

PRODUÇÃO DE PROTEASES POR UM ISOLADO DE RIZÓBIO NATIVO DA AMAZÔNIA CENTRAL.

Juliete de Souza FIGUEIREDO¹; Arlem Nascimento de OLIVEIRA²; Luiz Antonio de OLIVEIRA³
¹Bolsista PIBIC/Fapeam/INPA; ²Orientadora CPCA /INPA; ³Colaborador CPCA/INPA

1. Introdução

As enzimas hidrolíticas são as mais utilizadas nos processos industriais, sendo aplicadas na degradação de várias substâncias naturais. De forma geral, elas são usadas em grande escala nas indústrias têxteis, de detergentes, alimentícia, de papel, e de couro (Kirk *et al.* 2002). Devido à sua vasta aplicação nesses setores industriais, assim como no campo farmacêutico (Rao *et al.* 1998), as proteases formam o grupo mais estudado das hidrolases.

Entre os fatores que estimulam a síntese de proteases, as condições de crescimento microbiano têm recebido atenção especial (Elibol e Moreira, 2005; Gupta e Khare 2007). Os processos metabólicos microbianos são significativamente influenciados por diversos fatores nutricionais e químicos, incluindo fontes de carbono e nitrogênio (Shafee *et al.* 2005; Laxman *et al.* 2005; Shaheen *et al.* 2008), aminoácidos (Shafee *et al.* 2005; Mehta *et al.* 2006), minerais (Mehta *et al.* 2006) e surfactantes (Ulger e Cirakoglu, 2001; Gupta *et al.* 2008), etc. Por variarem amplamente entre microrganismos, torna-se necessário conhecer as condições de cultivo ideais para a máxima produção enzimática das diferentes fontes microbianas.

Reverendo a literatura, nota-se a carência de informações referentes às condições de produção de proteases por rizóbios. Considerando o potencial biotecnológico dos rizóbios nativos da região e a escassez de trabalhos sobre as condições de crescimento e produção de proteases por essas bactérias, é que se propõe o presente estudo.

2. Material e Métodos

Isolado Bacteriano - O isolado INPA R-732 faz parte da "coleção" de rizóbio do próprio Laboratório de Microbiologia da Coordenação de Pesquisas em Ciências Agrônômicas do INPA. Por ter exibido uma grande atividade proteolítica 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, Manitol e Agar, (Vincent 1970).

Meio de crescimento e produção de proteases - O meio YM (Yeast Manitol, Vincent 1970) utilizado para o crescimento e produção de proteases consistiu, em g.L⁻¹: 0,2 g de MgSO₄. 7H₂O; 0,4 g de K₂HPO₄; 0,1 g de NaCl; 0,4 g de extrato de levedura e 10 g de manitol. Antes da esterilização por autoclavagem (120 °C por 15 min.), o pH do meio foi ajustado para 6,8, usando uma solução de KOH (1%, p/v). Para os estudos iniciais de otimização do meio, o manitol e o extrato de levedura foram substituídos, nas mesmas concentrações, por diferentes fontes de carbono e nitrogênio.

Preparação do inóculo de rizóbio

Com auxílio de uma alça de platina, as colônias do isolado R-732 foram asepticamente transferidas para frascos de Erlenmeyer, contendo 50 mL do meio YM. Os frascos foram incubados em agitador rotatório (100 rpm) a 25 °C por 24 h (Oliveira, 2006). Após esse tempo, o número de unidades formadoras de colônia (UFC) em 1 mL do meio foi estimado segundo o método de diluição em placas constituindo o inóculo bacteriano. Para os estudos de produção enzimática, foi transferido 1 mL da suspensão bacteriana em 49 mL do meio YM, e o meio foi mantido por 48 h, nas mesmas condições anteriormente descritas (Figueiredo *et al.* 2009).

