



Ciência e Tecnologia de Alimentos

ISSN: 0101-2061

revista@sbcta.org.br

Sociedade Brasileira de Ciência e  
Tecnologia de Alimentos  
Brasil

de OLIVEIRA, Arlem Nascimento; de OLIVEIRA, Luiz Antonio; Souza ANDRADE, Jerusa;  
Freitas CHAGAS-JÚNIOR, Aloisio

Produção de amilase por rizóbios, usando farinha de pupunha como substrato  
Ciência e Tecnologia de Alimentos, vol. 27, núm. 1, enero-marzo, 2007, pp. 61-66  
Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos  
Campinas, Brasil

Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=395940081011>

- Como citar este artigo
- Número completo
- Mais artigos
- Home da revista no Redalyc

redalyc.org

Sistema de Informação Científica

Rede de Revistas Científicas da América Latina, Caribe, Espanha e Portugal

Projeto acadêmico sem fins lucrativos desenvolvido no âmbito da iniciativa Acesso Aberto

# Produção de amilase por rizóbios, usando farinha de pupunha como substrato

## *Production of amylase by rhizobia using peach palm flour as substrate*

Arlem Nascimento de OLIVEIRA<sup>1\*</sup>, Luiz Antonio de OLIVEIRA<sup>2</sup>,  
Jerusa Souza ANDRADE<sup>3</sup>, Aloisio Freitas CHAGAS-JÚNIOR<sup>1</sup>

### Resumo

As amilases estão entre as mais importantes enzimas industriais e são de grande interesse na biotecnologia atual. Embora elas possam ser derivadas de diversas fontes, as de origem microbiana são geralmente as mais procuradas pelas indústrias. As espécies do gênero *Bacillus* são consideradas as principais fontes de amilases. Apesar disso, a busca por novas fontes microbianas vem crescendo em todo o mundo. O presente estudo objetivou avaliar a produção de amilase por rizóbios nativos, usando farinha de pupunha como substrato. Neste estudo, foi adotado o delineamento experimental inteiramente casualizado, com três repetições. Foram determinados ainda os coeficientes de correlação de Pearson entre as variáveis pH do meio, proteína extracelular, biomassa celular, diâmetro médio da colônia (DMC), diâmetro médio do halo (DMH), índice enzimático (IE) e atividade amilolítica das bactérias selecionadas. Dos 19 isolados com atividade amilolítica em meio YMA modificado, sete (36,8%) exibiram "IE"  $\geq 2,1$ , o que permite considerá-los bons produtores de amilase. Os "IE" apresentados pelos isolados INPA R-987, 950 e 915B foram significativamente inferiores ( $p < 0,01$ ) aos mostrados pelas bactérias INPA R-926, 975 e 957. A atividade amilolítica variou significativamente ( $p < 0,01$ ) entre as bactérias investigadas. Os isolados INPA R-975 e R-926 apresentaram, respectivamente, a maior ( $1,00 \text{ U.min}^{-1}.\text{mL}^{-1}$ ) e a menor ( $0,31 \text{ U.min}^{-1}.\text{mL}^{-1}$ ) média de atividade. Em termos gerais, a proteína extracelular correlacionou-se positivamente com "IE" ( $r = 0,52^*$ ;  $p < 0,05$ ) e "DMH" ( $r = 0,55^*$ ;  $p < 0,05$ ). A biomassa celular apresentou correlações positivas com atividade amilolítica ( $r = 0,55^*$ ;  $p < 0,05$ ) e "DMH" ( $r = 0,54^*$ ;  $p < 0,05$ ) e negativa com o pH final do meio de cultivo ( $r = 0,93^{**}$ ;  $p < 0,01$ ).

**Palavras-chave:** atividade amilolítica; rizóbios; farinha de pupunha; Amazônia Central.

### Abstract

Amylases are among the most important industrial enzymes and are of great significance in present-day biotechnology. Although they can be derived from various sources, enzymes from microbial sources are generally the most required by industry. Species of the genus *Bacillus* are considered to be the main sources of amylases, although screening for new microbial sources is increasing all over the world. The objective of the present study was to evaluate the production of amylase by indigenous rhizobia, using peach palm flour as substrate. In this study, a completely randomized experimental design was adopted with three replicates. Pearson's correlation coefficients were calculated for medium pH, extracellular protein, cellular biomass, mean colony diameter (MCD), mean halo diameter (MHD), enzymatic index (EI) and amylolytic activity variables from the bacteria selected. Out of the 19 rhizobia strains with amylolytic activity on modified YMA, seven (36.8%) strains showed "EI"  $\geq 2,1$ , and they were considered as good producers of amylase. The "EI" presented by bacteria INPA R-987, R-950 and R-915B were significantly lower ( $p < 0,01$ ) than those shown by the INPA R-926, R-975 and R-957. The amylolytic activity varied significantly ( $p < 0,01$ ) among the rhizobia strains. INPA R-975 and R-926 strains presented, respectively, the highest ( $1.00 \text{ U.min}^{-1}.\text{mL}^{-1}$ ) and the lowest ( $0.31 \text{ U.min}^{-1}.\text{mL}^{-1}$ ) activity average. In general terms, the extracellular protein was correlated positively with "EI" ( $r = 0.52^*$ ;  $p < 0.05$ ) and "MHD" ( $r = 0.55^*$ ;  $p < 0.05$ ). The cellular biomass showed positive correlations with amylolytic activity ( $r = 0.55^*$ ;  $p < 0.05$ ) and "MHD" ( $r = 0.54^*$ ;  $p < 0.05$ ), and a negative with final pH medium ( $r = 0.93^{**}$ ;  $p < 0.01$ ).

