

## PROPRIEDADES DA PROTEASE BRUTA DE UM ISOLADO DE RIZÓBIO DA AMAZONIA CENTRAL.

Juliete de Souza FIGUEIREDO<sup>1</sup>; Arlem Nascimento de OLIVEIRA<sup>2</sup>; Luis Antonio de OLIVEIRA<sup>3</sup>.

<sup>1</sup>Bolsista PIBIC/FAPEAM/INPA; <sup>2</sup>Orientador CPCA/ INPA; <sup>3</sup>Co-orientador CPCA/ INPA.

### 1. Introdução

Programas visando selecionar novas fontes microbianas para a produção de enzimas estão crescendo no mundo todo (Stamford *et al.*, 2001). O complexo nitrogenase presente nas bactérias genericamente conhecidas como rizóbio é chave na fixação biológica do nitrogênio (FBN) pelas leguminosas e, portanto, o mais bem estudado na área agrônômica. Porém, não se deve negligenciar o potencial dessas bactérias em produzir outras enzimas de reconhecido valor biotecnológico (Oliveira, 2006; Oliveira *et al.* 2006 a,b), como é o caso das proteases (Van Beilen e Li, 2002; Maurer, 2004). As proteases formam o grupo dominante das hidrolases, por causa de seu extensivo uso nas indústrias de alimentos e detergentes (Inhs *et al.*, 1999; Gupta *et al.*, 2002; Maurer, 2004). Na indústria farmacêutica, elas são usadas em pomadas cicatrizantes e tem um uso potencial para outros medicamentos. Proteases hidrolisam as proteínas em peptídeos e aminoácidos, facilitando a sua absorção pelas células; devido seu papel despolimerizante, elas desempenham uma importante função na nutrição (Gupta *et al.*, 2002; Cherry e Fidantsef, 2003). Considerando o potencial biotecnológico da microbiota regional e a escassez de estudos que aborde a produção e caracterização de proteases extracelulares por isolados nativos de rizóbio (Oliveira, 2006; Oliveira *et al.*, 2006a,b), é que se propôs 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. Antes dos ensaios enzimáticos, o isolado foi mantido em meio YMA (Vincent, 1970) a 4 °C.

*Meio de crescimento e produção de proteases* - O meio básico [YM, (Vincent, 1970)] para o cultivo bacteriano consistiu, em g.L-1: 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, pH 6,8. Para a produção de protease, foi usado o meio YM modificado (Oliveira, 2006), onde o manitol foi substituído por gelatina, o NaCl foi substituído por 0,2g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e não foi utilizado extrato de levedura..

*Preparação do inóculo e crescimento celular*- O inóculo foi preparado em frascos de Erlenmeyer, contendo 50 mL do meio YM, previamente esterilizado (120 °C, 15 min.). Com auxílio de uma alça de platina, as colônias bacterianas foram assepticamente transferidas para os frascos. Depois, eles foram incubados em um agitador rotatório (100 rpm) a 26 °C por três dias (Oliveira, 2006). Um microlitro de cada inóculo foi adicionado aos 49 mL do meio YM modificado e incubado nas mesmas condições acima descritas, por um período máximo de cinco dias. Antes dos ensaios enzimáticos, as células foram colhidas por centrifugação e o sobrenadante claro usado como enzima bruta. Para avaliar o crescimento microbiano, as células colhidas foram ressuspensas em tampão fosfato 0,1 M, pH 6,5 e a absorbância determinada a 440 nm.

*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 7,0) com 0,5 mL da solução de enzima por 10 min. a 37 °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 alguns minutos, 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 (440<sub>nm</sub>) por minuto. O branco foi preparado da mesma maneira, porém, com o meio não inoculado substituindo o extrato enzimático na mistura da reação.

**Caracterização enzimática** - A influência do pH foi estudado utilizando diferentes soluções de azocaseína com pH entre 5 e 10, A estabilidade foi estimada nos mesmos valores de pH, porém por um período de 24 h (modificado de Yang *et al.*, 2000). A temperatura ótima foi avaliada entre 25 a 50 °C. A termoestabilidade foi mensurada nos mesmos valores, porém por um período de 2 h (Yang *et al.*, 2000). Os efeitos de íons catiônicos na atividade proteolítica foram investigados, incubando o extrato enzimático em soluções contendo 1 e 5 mM de  $K^+$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Na^+$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $NH_4^+$ ,  $Mg^{2+}$  e  $Zn^{2+}$  (Oliveira, 2006). A atividade foi determinada em condições ótimas de pH e temperatura. Na ausência dos íons, a atividade da enzima foi considerada como 100%.

