

PRODUÇÃO DE α -AMILASE E AÇÚCARES NO CULTIVO DE *Bacillus subtilis* EM AMIDO DE MANDIOCA.

Luan da Palma Santos¹; Ernesto Acosta Martinez², Jéssica Passos Carneiro³

1. Bolsista PIBITI/UEFS, Graduando em Engenharia de Alimentos, UEFS, e-mail: luan-palma@hotmail.com
2. Orientador, Departamento de Tecnologia, UEFS, e-mail: ernesto.amartinez@yahoo.com.br
3. Participante do projeto, Graduanda em Engenharia de Alimentos, UEFS, e-mail: je-passos@hotmail.com

PALAVRAS-CHAVE: Amido de mandioca *Bacillus subtilis*, α -amilases.

INTRODUÇÃO

O amido é um carboidrato sendo o principal componente de muitos grãos de leguminosas, representa 70 a 80% da composição dos grãos de cereais e está presente nas raízes e nos tubérculos. É bastante abundante na natureza, só competindo em quantidade com a celulose. O amido é um polissacarídeo heterogêneo, composto de dois polímeros de glicose: a amilase e a amilopectina, que são arranjadas num grânulo de tamanho particular relativamente insolúvel em água (FRENCH, 1973; GUILBOT & MERCIER, 1985). Devido a suas propriedades físico-químicas e funcionais exclusivas, este carboidrato tem grande importância nos mais diversos setores industriais. Pode ser utilizado na sua forma natural ou pode, através de processamentos, dar origem a produtos como amidos modificados, xaropes de glicose, maltose ou frutose e maltodextrinas (FRANCO *et al.*, 2001; SANABRIA, 2010).

A mandioca (*Manihot esculenta*, Crantz) é uma planta heliófila, perene, arbustiva, pertencente à família *Euphorbiaceae*. É bem tolerante a seca e possui ampla adaptação as mais variadas condições de clima e solo. A parte mais importante da planta são as raízes tuberosas, ricas em amido, que são utilizadas na alimentação humana e animal ou como matéria-prima para diversas indústrias (LORENZI, DIAS, 1993).

O processo de hidrólise pode ser feito de forma ácida ou enzimática, sendo a última a que apresenta maiores vantagens. Esta hidrólise é desenvolvida pelas enzimas α -amilases e glicoamilases, que podem ser de origem animal, vegetal ou microbiana (SANTANA, 2007; KOBLITZ, 2010). Entre os microrganismos produtores destacam-se as bactérias, especialmente as do gênero *Bacillus* (KONSUOLA, LIKOPOULOU-KYRIAKIDES, 2006; RAJAGOLAPAN, KRISHNAN, 2007). As vantagens do uso de *B. subtilis* é a rápida e facilidade de crescimento, alta capacidade de secreção e além de não serem patogênicos, sendo assim considerados GRAS (Geralmente considerado como seguro) (MOUNTAIN, 1989)

Inicialmente, a ação dessas enzimas sobre o amido é rápida uma vez que elas apresentam muito maior atividade sobre substratos de alta massa molecular, gerando uma mistura de oligossacarídeos de diferentes pesos moleculares, chamada dextrina ou maltodextrina. Em maiores tempos de reação, α -amilases são capazes de produzir glicose e maltose a partir de amilose e dextrina α -limites, a partir de amilopectina (KLOBITZ, 2010).

Esta pesquisa, cujo tema é Produção de α -amilase e açúcares no cultivo de *Bacillus subtilis* em amido de mandioca, têm como objetivo analisar a produção das enzimas α -amilases e amiloglicosidade e açúcares pela fermentação do amido da mandioca pela bactéria *Bacillus subtilis*.

MATERIAIS E MÉTODOS

A cepa utilizada foi *Bacillus subtilis* S499 BH7. Inicialmente foi realizado o cultivo do microrganismo. Foi preparada uma solução de Agar de extrato de malte colocando sobre aquecimento a 70°C e agitando até dissolução completa em água, feito isso, 12 tubos de

ensaio foram adicionados com 8 mL de solução de agar de extrato de malte e depois estes foram esterilizados em autoclave nas condições de 121°C (1 atm) durante 15 minutos.

