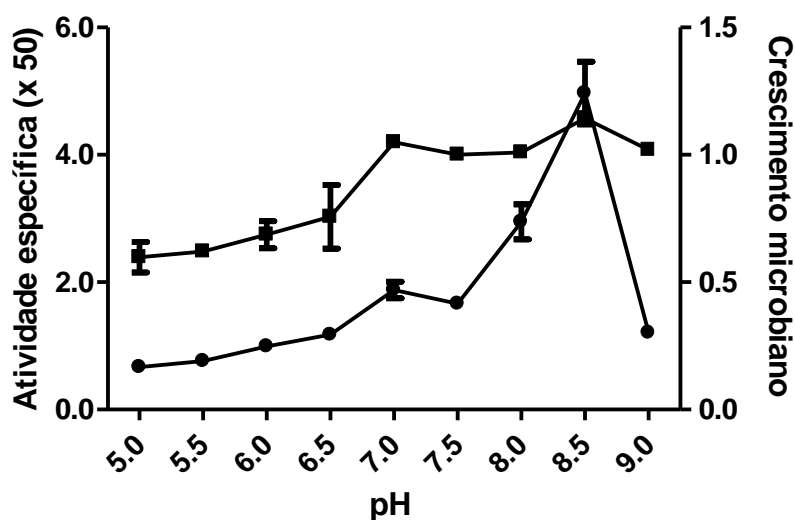


Figura 1 - Influência do pH inicial sobre o crescimento (■) e produção de amilases (●) pelo isolado INPA R-110, em meio líquido.

*Influência da concentração de inóculo sobre o crescimento e produção de amilases* - A concentração de inóculo tem efeito marcante sobre o crescimento e biossíntese de amilases bacterianas (Allan *et al.*, 1996). Neste estudo, a concentração de inóculo na variação de 1 a 10% ( $3,5$  a  $35 \times 10^8$  UFC) foi avaliada para a produção de amilases (Figura 2). Entre as concentrações testadas, as maiores atividades enzimáticas foram obtidas nos níveis de 2 ( $244 \pm 27$  U.mg de proteína<sup>-1</sup>) e 4% ( $274 \pm 26$  U.mg de proteína<sup>-1</sup>). Esses resultados concordam com Riaz *et al.* (2003) e Haq *et al.* (2005), os quais reportaram o nível de 4% como ótimo para a produção de amilases por diferentes estirpes de *Bacillus subtilis*. Por outro lado, nas concentrações de 1 ( $95 \pm 10$  U.mg de proteína<sup>-1</sup>), 8 ( $80 \pm 15$  U.mg de proteína<sup>-1</sup>) e 10% ( $8 \pm 26$  U.mg de proteína<sup>-1</sup>), foram observadas as menores atividades específicas das enzimas (Figura 2). Para as concentrações de 8 e 10%, os resultados podem ser explicados pelo maior crescimento bacteriano nos maiores níveis de inóculo. Nesse caso, os nutrientes presentes no meio podem ter sido insuficientes para manter o crescimento da bactéria, causando redução na produção de enzimas. No nível de 1%, devido ao menor número de células no meio ( $D.O_{540nm} = 0,81$ ; Figura 2), o tempo para o microrganismo entrar na fase estacionária pode se tornar mais longo, o que resultaria em uma menor produção enzimática.

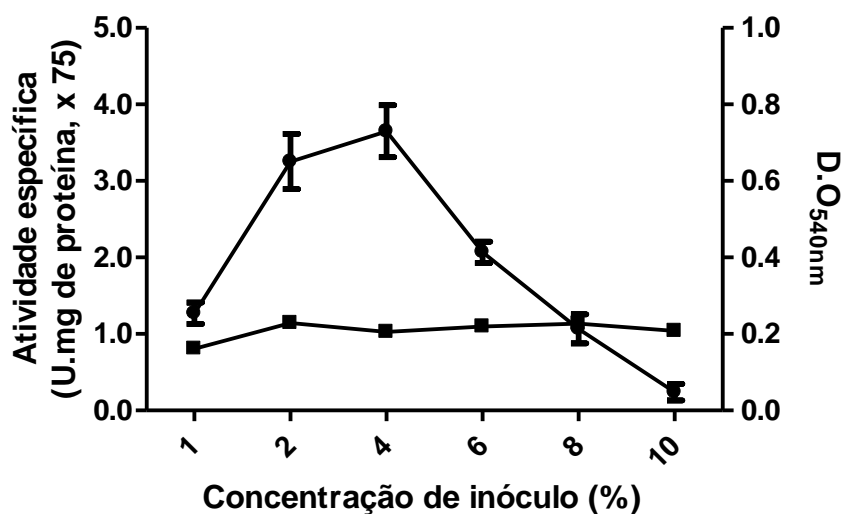


Figura 2 – Influência da concentração de inóculo sobre o crescimento (■) e produção de amilases (●) pelo isolado INPA R-110, em meio líquido.

#### 4. Conclusão

A maior produção de amilases foi observada em pH 8,5 e concentração de inóculo de 4%.

#### 5. Referências

- Allan, S.; Henrik, B.F.; Torbenedel, B. 1996. A method of designing alpha mutants, with predetermined properties alpha amylase variants and detergents containing the variants. *Process Biochem.*, 31: 110-210.
- Asgher, M.; Asad, M.J.; Rahman, S.U.; Legge, R.L. 2007. A thermostable  $\alpha$ -amylase from a moderately thermophilic *Bacillus subtilis* strain for starch processing. *J. Food Eng.*, 79: 950-955.
- Carvalho, R.V.; Côrrea, T.R.L.; Silva, J.C.M.; Oliveira, L.R.C.; Martins, M.L.L. 2008. Properties of an amylase from thermophilic *Bacillus* sp. *Braz. J. Microbiol.*, 39: 102-107.
- 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.

- Haq, I.U.; Shamim, N.; Ashraf, H.; Ali, S.; Qadeer, M.A. 2005. Effect of surfactants on the biosynthesis of alpha amylase by *Bacillus subtilis* GCBM-25. *Pak. J. Bot.*, 37 : 373-379.
- 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.
- 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.
- 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.
- Riaz, N.; Haq, I.U.; Qadeer, M.A. 2003. Characterization of  $\alpha$ -Amylase by *Bacillus subtilis*. *Int. J. Agri. Biol.*, 5: 249-252.
- Sexena, 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.
- Shaheen, M.; Shah, A.; Hameed, A.; Hasan, F. Influence of culture conditions on production and activity of protease from *Bacillus subtilis* BS1. *Pak. J. Bot.*, 40: 5(2008): 2161-2169.
- Sudharhsan, S.; Senthilkumar, S.; Ranjith, K. 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.
- Vincent, J.M. 1970. *A manual for the practical study of root-nodules bacteria*. Oxford, UK: Blackwell Science Publication. 164pp.