### 3. Resultados e discussão

**Crescimento microbiano e atividade proteolítica no extrato enzimático** - O isolado INPA R-732 atingiu o máximo crescimento em 48 h de incubação, exibindo uma densidade óptica (D.O 440nm) de 1,3. Resultados semelhantes foram reportados por Oliveira *et al.* (2006) que verificaram máxima D.O a partir do 2º dia de crescimento para diferentes isolados de rizóbio. A maior atividade proteolítica (17 U) também foi registrada em 48 h de incubação, coincidindo com o final da fase exponencial de crescimento microbiano. Comparativamente, a atividade proteolítica desse isolado foi inferior a observada para o INPA R-991, que nas mesmas condições experimentais produziu 50 U (Oliveira, 2006)

**Influência do pH e temperatura sobre a atividade enzimática**- A atividade proteolítica no extrato enzimático foi crescente até o pH 8,0 (Figura 1), no qual atingiu seu máximo valor (22 U). Por outro lado, a menor atividade foi registrada em pH 10 (7 U). Resultados semelhantes foram reportados por Sookkhero *et al.* (2000) que observaram valores de pH ótimo de 7,0; 7,5 e 8,5 para três proteases de *Bacillus stearothermophilus* TLS33. Na faixa de pH 6,0-8,0, o extrato enzimático mostrou-se relativamente estável, com estabilidade acima de 80%. Em pH 9,0 e 10, a atividade proteolítica original decresceu 41 e 83%, respectivamente (Figura 1).

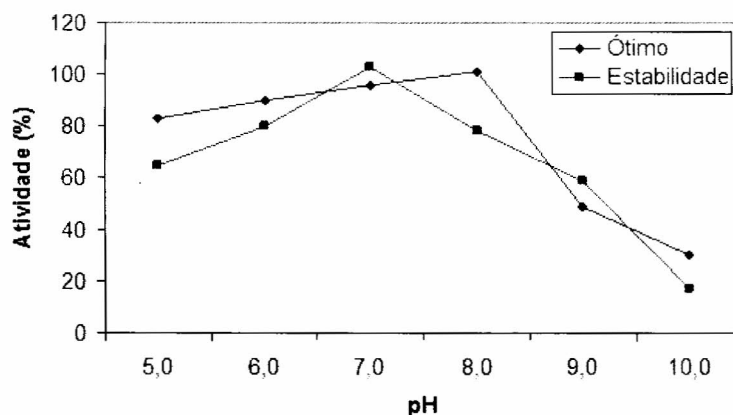


Figura 1 – Influência do pH sobre a atividade da protease (100% = 22U)

A atividade enzimática aumentou com a elevação da temperatura, atingindo seu nível máximo em 40 °C (25 U). Porém, acima desse valor, a atividade proteolítica diminuiu drasticamente (Figura 2). A temperatura ótima observada nesse estudo encontra-se abaixo da relatada para a protease de *Bacillus* sp. SMIA-2 (Nascimento e Martins, 2006), que exibiu temperatura ótima em 70 °C. Vazquez *et al.* (2004) encontraram, para as proteases de oito estirpes de *Pseudomonas* sp., a temperatura ótima de 40 °C. A enzima mostrou-se estável entre as temperaturas de 35 a 45 °C, mantendo atividade original superior a 75%.

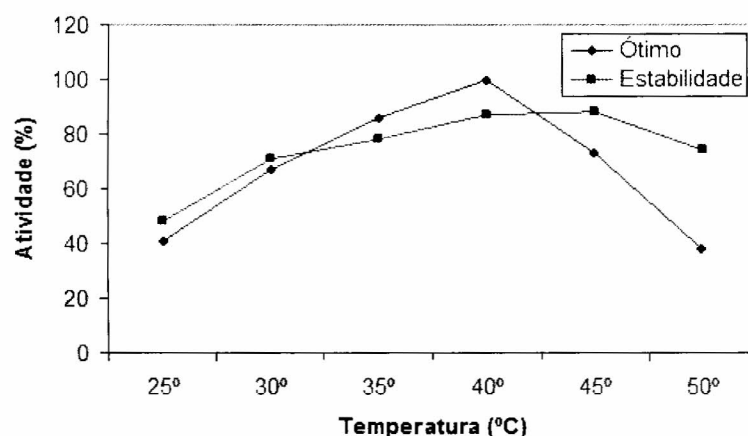


Figura 2 – Influência da temperatura sobre a atividade da protease (100% = 22 U).

*Influência de íons metálicos sobre a atividade enzimática*- Com exceção do íon Cu, todos os outros estimularam a atividade enzimática em relação ao controle, sobretudo na concentração de 5 mM (Figura 3). Nessa concentração, Na, Mg e Zn aumentaram em mais de 24% a atividade catalítica da enzima. Na menor concentração avaliada, o Ca foi o de maior destaque, aumentando em 39% a atividade proteolítica. Ainda na concentração de 1 mM, os íons Na e NH, também aumentaram em mais de 10% a atividade catalítica da enzima. A influência positiva de vários íons catiônicos na atividade proteolítica foi anteriormente documentada para vários microrganismos (Sookkheo *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2000).