Posteriormente, para a obtenção de estoque de bactérias, foram realizados repiques dos microrganismos. Esse procedimento foi realizado em câmara laminar e os tubos foram incubados em estufa a 30°C por 24 horas.

Foram preparadas soluções estoque de cada nutriente com concentração de 50g/L, sendo assim calculou-se a massa para preparar soluções de 50 mL de: peptona, extrato de carne, cloreto de sódio e extrato de levedura. Preparadas as soluções, estas foram colocadas em frascos Erlenmeyer de 125 mL que foram posteriormente esterilizados.

A concentração celular foi obtida mediante curva de calibração (peso seco x absorbância) preparada com células cultivadas em meio sintético. Na câmara laminar, os microrganismos foram raspados do tubo de ensaio e inseridos no frasco Erlenmeyer de 300 mL os quais foram colocados em um shaker com agitação de 200 rpm, 30°C durante 24 horas (Figura 1).

Após as 24 horas de crescimento, a suspensão de células foi submetida à centrifugação em tubos de centrifuga de capacidade de 15 mL, realizando a separação do nutriente residual. A massa células foi dissolvida em 10 mL de água destilada e esterilizada sendo preparadas diluições (1:100, 1:200, 1:400, 1:500, 1:2000) para realizar a medição da absorbância em triplicata no espectrofotômetro Genesys 10 uv em comprimento de onda de 660nm .



Figura 1. Processo de crescimento de *Bacillus subtilis* em frascos Erlenmeyer com agitação de 200 rpm, 30°C, durante 24 horas.

Para a determinação do peso seco, colocou-se 1 mL da mesma solução de bactérias em 3 cadinhos de porcelana os quais foram colocados em estufa à 105 °C até peso constante (24 h).

As hidrólises foram realizadas utilizando soluções de fécula de mandioca (60g/L). A gelatinização do amido foi realizada na temperatura de 80°C durante 30 minutos. Os ensaios foram realizados frascos Erlenmeyer, dois em pH regulado para 7,0 e dois para 5,0. Cada frasco com pH diferente, foi adicionado de 0,5 mL e 0,2 mL da cultura de *Bacillus subtilis* previamente preparada. Os frascos foram mantidos em agitação constante de 200 rpm a 30°C em um agitador rotatório Incubadora Tecnal. Amostras foram retiradas em tempos de 12, 24, 36, 48 e 60 h e logo em seguida o sobrenadante foi submetido às análises.

Foi determinado o pH; o teor de sólidos solúveis (°Brix) com refratômetro assim como a concentração de açúcares redutores pelo método de Nelson (NELSON, 1944) ao longo do processo de hidrólise.

RESULTADO E DISCUSSÃO

Na Figura 2 apresenta-se um dos repiques de bactérias obtidos. Esses microrganismos foram utilizados nos ensaios de hidrólise.



Figura 2. Tubo de ensaio contendo meio de cultura após o repique de *Bacillus subtilis* após a incubação sobre condições de 24 horas e 30°C.

A Figura 3 apresenta a curva de calibração obtida para determinar a concentração de açúcares redutores expressado em glicose.

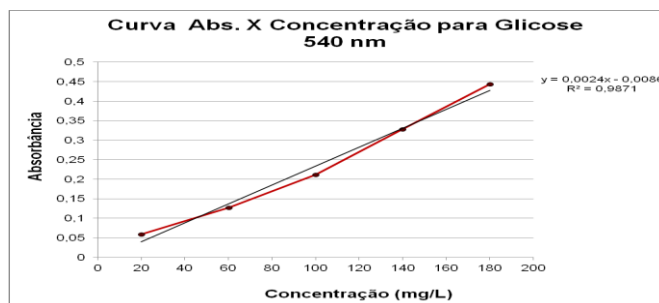


Figura 3. Curva absorbância X Concentração de glicose.

A relação entre a absorbância e a concentração de açúcares redutores pode ser apresentada pela equação 1:

$$C = (\text{Abs} + 0,0086) / 0,0024 \quad R^2 = 0,9831 \quad (1)$$

Onde: C: concentração de açúcares em g/L e Abs é a absorbância da solução de glicose.