Otimização das condições de cultivo

Os fatores nutricionais avaliados foram:

Fontes de carbono: maltose, sacarose, glicose, lactose, amido solúvel, amido de milho, galactose e arabinose D(+);

Fontes de nitrogênio: caseína, gelatina, peptona, triptona, farinha de soja, uréia, (NH₄)₂ SO₄ e KNO₃;

Após a determinação das melhores fontes de carbono e nitrogênio, foram realizados outros experimentos visando definir as concentrações ideais de carbono (0,0-2,5%).

Crescimento microbiano, extrato enzimático bruto e proteína extracelular total - Para avaliar o crescimento microbiano e a produção de proteases, amostras do meio foram centrifugadas a 10.000 rpm por 5 min. A massa celular foi ressuspensa em tampão fosfato 0,1 M, pH 6,5 e a absorbância determinada a 540nm. O sobrenadante, 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.

Atividade enzimática - A atividade proteolítica foi determinada misturando-se 0,5 mL de azocaseína (0,5%), previamente preparada em tampão Tris-HCl (0,1 M, pH 8,0) com 0,5 mL da solução de enzima por 10 min. a 40 °C (modificado de Olajuyigbe e Ajele 2005). Ao final desse período, a reação foi paralisada adicionando-se 0,5 mL de ácido tricloroacético (15%, p/v). Após repouso de 15 min., a mistura foi centrifugada por 5 min. a 10.000 rpm. O ensaio proteolítico foi realizado em um volume final de 2 mL, contendo 1 mL da mistura enzimática e 1 mL de NaOH (1M). Uma unidade de enzima (U) foi definida como a quantidade de extrato enzimático bruto que produz um aumento de 0,01 na absorbância ($A_{440\text{ nm}}$) por min. O branco foi preparado da mesma maneira, porém, com o meio não inoculado substituindo o extrato enzimático na mistura de reação.

3. Resultados e Discussão

Fontes de carbono - Os resultados mostraram efeitos diferenciados das fontes de carbono e nitrogênio sobre a produção de enzimas. O meio de cultura contendo amido solúvel produziu 4621,2 U/mg de proteína⁻¹, mostrando-se como a melhor fonte de carbono para a síntese de proteases pelo isolado. Nadeem *et al.* (2008) também reportaram o amido solúvel como melhor fonte de carbono para a produção de proteases pelo *Bacillus licheniformis* N-2. Por outro lado, o meio com lactose apresentou a menor atividade enzimática, sendo inviável sua utilização como substrato de carbono para a produção de proteases pela bactéria estudada (Tabela 1).

Tabela 1 - Efeito de diferentes fontes de carbono sobre a produção de proteases extracelulares pelo isolado INPA R-732, mantido em meio líquido por 48 h a 25 °C.

Fonte de Carbono	D.O _{540nm}	Atividade Enzimática U / mg
Amido de Milho	0,327 ± 0,037	932,5 ± 0,005 b
Amido Solúvel	0,370 ± 0,054	4621,2 ± 0,085 a
Arabinose	0,304 ± 0,040	216,1 ± 0,003 c
Galactose	0,261 ± 0,050	34,1 ± 0,024 d
Glicose	0,550 ± 0,062	17,7 ± 0,013 e
Lactose	0,550 ± 0,071	2,9 ± 0,004 f
Maltose	0,580 ± 0,028	59,9 ± 0,003 d
Sacarose	0,312 ± 0,080	0,0 f

Fontes de nitrogênio - Dentre as fontes de nitrogênio avaliadas, a peptona foi a que proporcionou a maior produção de enzimas (39,0 U/mg) pelo isolado bacteriano. Os meios contendo caseína (31,7 U/mg) e (NH₄)₂SO₄ (30,4 U/mg) também exerceram efeito considerável na produção de proteases (Tabela 2). A natureza e a concentração das fontes de nitrogênio são de grande importância na síntese de proteases. 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 (Elibol e Moreira, 2005). No presente estudo, a concentração utilizada foi de 0,4 g. L⁻¹, nível considerado baixo quando comparado com outros trabalhos (Qader *et al.*, 2006).