**Keywords:** amylolytic activity; rhizobia; peach palm flour; Central Amazonian.

## 1 Introdução

O amido, principal polissacarídeo de reserva dos vegetais, é degradado por enzimas amilolíticas de vários microrganismos<sup>20</sup>. As amilases estão entre as mais importantes enzimas industriais e são de grande importância na biotecnologia atual<sup>26</sup>. 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. Com o advento de

novas fronteiras biotecnológicas, o espectro de aplicação das amilases tem se expandido para muitas outras áreas, incluindo a clínica, farmacêutica, médica e químico-analítica<sup>26</sup>.

As amilases ocorrem amplamente em animais, plantas e microrganismos. Entretanto, devido às vantagens que oferecem, como menor tempo de produção, as amilases microbianas têm a preferência do mercado de enzimas<sup>28</sup>. O gênero *Bacillus* é um dos mais importantes e investigados grupos de bactérias produtoras de amilase comercial<sup>26</sup>. Porém, programas para selecionar novas fontes microbianas estão crescendo ao redor do mundo<sup>6,33,34</sup>.

Entre os vários parâmetros que estimulam a produção de amilases, as condições de crescimento microbiano e os substratos de carbono usados no meio de cultivo têm recebido atenção especial. Fontes de carbono como dextrina, frutose, glicose, lactose, maltose, amido solúvel, além de outras, encarecem sua produção<sup>12</sup>. No meio de cultivo, esses substratos podem ser substituídos por subprodutos agrícolas de baixo custo, o que torna o processo de produção dessas enzimas mais econômico. Com esse objetivo, farinhas e farelos de diferentes grãos e tubérculos como arroz, cevada, milho, trigo, mandioca

Recebido para publicação em 15/12/2005

Aceito para publicação em 24/1/2007 (001652)

<sup>1</sup> Coordenação de Pesquisas em Ciências Agrônomicas – CPCA,  
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA,  
Universidade Federal do Amazonas – UFAM,  
Av. André Araújo, 2936, Aleixo, CEP 69060-001, Manaus - AM, Brasil,  
E-mail: arlem@yahoo.com.br

<sup>2</sup> Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia,  
Coordenação de Pesquisas em Ciências Agrônomicas – CPCA,  
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA,  
E-mail: luizoli@inpa.gov.br

<sup>3</sup> Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA,  
Coordenação de Pesquisas em Tecnologia de Alimentos – CPTA,  
E-mail: andrade@inpa.gov.br

\*A quem a correspondência deve ser enviada

e batata têm sido usadas no meio de cultura para aumentar a produtividade de amilases de fungos e bactérias<sup>12,13,27</sup>.

Palmeira nativa dos trópicos americanos, a pupunheira (*Bactris gasipaes* Kunth) produz frutos comestíveis de alto valor nutritivo<sup>39</sup>, os quais estão completamente integrados à dieta alimentar dos amazônidas<sup>8,22</sup>. Os frutos são consumidos cozidos e prestam-se à extração de óleo ou à produção de farinhas para as mais variadas finalidades<sup>10</sup>. Segundo CLEMENT<sup>7</sup>, a composição média de carboidratos nos frutos pode variar de 59,7 a 81,0% em base seca, o que evidencia a potencialidade de seus subprodutos como fonte de amido para a produção de amilases por microrganismos amilolíticos. Nesse sentido, o presente estudo visou avaliar o uso da farinha de pupunha na produção de amilase por isolados de rizóbio nativos da Amazônia Central.

## 2 Material e métodos

### 2.1 Obtenção da farinha de pupunha

Os frutos de 15 tipos de pupunha foram obtidos no mercado municipal Adolpho Lisboa e processados em farinha com casca e sem caroço nas dependências da Coordenação de Pesquisas em Tecnologia de Alimentos do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (CPTA/INPA). Detalhes referentes à obtenção da farinha podem ser encontrados no estudo de ANDRADE<sup>3</sup>. A composição média da farinha de pupunha pode ser observada na Tabela 1.

**Tabela 1.** Composição média da farinha de pupunha com casca<sup>1</sup>.

Constituintes	Concentração (%)
Carboidrato	69,7 ± 5,9
Lipídio	10,3 ± 4,7
Proteína	5,7 ± 1,1
Cinzas	2,2 ± 0,5
Fibra total	8,8 ± 2,5
Umidade	3,5 ± 0,4

<sup>1</sup> Médias de 15 tipos de pupunha, com três repetições.

### 2.2 Coleta de solo e isolamento dos rizóbios

Foram coletadas amostras de solos de várzea e de terra preta de índio como fontes potenciais de inóculo de rizóbia em algumas propriedades rurais dos Municípios de Careiro da Várzea e Manacapuru, ambos no Estado do Amazonas. Os solos foram obtidos das rizosferas de cultivos de feijão, mandioca, couve, jerimum, pepino, quiabo, além de algumas gramíneas, a uma profundidade máxima de 10 cm.

