

ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E SELEÇÃO DE BACTERIAS PRODUTORAS DE α -AMILASE

Data de submissão: 11/03/2024

Data de aceite: 21/03/2024

Cristian Jacques Bolner de Lima

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso, IFMT
Cáceres-MT

Monique Virões Barbosa dos Santos

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso, IFMT
Cáceres-MT

Marcos Benedito Santana

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso, IFMT
Cáceres-MT

amostras oriundas de mandioca, milho, pão embolorado, cereais, ração de peixe, farinha de tapioca, grãos de feijão, arroz e do solo. Foram isoladas um total de doze bactérias produtoras de amilase, sendo que destas, a bactéria isolada da raiz de milho, posteriormente chamada de *Bacillus* sp. MR1 apresentou o maior índice de atividade enzimático (4,06 cm) demonstrando potencial para produzir a enzima α -amilase.

PALAVRAS-CHAVE: Fermentação, Atividade enzimática, Enzimas.

RESUMO: As amilases são enzimas que hidrolisam moléculas de amido liberando diversos produtos incluindo dextrinas e progressivamente pequenos polímeros compostos por unidades de glicose. A apresentam grande importância na biotecnologia com um amplo campo de aplicações, como por exemplo na indústria de alimentos, em cervejarias e bebidas fermentadas, na indústria de papel e celulose, indústria química e farmacêutica, na produção de vitaminas e antibióticos. Este trabalho teve como objetivo, isolar, caracterizar e selecionar bactéria produtoras de amilase, provenientes de

ISOLATION, IDENTIFICATION AND SELECTION OF α -AMYLASE PRODUCING BACTERIA

ABSTRACT: Amylases are enzymes that hydrolyze starch molecules, releasing various products including dextrins and progressively small polymers composed of glucose units. It is of great importance in biotechnology with a wide field of applications, such as in the food industry, in breweries and fermented drinks, in the paper and cellulose industry, in the chemical and pharmaceutical industry, in the production of vitamins and antibiotics. This work aimed to isolate, characterize and select amylase-producing bacteria from samples from

cassava, corn, moldy bread, cereals, fish feed, tapioca flour, bean grains, rice and soil. A total of twelve amylase-producing bacteria were isolated, these being a bacterium isolated from the corn root, later called *Bacillus* sp. MR1 presented the highest enzymatic activity index (4.06 cm) demonstrating the potential to produce the α -amylase enzyme.

KEYWORDS: Fermentation, Enzymatic activity, Enzymes.

1 | INTRODUÇÃO

As amilases representam um dos mais importantes grupos de enzimas dentro do campo da biotecnologia. A α -amilase é uma enzima que cliva as ligações α -1,4 do amido liberando unidades de glicose e dextrinas. Estas enzimas têm numerosas aplicações industriais e biotecnológicas, incluindo a sua utilização na sacarificação do amido para produção de etanol (RODRÍGUEZ et al., 2006).

Segundo Barato et al. (2011), a ampla diversidade quanto às características das enzimas potencializa sua aplicação em diferentes processos na indústria, assim, frente à demanda por novas hidrolases com prospecção de aplicabilidade no setor industrial, há um estímulo natural pela exploração da biodiversidade microbiana, com o isolamento e seleção de novas cepas produtoras de enzimas.

Microrganismos isolados da própria matéria prima, que será empregada como substrato, na fermentação, representam uma alternativa promissora, uma vez que estes microrganismos estão mais adaptados à composição química da fonte nutricional e, portanto, mais hábeis para metabolizarem o substrato.

Diante da necessidade do setor agroindustrial em obter enzimas com novas características, assim como, substratos alternativos para cultivo, especialmente de menor custo, o presente trabalho objetivou o isolamento e seleção de bactérias oriundas de diferentes fontes e com capacidade para produzirem enzimas amilolíticas.

2 | MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Meios de cultura

Para o isolamento das culturas bacterianas foram utilizados os meios M1 e M2, cujas composições são apresentadas na tabela 01.

Componentes	Concentração (g/L)	
	M1	M2
Amido	0,5	5,0
Extrato de carne	3,0	3,0
Peptona	5,0	5,0
Agar bacteriológico	-	20,0

Tabela 01. Composição dos meios de cultura utilizados para o isolamento de microrganismos

2.2 Meio de cultura para a manutenção das cepas

As bactérias foram conservadas em tubos de eppendorf, contendo 1 mL meio de crescimento e 1 mL de glicerol a 20%. Após este processo, as culturas foram mantidas sob congelamento a -10°C, para diminuir o metabolismo celular, até futura necessidade de uso.