Tabela 2 - Efeito de diferentes fontes de nitrogênio sobre a produção de proteases extracelulares pelo isolado INPA R-732, mantido em meio líquido por 48 h a 25 °C.

Fonte de Nitrogênio	D.O _{540nm}	Atividade Enzimática U / mg
KNO ₃	0,310 ± 0,018	26,1 ± 0,009 ab
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,328 ± 0,033	30,4 ± 0,002 a
Caseína	0,352 ± 0,053	31,7 ± 0,006 a
Farinha de Soja	0,338 ± 0,051	0,2 ± 0,002 c
Gelatina	0,471 ± 0,086	13,5 ± 0,008 b
Peptona	0,359 ± 0,020	39,0 ± 0,010 a
Triptona	0,431 ± 0,087	0,5 ± 0,005 c
Uréia	0,270 ± 0,029	23,9 ± 0,005 ab

4. Conclusão

A maior produção de proteases pelo isolado INPA R-732 foi observada em meio contendo amido solúvel e peptona.

5. Referências

- Elibol, M.; Moreira, A.R. 2005. Optimizing some factors affecting alkaline protease production by a marine bacterium *Teredinobacter turnirae* under solid substrate fermentation. *Process Biochem.*, 1951-1956.
- Figueiredo, J.S.; Oliveira, A.N.; Oliveira, L.A. 2009. Caracterização parcial da protease bruta produzida por um rizóbio nativo da Amazônia Central. *In: Anais da XVII Jornada de Iniciação Científica do PIBIC/INPA, Manaus, AM.*
- 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.*, 751-66.
- Gupta, A.; Khare, S.K. 2007. Enhanced production and characterization of solvent stable protease from solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* PseA. *Enzyme Microbial. Technol.*, 11-16.
- Gupta, A.; Gupta, V.K.; Modi, D.R.; Yadava, L.P. 2008. Production and Characterization of alpha Amylase from *Aspergillus niger*. *Biotechnology*, 551-556.
- Laxman, R.S.; Sonawane, A.P.; More, S.V.; Rao, B.S.; Rele, M.V.; Jogdand, V.V.; Deshpande, V.V.; Rao, M.B. 2005. Optimization and scale up of production of alkaline protease from *Conidiobolus coronatus*. *Process Biochem.*, 3152-3158.
- Kirk, O.; Borchert, T.V.; Fuglsang, C.C. 2002. Industrial enzyme applications. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 345-351.
- Mehta, V.J.; Thumar, J.T.; Singh, S.P. 2006. Production of alkaline protease from an alkaliphilic actinomycete. *Bioresour. Technol.*, 1650-1654.
- Olajuyigbe, F.; Ajele, J. 2005. Production dynamics of extracellular protease from *Bacillus* species. *Afr. J. Biotechnol.*, 776-779.
- 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.
- Rao, M.B.; Tanksale, A.M.; Ghatge, M.S.; Deshpande, V.V. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 597-635.

Shafee, N.; Aris, S.N.; Rahman, R.N.Z.A.; Basri, M.; Salleh, A.B. 2005. Optimization of Environmental and Nutritional Conditions for the Production of Alkaline Protease by a Newly Isolated Bacterium *Bacillus cereus* Strain 146. *J. Appl. Sci. Res.*,1-8.

Shaheen, M.; Shah, A.A.; Hameed, A.; Hasan, F. 2008. Influence of culture conditions on production and activity of protease from *Bacillus subtilis* BS1. *Pak. J. Bot.*, 2161-2169.

Ulger, C.; Cirakoglu, C. 2001. α -Amylase production in aqueous two-phase systems with *Bacillus amyloliquefaciens*. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 553-555.

Vincent, J.M. 1970. *A manual for the practical study of root-nodules bacteria*. Blackwell Science Publication. Oxford, UK:. 164pp.