Como substrato, misturou-se 30 g de solo-inóculo com 900 g de areia previamente esterilizada (lavada e autoclavada a 121 °C por 60 minutos). Nesse substrato, plantas de feijão caupi e soja (plantas-iscas) foram irrigadas diariamente com água estéril e nutridas, a cada dois dias, com 50 mL de solução nutritiva<sup>25</sup>. Ao final de 45 dias de crescimento, os nódulos das plantas foram coletados e as bactérias isoladas de acordo com VINCENT<sup>38</sup>.

### 2.3 Atividade amilolítica dos rizóbios em meio sólido

Para testar a habilidade dos rizóbios em produzir amilase em meio sólido, colônias puras de diferentes isolados foram repicadas para o centro de placas de Petri contendo meio YMA (*yeast manitol agar*)<sup>38</sup> modificado, no qual o manitol foi substituído na mesma concentração por amido de milho (maizena<sup>®</sup>). Após quatro dias de incubação das bactérias nesse meio, adicionou-se, em cada placa, 5 mL de tintura de iodo. Uma zona amarelada ao redor da colônia, em contraste com o meio azulado (Figura 1), indicou atividade amilolítica<sup>6</sup>.

A atividade amilolítica dos isolados foi estimada mediante um índice enzimático (IE) que expressa a relação do diâmetro médio do halo de hidrólise e o diâmetro médio da colônia<sup>14</sup>. A partir desses índices, avaliou-se em meio líquido, apenas a produção amilolítica das bactérias que apresentaram "IE" ≥ 2,4 (INPA R-926, R-957, R-975 e R-991). Nesse experimento, usou-se o meio YM<sup>38</sup> modificado, com a farinha de pupunha (1%, peso/volume) sendo a única fonte de carbono.

### 2.4 Preparação do sobrenadante enzimático dos isolados selecionados

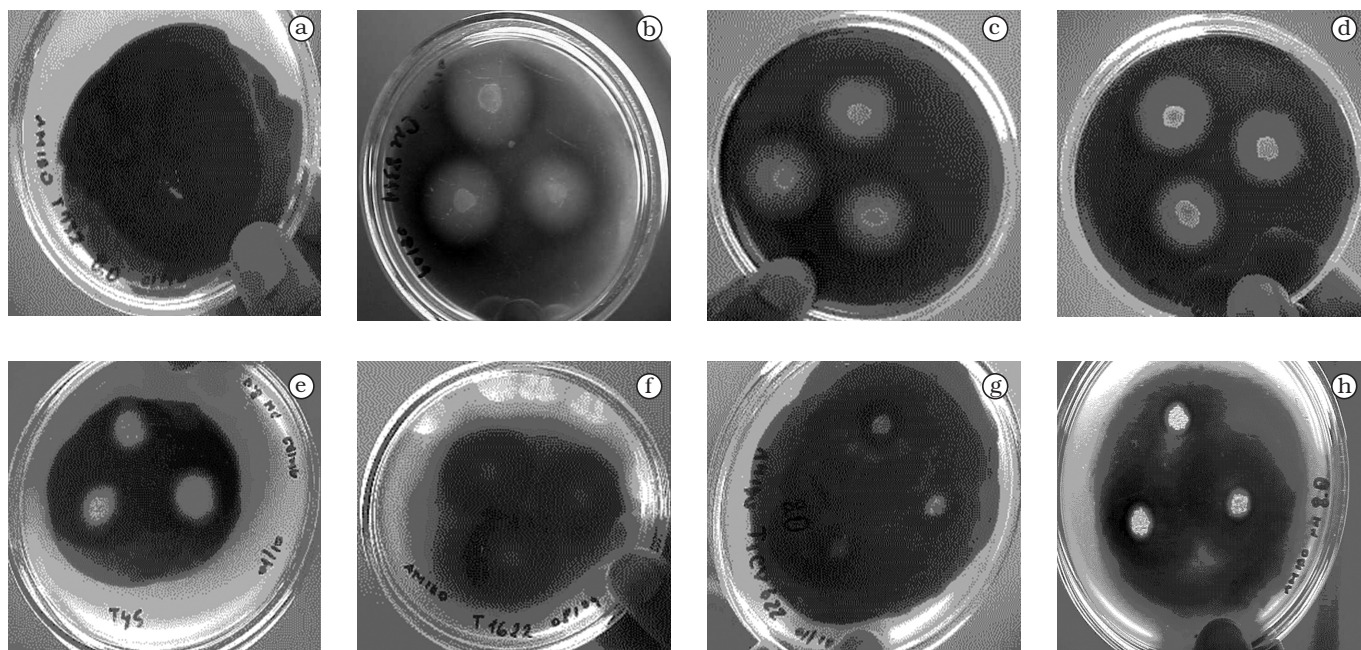
Em frascos de Erlenmeyer contendo 30 mL do meio supracitado (esterilizado a 121 °C por 20 minutos), inoculou-se 1 mL de suspensão bacteriana (INPA R-926 =  $1,4 \times 10^9$  UFC; INPA R-975 =  $1,3 \times 10^9$  UFC; INPA R-957 =  $10^9$  UFC; INPA R-991 =  $1,8 \times 10^9$  UFC). Após a inoculação, os frascos foram incubados em um agitador rotatório (100 rpm) a 28 °C, por três (INPA R-926, R-975 e R-957) e cinco dias (INPA R-991). Ao final dessa etapa, as células foram colhidas por centrifugação a 10000 rpm por 10 minutos, a 28 °C. O sobrenadante obtido foi usado para avaliar a atividade enzimática, teores de proteína e pH.