2.3 Meio de cultura para o crescimento dos microrganismos

O meio empregado no crescimento das culturas bacterianas está descrito na tabela 02.

Componente	Concentração (g/L)
Amido	5,0
Extrato de levedura	3,0
Peptona	5,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,6
(NH ₄) ₂ SO ₄	6,0
KH ₂ PO ₄	5,0

Tabela 02. Composição do meio de cultura utilizado para o crescimento dos microrganismos produtores de alfa amilase

2.4 Coleta de amostras

Foram coletadas amostras de mandioca, milho, pão embolorado, cereais, ração de peixe, farinha de tapioca e grãos de feijão e arroz. Todas as amostras foram acondicionadas em sacos plásticos.

2.5 Isolamento dos microrganismos

Cerca de 5 g, de cada amostra, foram incubadas em frascos de erlenmeyers de 125 mL de capacidade, contendo 20 mL do meio M1 (Tabela 1), em agitador rotativo a 150 rpm, a 35°C, durante 72 horas.

Para o isolamento foi utilizada a técnica de plaqueamento em superfície usando o meio M2 (Tabela 2). Assim, foram tomadas alíquotas de 1 mL, de cada meio, realizando-se diluições decimais seriadas de 10⁻¹ a 10⁻⁶ em solução fisiológica, sendo 0,1 mL de cada diluição distribuída, com auxílio de alça de Drigalsky, na superfície do meio em placas de Petri. As culturas foram sucessivamente plaqueadas, tantas vezes quantas necessárias, até a obtenção de culturas puras, o que foi comprovado por observações morfológicas macroscópicas das colônias formadas e pela análise da morfologia microscópica pela observação de preparações coradas pelo método de Gram (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2003).

2.6 Seleção preliminar de microrganismos produtores de α -amilase

A seleção de bactérias produtoras de **α -amilase** foi realizada segundo Mariano e Silveira (2005), com algumas modificações. As bactérias foram inoculadas em placas de Petri com meio M2. As placas foram incubadas a 30°C por 72h e, em seguida, realizadas as leituras.

Para tanto, foram adicionados 5 ml de solução de iodo-KI 0,01N (solução lugol) e mantido por 20 min, em seguida, a solução foi descartada e observado a presença de um halo claro em torno da colônia, indicando secreção de amilase. Os experimentos foram realizados em triplicata e para aquelas linhagens que apresentaram halo visível, a atividade amilolítica das linhagens foi estimada mediante um índice enzimático (IE), que expressa à relação do diâmetro médio do halo de hidrólise e o diâmetro médio da colônia.

2.7 Avaliação das características morfológicas de bactérias

A avaliação das características morfológicas é o primeiro passo para a identificação de um novo grupo taxonômico de microrganismos. Essas características podem identificar diferenças fisiológicas importantes em microrganismos, os quais podem ser detectados, posteriormente, mediante estudos mais refinados (PELCZAR et al., 1981).

Características culturais relevantes que podem ser avaliadas são o tempo de formação de colônias isoladas e alteração do pH do meio de cultura com azul de bromotimol como identificador de diferenças fisiológicas entre gêneros (KRIEG; HOLT, 1984). Além destas, outras características utilizadas são produção de exopolissacarídeos, tamanho, cor, borda, forma e aspecto da colônia (ODEE et al., 1997).

3 | RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 Isolamento e seleção de microrganismos produtores de α -amilase

Foram coletadas amostras de raspas de casca de tubérculo, raízes e, também, do solo da plantação de milho e mandioca, amostras de pão embolorado, cereais, ração de peixe, farinha de tapioca, grãos de feijão e arroz. Estas amostras foram diluídas em água e inoculadas. A partir destas amostras foram isoladas, aproximadamente, 40 linhagens bacterianas, cujo processo de seleção, encontra-se esquematizado na tabela 03.

Etapa da seleção	Linhagens
Linhagens	40
Pré seleção – Linhagens formadoras de halo de hidrólise	12
Linhagem selecionada	1

Tabela 03. Processo de seleção da linhagem bacteriana

As linhagens isoladas foram testadas, inicialmente, quanto a sua capacidade de utilização do amido como fonte de energia através do teste da solução de iodo-KI, ou seja, por índice de atividade enzimático (IE), sendo a medida realizada no período de 72 horas. A partir deste experimento (seleção de microrganismos produtores de amilase) foram obtidos 12 isolados (denominados de cepa 1 a 12), conforme tabela 04.

