

CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DA AMILASE BRUTA DE UM RIZÓBIO NATIVO DA AMAZÔNIA CENTRAL

Cleane Gomes PRESTES¹; Arlem Nascimento de OLIVEIRA²; Luiz Antonio de OLIVEIRA³

¹Bolsista PIBIC/ CNPq/ INPA; ²Orientador CPCA/ INPA; ³Colaborador CPCA/ INPA

1. Introdução

As nitrogenase e hidrogenase presentes nas bactérias comumente referenciadas como rizóbios são enzimas chaves na fixação biológica do nitrogênio pelas leguminosas e, portanto, as de maior interesse biotecnológico na área agrônômica. Porém, não se pode negligenciar a potencialidade de uso dessas bactérias como fontes de outras enzimas de reconhecido valor industrial (Oliveira, 2006; Oliveira *et al.*, 2006a,b), como é o caso das amilases (Kirk *et al.*, 2002). As amilases estão entre as mais importantes enzimas industriais e são de grande importância na biotecnologia atual. Além de serem usadas como aditivos em detergentes, elas podem ser empregadas na sacarificação do amido e nas indústrias de alimentos, fermentação, papel e têxtil (Kirk *et al.*, 2002). As amilases microbianas têm a preferência do mercado de enzimas. O gênero *Bacillus* é um dos mais importantes e estudados grupos de bactérias produtoras de amilase comercial (Pandey *et al.*, 2000). Porém, programas para selecionar novas fontes microbianas para a produção de enzimas estão crescendo em todo o mundo (Stamford *et al.*, 2001).

Levando-se em consideração a diversidade microbiológica da região, a possibilidade de se obterem novas fontes microbianas de enzimas, e a escassez de estudos relacionados à produção e caracterização de amilases de rizóbios nativos da Amazônia, é que se propôs o presente estudo.

2. Material e métodos

Isolado bacteriano- O isolado INPA R-110 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 MgSO₄.7H₂O; 0,4 g de K₂HPO₄; 0,1 g de NaCl; 0,4 g de extrato de levedura e 10 g de manitol, pH 6,8. Para a produção de amilase, foi usado o meio YM modificado (Oliveira, 2006), onde o manitol foi substituído pela maltose.

Preparação do inóculo e crescimento microbiano- 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 inóculo foi adicionado aos 49 mL do meio YM modificado, e incubado nas mesmas condições anteriormente 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 absorvância determinada a 540nm

Atividade enzimática- A atividade amilolítica foi determinada com base no método DNS (Mamo & 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.

Caracterização enzimática- A influência do pH na atividade amilolítica foi avaliada (37 °C por 30 min.) em diferentes valores, usando 0,05 M dos tampões citrato-fosfato (5 a 6), fosfato (7 a 8) e Tris-HCl (9 a 10). A estabilidade foi estimada incubando os extratos enzimáticos nos tampões supracitados, em 37 °C por 24 h (Cordeiro *et al.*, 2002; modificado de Yang *et al.*, 2000). Após esse período, a atividade residual foi determinada de acordo com o método-padrão, anteriormente descrito. A temperatura ótima foi mensurada realizando-se experimentos em temperaturas variando de 25 a 55 °C. A termoestabilidade foi avaliada na mesma variação de temperatura, porém por um período de 2 h (Cordeiro *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2000). A atividade residual foi quantificada segundo o ensaio-padrão.

3. Resultados e discussão

Crescimento microbiano e atividade amilolítica no extrato enzimático- Em meio líquido contendo maltose como única fonte de carbono, o rizóbio INPA R-110 exibiu máximo crescimento em 48 h de incubação, correspondendo a uma densidade óptica ($D_{540\text{nm}}$) de 1,25. Resultados semelhantes foram reportados por Oliveira *et al.* (2006), que anotaram máxima D.O a partir do 2º dia de crescimento para diferentes isolados de rizóbio.

Nas condições experimentais estudadas, a máxima atividade amilolítica (30 U) foi anotada em 24 h de incubação, no início da fase exponencial de crescimento microbiano. Resultados similares foram documentados para outros rizóbios amilolíticos (Oliveira, 2006). Comparativamente, a atividade do INPA R-110 foi 15 vezes maior do que a reportada para outros isolados de rizóbio (Oliveira *et al.*, 2007).

Influência do pH sobre a atividade e estabilidade enzimática- A atividade enzimática foi crescente até o pH 7,0 (Figura 1), onde atingiu seu nível máximo (28 U). O menor valor foi registrado em pH 10,0, que representou 35% da atividade ótima. Quanto ao estudo de estabilidade, o extrato amilolítico foi 100% estável em pH 6,0 (Figura 1), seguido de decréscimos significativos a partir desse valor. Em pH 10,0, a enzima já havia perdido 95% de sua atividade em 24 h. Esses resultados são parcialmente semelhantes aos reportados por Oliveira (2006), que documentou pH ótimo entre 6,5 e 7,5, e estabilidade superior a 70% na faixa de pH 7,5-9,5 para extratos amilolíticos dos isolados de rizóbio INPA R-957 e INPA R-975.