### 2.5 Processos analíticos

A atividade amilolítica foi avaliada quantificando-se os açúcares redutores<sup>23</sup> liberados durante a reação, usando-se amido de milho (maizena<sup>®</sup>) gelatinizado como substrato. A mistura de reação conteve 0,35 mL de solução de amido 1%, 0,35 mL de tampão fosfato 0,05 M, pH 6,5 e 0,3 mL de sobrenadante enzimático. O branco de reação consistiu-se de 0,35 mL de solução de amido 1% e 0,65 mL de tampão fosfato 0,05 M, pH 6,5. Após incubação por 30 minutos, a 37 °C, a reação foi paralisada em água fervente, seguida de resfriamento em banho gelado. Uma unidade de amilase (U) foi definida como a quantidade de sobrenadante enzimático necessário para liberar um  $\mu$ mol de glicose por minuto nas condições experimentais descritas anteriormente. A proteína foi determinada pelo método do biureto<sup>11</sup>, usando-se albumina de soro bovino (BSA) na elaboração da curva padrão.

### 2.6 Produção de biomassa e determinação do pH

A massa celular foi avaliada após pré-pesagens de tubos eppendorf vazios com volume para 2 mL de meio. As células obtidas após centrifugação foram secas por uma noite a 110 °C e, em seguida, pesadas. A biomassa ( $\text{g.L}^{-1}$ ) foi o resultado da



**Figura 1.** Atividade amilolítica de sete isolados de rizóbio em meio YMA modificado, usando amido de milho (maizena®) como única fonte de carbono, e tintura de iodo como substância reveladora. a) INPA R-921 = Não amilolítico; b) INPA R-926; c) INPA R-975; d) INPA R-957; e) INPA R-991; f) INPA R-950; g) INPA R-915B; e h) INPA R-987.

diferença entre os pesos final e inicial dos tubos (balança com 0,0001 g de precisão). O pH do meio foi determinado com o uso de um eletrodo de vidro (HM – 7B, TOA, Japan).

## 2.7 Análises estatísticas

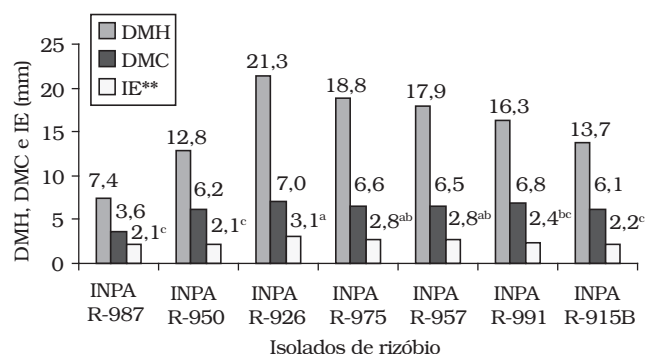
Para detectar diferenças nos valores médios dos tratamentos arranjados ao acaso, os dados obtidos de três repetições foram submetidos à análise de variância e ao teste de Tukey, usando-se o Sistema de Análise Estatística – ESTAT 2,0. Determinaram-se, ainda, as correlações de Pearson entre as variáveis pH final do meio, proteína extracelular, biomassa celular, diâmetros médios do halo (DMH) e da colônia (DMC), índice enzimático (IE) e atividade amilolítica das bactérias selecionadas. As análises de correlação foram processadas no programa Estatística (StatSoft; Tulsa, USA).

## 3 Resultados e discussão

Para considerar um microrganismo como um bom produtor de enzimas extracelulares em meio sólido, LEALEM e GASHE<sup>18</sup> indicam um índice enzimático (IE)  $\geq 2,0$ . Nesse experimento, dos 19 isolados com atividade amilolítica em meio YMA modificado (dados não mostrados), sete (36,8%) exibiram IE  $\geq 2,1$  (Figura 2), o que permite considerá-los como bons produtores de amilase. Comparativamente, os “IE” apresentados pelas bactérias INPA R-987, R-950 e R-915B foram significativamente inferiores aos mostrados por INPA R-926, R-975 e R-957 (Figura 2). Entre as que mostraram maiores “IE”, apenas INPA R-991 foi isolada dos nódulos da soja.

A habilidade de rizóbios em degradar amido tem sido discutida em alguns trabalhos. Estudos como os de BERTHELOT

e DELMOTTE<sup>5</sup>, SINGH e SINGH<sup>30</sup> e VAN SPRONSEN et al.<sup>37</sup> sugerem uma possível participação de algumas glicosidases, como as amilases, no estabelecimento intracelular da simbiose leguminosa versus rizóbia. Esse é o primeiro relato da ocorrência da enzima amilase em rizóbios nativos da Amazônia Central.



**Figura 2.** Rizóbios amilolíticos que exibiram índice enzimático (IE) superior a 2,1 em meio YMA modificado. \* Os valores “IE” representam a relação entre o diâmetro médio do halo de hidrólise (DMH) e o diâmetro médio da colônia (DMC). Médias de três repetições. \*\* Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si ( $p < 0,01$ ). DMS (Tukey) = 0,45; CV = 6,8%.