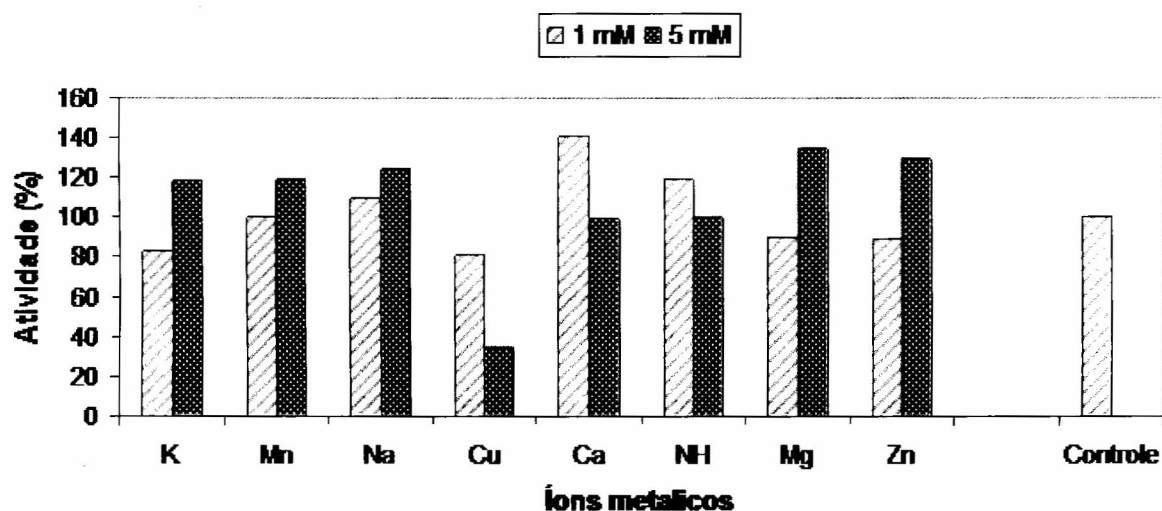


Figura 3 – Influência de diferentes íons metálicos sobre a atividade da protease. Controle = 19 U.

#### 4. Conclusão

O extrato enzimático bruto do isolado INPA R-732 possui atividade ótima em pH 8,0 e 40 °C, e os íons Ca e Mg foram os maiores ativadores catalíticos.

#### 5. Referências

Cherry, J.R.; Fidantsef, A.L. 2003. Directed evolution of industrial enzymes: an update. *Curr. Opin. Biotechnol.*

Gupta, R.; Beg, Q.K.; Lorenz, P. 2002. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial application. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*

Inhs, DA.; Schmidt, W.; Richter, F.R. 1999. Proteolytic enzyme cleaner, US Patent, 1999, 5961366.

Maurer, K.H. 2004. Detergent proteases. *Curr. Opin. Biotechnol.*

Nascimento, W.C.A.; Martins, M.L. 2006. Produção de proteases por *Bacillus* SP SMIA-2 crescido em soro de leite e água de maceração de milho e compatibilidade das enzimas com detergentes comerciais. *Cienc. Technol. Aliment.*

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, 122pp.

Oliveira, A.N.; Oliveira, L.A.; Andrade, J.S.; Chagas Júnior, A.F. 2006a. Atividade enzimática de isolados de rizóbia nativos da Amazônia Central crescendo em diferentes níveis de acidez. *Ci. Technol. Aliment.*

Oliveira, A.N.; Oliveira, L.A.; Andrade, J.S.; Chagas Júnior, A.F. 2006b. Enzimas hidrolíticas extracelulares de isolados de rizóbia nativos da Amazônia Central, Amazonas, Brasil. *Ci. Technol. Aliment.*

Sookkheo, B.; Sinchaikul, S.; Phutraku, S.; Chen, S.T. 2000. purification and characterization of the highly thermostable proteases from *Bacillus stearothermophilus* TLS33. *Protein Expression Purification*.

Stamford, T.L.M.; Stamford, N.P.; Coelho, L.C.B.B.; Araújo, J.M. 2001. Production and characterization of a thermostable  $\alpha$ -amylase from *Nocardiosis* sp. endophyte of yam bean. *Bioresour. Technol.*

Van Beilen, J.B.; Li, Z. 2002. Enzyme technology: an overview. *Curr. Opin. Biotechnol.*

Vazquez, S.C.; Coria, S.H.; Mac Cormack, W.P. 2004. Extracellular proteases from eight psychrotolerant Antarctic strains. *Microbiol. Res.*

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

Yang, J.K.; Shih, I.L.; Tzeng, Y.M.; Wang, S.L. 2000. Production and purification of protease from *Bacillus subtilis* that can deproteinize crustacean wastes. *Enzyme Microbial Technol.*