Isolados	IE em 72 horas	Origem
Cepa 1	2,51	Tubérculo mandioca
Cepa 2	3,60	Raiz mandioca
Cepa 3	1,42	Solo (plantação mandioca)
Cepa 4	2,43	Grão milho
Cepa 5	4,06	Raiz milho
Cepa 6	1,08	Solo (plantação milho)
Cepa 7	2,06	Cereais
Cepa 8	1,76	Pão
Cepa 9	2,10	Ração de peixe
Cepa 10	1,89	Farinha de tapioca
Cepa 11	1,05	Grãos de arroz
Cepa 12	0,54	Grãos de feijão

Tabela 04. Índice IE, calculado após 72 horas de cultivo, em relação à produção de amilase

Observa-se, que 6 isolados (60%) apresentaram IE superior a 2,0, após 72 horas de incubação. Os valores encontrados foram superiores aos descritos por Oliveira et al. (2007), que identificaram atividade enzimática maior que 2,0 somente em 37% das cepas isoladas, demonstrando os potenciais desses isolados na produção da enzima, assim como a adequação das fontes para o isolamento. Para avaliação do potencial enzimático, alguns autores recomendam o índice enzimático (IE) maior ou igual a 2,0. Dessa forma, os isolados que exibiram os maiores IE nos meios de crescimento, são os que possuem maior atividade enzimática extracelular (OLIVEIRA et al. 2006).

Dentre as cepas de maior IE, a cepa 5 foi a que apresentou melhor resultado (4,06 cm), sendo esta escolhida para continuidade da pesquisa. Os demais isolados, que apresentaram um IE superior a 2,0, foram congelados e armazenados para trabalhos futuros.

3.2 Identificação parcial dos microrganismos

Foi realizado o estudo morfológico das colônias analisando as características apresentadas pelos microrganismos ao crescerem em meios de cultura, as quais demonstrem expressões fenotípicas do seu material genético, tornando-se úteis a sua identificação. Embora muitas vezes elas sejam consideradas de importância secundária e

utilizadas apenas na identificação preliminar, em muitos casos, são essenciais e, às vezes, representam a única característica que permite a distinção e a identificação das espécies (ANDRADE, 2008).

Na tabela 05, estão apresentadas as características morfológicas observadas para os isolados.

Bactéria	Cor	Elevação	Borda	Opaca/translúcida	Úmida/seca	Ácido/Alcalino
Cepa 1	Amarela	Elevada	Irregular	Opaca	Úmida	Ácido
Cepa 2	Amarela	Achatada	Irregular	Opaca	Úmida	Alcalino
Cepa 3	Branca	Elevada	Irregular	Opaca	Úmida	Alcalino
Cepa 4	Amarela	Achatada	Irregular	Opaca	Úmida	Alcalino
Cepa 5	Amarela	Achatada	Irregular	Opaca	Úmida	Alcalino
Cepa 6	Branca	Elevada	Irregular	Opaca	Úmida	Alcalino
Cepa 7	Branca	Achatada	Puntiforme	Opaca	Úmida	Alcalino
Cepa 8	Amarela	Achatada	Irregular	Opaca	Seca	Alcalino
Cepa 9	Branca	Elevada	Circular	Translúcida	Seca	Alcalino
Cepa 10	Amarela	Achatada	Puntiforme	Opaca	Úmida	Alcalino
Cepa 11	Branca	Achatada	Irregular	Translúcida	Seca	Alcalino
Cepa 11	Branca	Achatada	Irregular	Translúcida	Seca	Alcalino
Cepa 12	Branca	Elevada	Puntiforme	opaca	Úmida	Alcalino

Tabela 05. Avaliação morfológica dos isolados e avaliação quanto à produção de ácido/base

Dos 12 microrganismos isolados, 50% apresentaram coloração amarela e os outros 50% coloração branca. Foram observadas colônias achatadas e elevadas, com bordas puntiforme, circular e irregular. Em relação a umidade, 25% das colônias são secas e 75% são úmidas, apresentando aspecto opaco e translúcido. No que concerne ao pH, somente a cepa 1 exibiu caráter ácido, sendo as demais caráter básico.

Após a seleção do microrganismo desejado (cepa 5), está, também, foi identificada por microscopia ótica. A técnica de coloração de Gram aliada à observação de lâminas a fresco foi utilizada para diferenciar os grupos de bactérias (FREITAS; PICOLI, 2007).

A análise da cultura microbiana selecionada, através de preparações coradas pelo método de Gram, revelou a presença de formas de bastonetes retos, pequenos e finos, de mesma morfologia e Gram-negativa. Baseando-se, nas características morfológicas microscópicas e macroscópicas apresentadas pelos microrganismos foram identificados como *Bacillus* sp (Figura 01).