A produção de amilase, proteína extracelular e a taxa de crescimento dos isolados INPA R-926, R-950, R-957 e R-991 foram investigadas em meio YM modificado, contendo farinha de pupunha como substrato. Excetuando-se o isolado INPA R-991 que elevou o pH final, os demais acidificaram o meio



de cultivo. Os isolados INPA R-957 e R-975 foram os que mais reduziram o pH, com valor médio de 1,6 ponto (Tabela 2). A alteração do pH do meio de crescimento é um importante parâmetro fisiológico numa classificação preliminar dos rizóbios. Por exibirem crescimento rápido em meio YMA com azul de bromotimol (dois a cinco dias) e terem causado reação ácida nos meios líquido e sólido (coloração amarela), os isolados INPA R-926, R-957 e R-975 provavelmente pertençam ao gênero *Rhizobium*<sup>16</sup>. Ao contrário, *Bradyrhizobium* pode ser o gênero do qual faz parte o INPA R-991, pois, além de apresentar crescimento relativamente lento (cinco a sete dias), elevou o pH do meio líquido e alcalinizou o meio sólido (coloração azul), características fisiológicas comuns para esse táxon<sup>15,21,36</sup>.

Indiretamente, a dosagem protéica evidenciou que as bactérias possuem capacidades distintas em secretar proteína no meio de cultura. Nesse estudo, os isolados INPA R-975 e R-991 foram os que mais se destacaram quanto a essa habilidade (Tabela 2).

Apesar dos isolados INPA R-957 e R-975 terem apresentado as maiores produções de biomassa (Tabela 2), esses valores ficaram abaixo dos resultados de um cultivo em garrafão de *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaeoli*, que, após 29 horas de cultivo, alcançou uma biomassa celular de 4,0 g.L<sup>-1</sup><sup>36</sup>. A biomassa de 0,73 g.L<sup>-1</sup> atingida pelo isolado INPA R-991 também foi inferior à anotada para *Bradyrhizobium japonicum*. Nesse estudo, em 72 horas de cultivo, URENHA et al.<sup>36</sup> observaram uma produção de biomassa de quase 1,7 g.L<sup>-1</sup>. Vale a pena mencionar que, nesse experimento, a fonte de carbono usada foi o glicerol, considerado um das preferências para a produção de biomassa por essa bactéria.

De acordo com os dados das Tabelas 2 e 3, os resultados de biomassa obtidos nesse estudo não estão necessariamente associados aos conteúdos protéicos dos isolados, uma vez que, em termos comparativos, o INPA R-957, terceiro em conteúdo protéico extracelular, foi o que mais produziu biomassa celular. O mesmo comportamento, porém inverso, foi registrado para

o INPA R-926, que apresentou a terceira maior biomassa e o menor teor de proteína extracelular. Por outro lado, a bactéria INPA R-991 isolada da soja, apresentou os menores níveis protéicos e de biomassa no meio YM modificado (Tabela 2).

A atividade amilolítica variou de 0,31 a 1,00 U.min<sup>-1</sup>.mL<sup>-1</sup>, resultando em diferenças significativas entre as bactérias investigadas. Os isolados INPA R-975 e R-926 apresentaram, respectivamente, a maior e a menor média de atividade (Tabela 2). Por falta de estudos envolvendo a produção de amilases por rizóbios, principalmente nas condições experimentais avaliadas, é difícil estabelecer comparações, sobretudo dentro do mesmo grupo microbiano.

Segundo PANDEY et al.<sup>26</sup>, o gênero *Bacillus* é considerado a principal fonte de amilases microbianas. Comparativamente, a atividade de 1,00 U mostrada pelo isolado INPA R-957 é inferior à registrada para algumas espécies de *Bacillus*, como *B. subtilis*<sup>29</sup> e *B. licheniformis* SPT 27 [1], que produziram, em meios e condições otimizados, 535 e 252 U, respectivamente; porém, superior a de outras bactérias, como *B. coagulans* e *B. circulans*<sup>2</sup>, *Aeromonas* e *Pseudomonas*<sup>35</sup>, que produziram abaixo desse nível.

Os coeficientes de correlação de Pearson revelaram seis correlações significativas, das quais cinco foram positivas e uma negativa (Tabela 3). Ainda que alguns autores tenham documentado a existência de correlação positiva e linearmente significativa entre proteína extracelular e atividade amilolítica de alguns fungos<sup>24</sup> e bactérias<sup>17</sup>, essa não ocorreu quando se avaliaram conjuntamente os isolados. Porém, excluindo-se da análise o INPA R-926, estabeleceu-se uma relação altamente significativa ( $r = 0,85$ ;  $p < 0,01$ ). Portanto, é provável que, no sobrenadante enzimático dessa bactéria, possam estar presentes, além de amilase, outras substâncias ou mesmo enzimas que podem estar inibindo a atividade amilolítica. Embora não tenha diferido significativamente da atividade das amilases produzida pelos isolados INPA R-975 e R-991, o R-926 apresentou a menor atividade enzimática (Tabela 3).

**Tabela 2.** Biomassa celular, proteína extracelular e produção de amilase por rizóbios em meio YM modificado (extrato de levedura + farinha de pupunha). Médias de três repetições<sup>1</sup>.