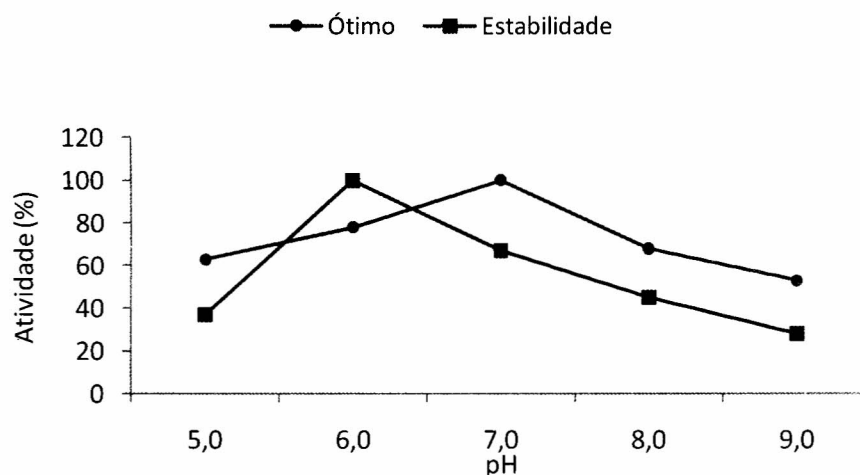


Figura 1 - Influência do pH sobre a atividade e estabilidade do extrato enzimático do isolado INPA R-110, obtido em meio líquido contendo maltose, por 24 h a 25 ± 1 °C. A atividade relativa foi expressa como porcentagem da atividade máxima (100% = 28 U).

Influência da temperatura sobre a atividade enzimática- A atividade amilolítica aumentou com a elevação da temperatura, atingindo máximo valor a 45 °C (31 U, Figura 2). Em 55 °C, a enzima perdeu 64% de sua atividade, em relação à temperatura ótima. Nesse estudo, a temperatura ótima observada foi próxima a de 40 °C reportada para a atividade amilolítica dos isolado INPA R-957 e INPA R-975 (Oliveira, 2006). Quanto à estabilidade, o extrato enzimático foi 100% estável em 40 °C (Figura 2), decrescendo a partir dessa temperatura. Em 55 °C, o extrato enzimático já havia perdido 85% de sua atividade em 2 h.

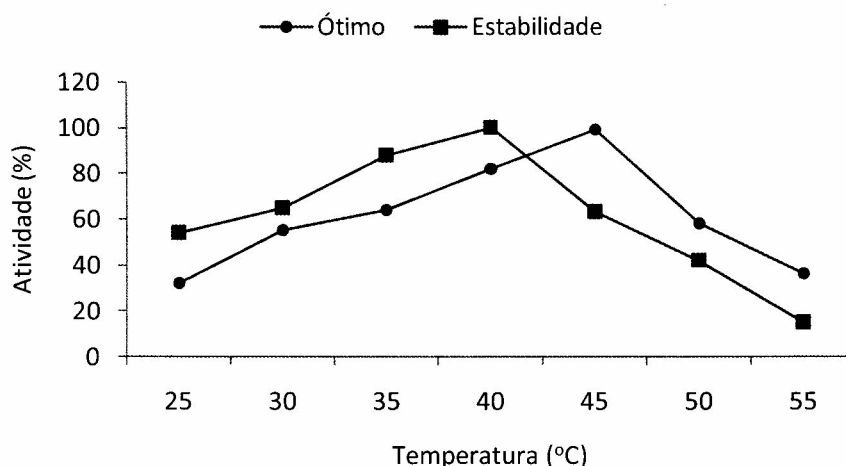


Figura 2 – Influência da temperatura sobre a atividade do extrato enzimático do isolado INPA R-110, obtido em meio líquido contendo maltose, por 24 h a 25±1 °C. A atividade relativa foi expressa como porcentagem da atividade máxima (100% = 31 U).

4. Conclusão

O extrato enzimático bruto do isolado INPA R-110 possui atividade ótima em pH 7,0 e 45 °C.

5. Referências

Cordeiro, C.A.M.; Martins, M.L.L.; Luciano, A.B. 2002. Production and properties of α -amylase from thermophilic *Bacillus* sp. *Braz. J. Microbiol.*, 33:57-61.

Kirk, O.; Borchert, T.V.; Fuglsang, C.C. 2002. Industrial enzyme applications. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 13:345-351.

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. 2006a. Atividade enzimática de isolados de rizóbia nativos da Amazônia Central crescendo em diferentes níveis de acidez. *Ci. Tecnol. Aliment.*, 26:204-210.

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. Tecnol. Aliment.*, 26:853-860.

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.; Mohanohanohan, R. 2000. Advances in microbial amylases. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 31:135-152.

Stamford, T.L.M.; Stamford, N.P.; Coelho, L.C.B.B.; Araújo, J.M. 2001. Production and characterization of a thermostable α -amylase from *Nocardiosis* sp. endophyte of yam bean. *Bioresour. Technol.*, 76:137-141.

Southgate, D.A.T. 1991. *Determination of foods carbohydrates*. London: Elsevier Applied Science, 232p.

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.*, 26:406-413.