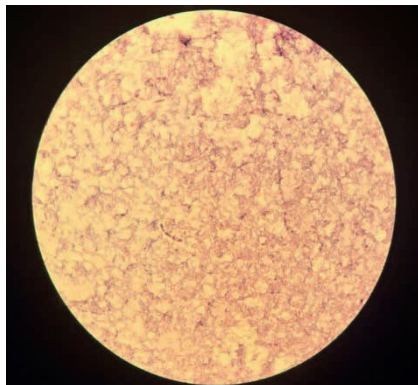


Figura 01. Bactéria MR1 gram-negativa

Fonte: (Autor, 2022).

De acordo com Van Der Maarel, et al. (2002) as amilases são encontradas em micróbios, plantas e animais, mas industrialmente importantes enzimas comerciais são produzidas a partir de micróbios. Entre todas as fontes de amilase, as bactérias são as mais significativas por causa do espaço limitado e curto período de tempo necessário para o seu cultivo e sua viabilidade para a genética manipulação (SELVAMOHAN; SHERIN, 2010).

Vários microrganismos diferentes são relatados para produzir amilases extracelulares. Comercialmente, a α -amilase é produzida, principalmente, a partir do gênero *Bacillus*. Entre muitas espécies, *Bacillus subtilis*, *B. stearothermophilus*, *B. licheniformis* e *B. amyloliquefaciens* são relatados extensivamente como produtores industriais de amilase (SOUZA; MAGALHÃES, 2010).

4 | CONCLUSÃO

Das quarenta colônias isoladas, doze apresentaram índice de atividade enzimático, sendo que a bactéria isolada da raiz de milho (*Bacillus* sp. MR1) produziu maior o índice enzimático com valor de 4,06 cm, demonstrando, assim, maior potencial para produzir a enzima α -amilase. Além disso, a bactéria isolada *Bacillus* sp. MR1, através de preparações coradas pelo método de Gram, revelou a presença de formas de bastonetes retos, pequenos e finos, de mesma morfologia e gram-negativa.

AGRADECIMENTOS

A Pró-Reitora de pesquisa do Instituto Federal do Mato Grosso (PROPES), a Fundação de Amparo de Pesquisa do Estado do Mato Grosso (FAPEMAT), além do IFMT Campus Cáceres.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, D. M. **Avaliação de bactérias provenientes de um biofiltro de tratamento de vapores de gasolina.** 2008. 96 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.
- BARATTO C. M. et al. **Seleção de microrganismos produtores de enzimas hidrolíticas isolados da região do meio oeste de Santa Catarina, Brasil.** Evidência, v. 11, n. 2, p. 15-28, 2011.
- FREITAS, R. F.; PICOLI, S. U. **A coloração de Gram e as variações na sua execução.** Centro Universitário de Fevale – Laboratório de Biomedicina. News Lab. Ed. 82, p. 124-128. 2007.
- KRIEG, N.R.; HOLT, J.G. **Bergey's Manual of Systematic.** Bacteriology, v. 1, London, Baltimore, 1984.
- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Brock Biology of Microorganisms.** 10. ed. New York: Prentice Hall, 2003.
- MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E. B. **Manual de práticas em fitobacteriologia.** 2. ed. Recife. Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2005.
- ODEE, D. W. et al. **Phenotypic Characteristics and Composition of Rhizobia Associated with Woody Legumes Growing in Diverse Kenyan Conditions.** Plant and Soil, v.188, p.65-75, 1997.
- OLIVEIRA, A. N. et al. **Atividade Enzimática de Isolados de Rizóbia Nativos da Amazônia Central Crescendo em Diferentes Níveis de Acidez.** Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 26, n. 1, p. 204-210, 2006.
- OLIVEIR, A. N. et al. **Produção de amilase por rizóbios, usando farinha de pupunha como substrato.** Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 27, n. 1, p. 61-66, 2007.
- PELCZAR, Jr. **Microbiologia: Conceitos e Aplicações.** 4. ed. São Paulo: Makron Books, 1998.
- RODRÍGUEZ, V. B. et al., **Enzymatic hydrolysis of soluble starch with an α -Amylase from *Bacillus licheniformis*.** Biotechnology Progress, v. 22, n. 3, 718-722, 2006.
- SELVAMOHAN, T.; SHERIN, S. **Optimization of protease production from *Bacillus cereus* using different substrates.** Plant Archives, v. 10, n. 2, p. 651-656, 2010.
- SOUZA, P. M.; MAGALHÃES, P. O. **Application of microbial amilase in industry – A review.** Brazilian Journal of Microbiology, v. 41, n. 4, p. 850-861, March. 2010.
- VAN DER MAAREL, M. J. et al. **Applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family.** Journal of Biotechnology, v. 94, n. 2, p. 137-155, 2001.