Isolados	pH inicial	pH final	Proteína extracelular <sup>2</sup> (mg.mL <sup>-1</sup> )	Biomassa celular <sup>3</sup> (g.L <sup>-1</sup> )	Atividade <sup>4</sup> (mL <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> )
INPA R-926	6,8	6,3	24,2 <sup>a</sup>	1,13 <sup>c</sup>	0,31 <sup>b</sup>
INPA R-957	6,8	5,2	13,2 <sup>b</sup>	1,60 <sup>a</sup>	1,00 <sup>a</sup>
INPA R-975	6,8	5,2	9,8 <sup>c</sup>	1,33 <sup>b</sup>	0,51 <sup>b</sup>
INPA R-991	6,8	6,9	9,0 <sup>d</sup>	0,73 <sup>d</sup>	0,54 <sup>b</sup>

<sup>1</sup>Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si ( $p < 0,01$ ); <sup>2</sup>DMS (Tukey) = 0,60; CV = 1,6%; <sup>3</sup>DMS (Tukey) = 0,13; CV = 4,2%; e <sup>4</sup>DMS (Tukey) = 0,40; CV = 35,8%.

**Tabela 3.** Análises dos coeficientes de correlação de Pearson entre as variáveis pH do meio, proteína extracelular, biomassa celular, diâmetros médio do halo (DMH) e da colônia (DMC), índice enzimático (IE) e atividade amilolítica<sup>8</sup> de rizóbios nativos da Amazônia Central.

Variáveis	pH	Proteína extracelular	Biomassa celular	DMH	DMC	IE	Atividade amilolítica
pH	1,00	-	-	-	-	-	-
Proteína extracelular	0,16 <sup>NS</sup>	1,00	-	-	-	-	-
Biomassa celular	-0,93 <sup>**</sup>	0,10 <sup>NS</sup>	1,00	-	-	-	-
DMH	-0,42 <sup>NS</sup>	0,55 <sup>*</sup>	0,54 <sup>*</sup>	1,00	-	-	-
DMC	-0,16 <sup>NS</sup>	0,11 <sup>NS</sup>	0,17 <sup>NS</sup>	0,27 <sup>NS</sup>	1,00	-	-
IE	-0,38 <sup>NS</sup>	0,52 <sup>*</sup>	0,48 <sup>NS</sup>	0,86 <sup>**</sup>	-0,26 <sup>NS</sup>	1,00	-
Atividade amilolítica	-0,46 <sup>NS</sup>	-0,35 <sup>NS</sup>	0,55 <sup>*</sup>	-0,05 <sup>NS</sup>	0,25 <sup>NS</sup>	-0,18 <sup>NS</sup>	1,00

<sup>8</sup>N (Número de observações) = 12; NS = Não significativo; \* e \*\* Significativos ( $p < 0,05$  e  $p < 0,01$ , respectivamente).

A proteína extracelular foi correlacionada também com o índice enzimático (IE,  $r = 0,52$ ;  $p < 0,05$ ) e diâmetro médio do halo (DMH,  $r = 0,55$ ;  $p < 0,05$ ), indicando que parte das proteínas extracelulares secretadas possui atividade amilolítica. Neste trabalho, o registro de uma forte correlação entre “IE” e “DMH” ( $r = 0,86$ ;  $p < 0,01$ ) confirma relatos anteriores<sup>18,32</sup>. Contudo, vale mencionar que, apesar da estreita relação entre as variáveis “DMH” e “IE”, elas não estão significativamente relacionadas com o diâmetro médio da colônia (DMC) (Tabela 3). Similarmente, não houve correlação significativa entre atividade enzimática, “DMH”, “DMC” e “IE” (Tabela 3). Quando se excluem da análise os isolados INPA R-926 e R-975, observa-se uma correlação positiva e significativa entre atividade enzimática e “DMH” ( $r = 0,79$ ;  $p < 0,05$ ). Essa relação também tem sido anotada para a endopoligalacturonase do fungo *Peacilomyces clavisporus*<sup>31</sup>.

A biomassa celular estabeleceu correlação significativa com a atividade amilolítica ( $r = 0,55$ ;  $p < 0,05$ ) e negativa com o pH final do meio ( $r = 0,93$ ;  $p < 0,01$ ). A correlação inversa entre a biomassa celular e o pH do meio (Tabela 3), além de ser esperada, confirma os estudos de BALLATTI<sup>4</sup>, segundo os quais, o pH exerce uma forte influência na produção de biomassa de rizóbios, e que essa influência é dependente das estirpes estudadas. A correlação da biomassa celular com atividade enzimática da amilase registrada neste estudo foi igualmente constatada por STAMFORD et al.<sup>33</sup> em *Nocardiopsis* sp., FOSSI et al.<sup>9</sup> em leveduras, e por HAQ et al.<sup>13</sup> em *Bacillus licheniformis*.

## 4 Conclusões

- Os isolados de rizóbio INPA R-991, R-957, R-975 e R-926 são considerados bons produtores de amilase extracelular em meio YMA modificado;
- A farinha de pupunha estimulou a maior produção de biomassa dos isolados INPA R-957 e R-975, com o INPA-R-957 também se destacando como maior produtor de amilase;
- A atividade amilolítica das bactérias está positivamente associada com a produção de biomassa;
- As análises de correlação conjunta dos dados não revelaram associações significativas entre diâmetro médio do halo e proteína extracelular com a produção de amilase das bactérias investigadas.

## Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) – (Processo: 474007/2003-0), pela concessão de recursos financeiros à realização desse trabalho. O primeiro autor mostra-se grato, também, à Superintendência da Zona Franca de Manaus (Suframa), pela concessão da bolsa de doutorado.

## Referências bibliográficas

1. AIYER, P. V. Effect of C:N ratio on alpha amylase production by *Bacillus licheniformis* SPT 27. **Afr. J. Biotechnol.**, v. 3, n. 10, p. 519-522, 2004.

2. AJAYI, A. O.; FAGADE, O. E. Utilization of corn starch as substrate for  $\beta$ -amylase by *Bacillus* spp. **Afr. J. Biomed. Res.**, v. 6, n. 1, p. 37-42, 2003.
3. ANDRADE, J. S. Agregação de valor e conservação das matérias-primas regionais. In: **Prêmio Professor Samuel Benchimol**. Manaus. Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio – MDIC e Secretaria de Tecnologia Industrial – STI, 2004. Cap. 6, p. 178-188. Brasil.
4. BALATTI, A. P. **Producción de Inoculantes para Leguminosas**. 1ª. edição. La Pampa: Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad Nacional de La Pampa, 1992. Argentina.
5. BERTHELOT, K.; Delmotte, F.M. Purification and Characterization of an  $\alpha$ -Glucosidase from *Rhizobium* sp. (*Robinia pseudoacacia* L.) Strain USDA 4280. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 65, n. 7, p. 2907-2911, 1999.
6. BUZZINI, P.; MARTINI, A. Extracellular enzymatic activity profiles in yeast and yeast-like strains isolated from tropical environments. **J. Appl. Microbiol.**, v. 93, n. 6, p. 1020-1025, 2002.
7. CLEMENT, C. R. The peijibaye: a domesticated tree. **Ciência Hoje**. Special Edition: Amazonia, 1991. p. 43-47.
8. CLEMENT, C. R.; Santos, L. A. Pupunha no mercado de Manaus: Preferências de consumidores e suas implicações. **Rev. Bras. Frutic.**, v. 24, n. 3, p. 778-779, 2002.
9. FOSSI, B. T.; TAVEA, F.; NDJOUENKEU, R. Production and partial characterization of a thermostable amylase from ascomycetes yeast strain isolated from starchy soils. **Afr. J. Biotechnol.**, v. 4, n. 1, p. 14-18, 2005.
10. GOIA, C. H.; ANDRADE, J. S.; ARAGÃO, C. G. Composição química da farinha de pupunha. **Rev. Quím. Ind.**, v. 2, n. 2, p. 48-54, 1993.
11. GORNALL, A. G.; BARDAWILL, C. J.; DAVID, M. M. Determination of serum proteins by mean of biuret reaction. **J. Biol. Chem.**, v. 177, n. 1, p. 751-756, 1949.
12. HAQ, I.; ASHRAF, S.; OMAR, S.; QADEER, M. A. Biosynthesis of Amyloglucosidase by *Aspergillus niger* using wheat bran as substrate. **Pak. J. Biol. Sci.**, v. 5, n. 9, p. 962-964, 2002.
13. HAQ, I.; ASHRAF, H.; QADEER, M. A.; IQBAL, J. Pearl millet, a source of alpha amylase production by *Bacillus licheniformis*. **Bioresour. Technol.**, v. 96, n. 10, p. 1201-1204, 2005.
14. HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. L. The use of solid media for detection of enzymes production by fungi. **Mycologia**, v. 67, n. 3, p. 597-607, 1975.
15. HUNGRIA, M. Coleta de nódulos e isolamento de rizóbio. In: HUNGRIA, M.; ARAÚJO, R. S. (Ed.). **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Brasília: Embrapa, 1994. Cap. 2, p. 45-61.
16. JORDAN, D. C. FAMILY III, Rhizobiaceae Conn 1938. In: KRIEG, N. R.; HOLT, J. G. (Ed.). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1984. p. 234-244.
17. KIRAN, O.; ÇÖMLEKÇİOĞLU, U.; ARIKAN, B. Effects of carbon sources and various chemicals on the production of a novel amylase from a Thermophilic *Bacillus* sp. K-12. **Turk J. Biol.**, v. 29, n. 2, p. 99-103, 2005.
18. LEALEM, F.; GASHE, B. A. Amylase production by a gram-positive bacterium isolated from fermenting tef (*Eraglostis tef*). **J. Appl. Bacteriol.**, v. 77, n. 1, p. 348-352, 1994.
19. LIN, J. E.; CHANG, D. C. N.; SHEN, G. J. Correlations among several screening method used for identifying wood-decay fungi that can degrade toxic chemicals. **Biotechniques**, v. 5, n. 4, p. 275-280, 1991.

20. LIN, L. L.; HSU, W. H.; CHU, W. S. A gene encoding for an  $\alpha$ -amylase from thermophilic *Bacillus* sp. Strain TS-23 and its expression in *Escherichia coli*. **J. Appl. Microbiol.**, v. 82, n. 3, p. 325-334, 1997.
21. MOREIRA, F. M. S.; GILLIS, M.; POT, B.; KERSKERS, K.; FRANCO, A. A. Characterization of rhizobia isolated from different divergence groups of tropical leguminosae by comparative polyacrylamide gel electrophoresis of their total proteins. **Syst. Appl. Microbiol.**, v. 17, n. 1, p. 135-146, 1993.
22. MORA-URPI, J. Diversidad genética en pejiabaye [*Bactris (Guilielma) gasipaes* Kunth]: Origen y domesticación. In: IV CONGRESO SOBRE BIOLOGIA, AGRONOMIA E INDUSTRIALIZACIÓN DEL PIJUAYO, 1993. **Resumo expandido...** Iquitos, 1993. p. 21-29.
23. NELSON, N. A fotometric adaptation of Somogyi method for a determination of glucose. **J. Biol. Chem.**, v. 153, n. 1, p. 375-380, 1944.
24. OLAMA, Z. A.; SABRY, S. A. Extracellular amylase synthesis by *Aspergillus flavus* and *Penicillium purpurescence*. **J. Islam. Acad. Sci.**, v. 2, n. 4, p. 272-276, 1989.
25. OLIVEIRA, L. A. **Competitive ability of *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli strains**. 1988. 125p. Thesis (Ph. D in Soil Microbiology), University of Minnesota, United State of American.
26. PANDEY, A.; NIGAM, P.; SOCCOL, C. R.; SOCCOL, V. T.; SINGH, D.; MOHAN, R. Advances in microbial amylases. **Biotechnol. Appl. Biochem.**, v. 31, n. 2, p. 135-152, 2000.
27. RAMESH, B.; REDDY, P. R. M.; SEENAYYA, G.; REDDY, G. Effect of various flours on the production of thermostable  $\beta$ -amylase and pullulanase by *Clostridium thermosulfurogenes* SV2. **Bioresour. Technol.**, v. 76, n. 2, p. 169-171, 2001.
28. REDDY, N. S.; NIMMAGADDA, A.; RAO, K. R. S. S. An overview of the microbial  $\alpha$ -amylase family. **Afr. J. Biotechnol.**, v. 2, n. 12, p. 645-648, 2003.
29. RIAZ, N.; HAQ, I.; QADEER, M. A. Characterization of  $\alpha$ -amylase by *Bacillus subtilis*. **Int. J. Agr. Biol.**, v. 5, n. 3, p. 249-252, 2003.
30. SINGH, A. P.; SINGH, J. B. Differences in  $\alpha$  and  $\beta$ -glucosidase and  $\beta$ -galactosidase activity among fast and slow-growing species of *Rhizobium* and *Agrobacterium tumefaciens*. **Microbios**, v. 43, n. 2, p. 169-176, 1985.
31. SOUZA, J. V. B.; SILVA, E. S.; MAIA, M. L. S.; TEIXEIRA, M. F. S. Screening of fungal strains for pectinolytic activity: endopolygalacturonase production by *Peacilomyces clavissporus* 2A. UMIDA. 1. **Process Biochem.**, v. 39, n. 4, p. 455-458, 2003.
32. STAMFORD, T. L. M.; ARAÚJO, J. M.; STAMFORD, N. P. Atividade enzimática de microrganismos isolados do jacatupé (*Pachyrhizus erosus* L. Urban). **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 18, n. 4, p. 382-385, 1998.
33. STAMFORD, T. L. M.; STAMFORD, N. P.; COELHO, L. C. B. B.; ARAÚJO, J. M. Production and characterization of a thermostable  $\alpha$ -amylase from *Nocardiopsis* sp. endophyte of yam bean. **Bioresour. Technol.**, v. 76, n. 2, p. 137-141, 2001.
34. STRAUSS, M. L. A.; JOLLY, N. P.; LAMBRECHIS, M. G.; VAN RENSBURG, P. Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by non-Saccharomyces wine yeasts. **J. Appl. Microbiol.**, v. 91, n. 1, p. 182-190, 2001.
35. SUGITA, H.; KAWASAKI, J.; DEGUCHI, Y. Production of amylase by the intestinal microflora in cultured freshwater fish. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 24, n. 2, p. 105-108, 1997.
36. URENHA, L. C.; PRADELLA, J. G. C.; OLIVEIRA, M. S. O.; BONOMI, A. Produção de biomassa celular de rizóbio. In: Hungria, M.; Araújo, R. S. (Ed.). **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Brasília: Embrapa, 1994. Cap. 4, p. 95-137.
37. VAN SPRONSEN, P. C.; BAKHUISEN, R.; VAN BRUSSEL, A. A. N.; KIJNE, J. W. Cell wall degradation during infection thread formation by the root nodule bacterium *Rhizobium leguminosarum* is a two-step process. **Eur. J. Cell Biol.**, v. 64, n. 1, p. 88-94, 1994.
38. VINCENT, J. M. **A manual for the practical study of root-nodules bacteria**. Oxford: Brackwell Scientific Publications, 1970.
39. YUYAMA, L. K.; AGUIAR, J. P.; YUYAMA, K.; CLEMENT, C. R.; MACEDO, S. H.; FAVARO, D. I.; AFONSO, C.; VASCONCELLOS, M. B.; PIMENTEL, S. A.; BADOLATO, E. S.; VANNUCCHI, H. Chemical composition of the fruit mesocarp of three peach palm (*Bactris gasipaes*) populations grown in central Amazonia, Brazil. **Int. J. Food Sci. Nutr.**, v. 54, n. 1, p. 49-56, 2003.