O perfil de concentração de açúcares redutores em função do pH e da concentração inicial de células durante o processo de hidrólise de fécula de mandioca por *B. subtilis* é apresentado na Figura 4. Verificam-se maiores valores de concentração de açúcares redutores (371 e 400 mg/L) nas condições de pH 7,0 e 5,0 e menor concentração inicial celular. Maiores concentrações de bactérias produziram hidrolisados contendo concentrações de açúcares redutores menores em 23,6% e 35,17% em pH 7,0 e 5,0, respectivamente. Por outro lado, com o uso de maiores concentrações celulares foi verificada uma perda da atividade enzimática a partir das 36 horas de fermentação independentemente do pH da solução.

Os valores de °Brix dos hidrolisados diminuíram de 3,8 a 3,3 e de 4,0 a 3,5 em pH 5,0 e 7,0, respectivamente com o aumento da concentração celular de 0,2 para 0,5 mL. Estes resultados estão relacionados com a produção de açúcares redutores.

Os valores de pH das soluções hidrolisadas atingiram valores ao redor do 4,0 após 60 h de hidrólise, independentemente das condições experimentais utilizadas.

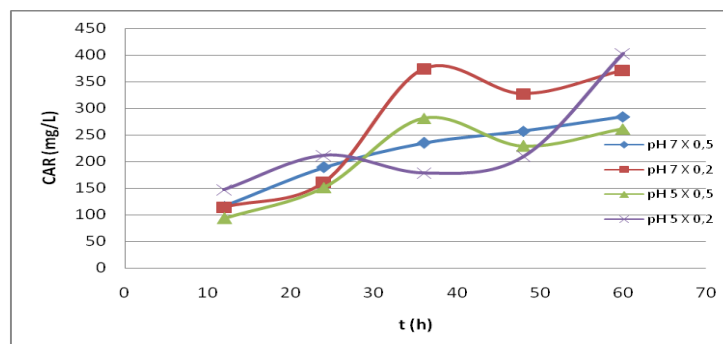


Figura 4. Perfil de concentração de açúcares redutores (CAR) obtido durante a hidrólise de fécula de mandioca por *Bacillus subtilis* em função do pH (7,0 e 5,0) e da concentração celular (0,2 e 0,5 mL).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O aumento na concentração inicial de bactéria na hidrólise de fécula de mandioca resultou na diminuição da produção de açúcares redutores. O uso de menor pH teve efeito positivo no aumento do processo de sacarificação o qual pode estar relacionado com a maior produção de enzimas α -amilase pela bactéria *Bacillus subtilis*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- FRANCO, C. M. L. et al. *Propriedades gerais do amido*. Coord. Marney Pascoli Cereda – Campinas: Fundação Cargill, 2001, v.1, p.:i1 – Série Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas.
- FRENCH, D. 1973. Chemical and physical properties of starch. *Journal of Animal Science*, v.37, n.4, p.1048-1061.
- GUILBOT, A., MERCIER, C. 1985. Starch. In: ASPINALL, G.D. The polysaccharides. New York: Academic Press, 3. p.229-285.
- KOBLITZ, M. G. B. *Bioquímica de Alimentos: Teoria e aplicações praticas*. Rio de Janeiro. RJ: Guanabara Koogan, 2010.
- KONSUOLA, Z.; LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES, M. Starch hydrolysis by the action of an entrapped in alginate capsules α -amylase from *Bacillus subtilis*. *Process Biochemistry*, v.41, p.343-349, 2006.
- KONSUOLA, Z.; LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES, M. Co-production of α -amylase and β -galactosidase by *Bacillus subtilis* in complex organic substrates. *Bioresource Technology*, v.98, p.150-157, 2007.
- LORENZI, J. O. DIAS, C. C. A. *Cultura da mandioca*. Campinas-SP: CATI, 1993. p.41.
- NELSON, N. A. Photometric adaptation of the somogy method for determination of glucose. *Journal Biology Chemistry*, v.153, p.357, 1944.
- RAJAGOLAPAN, G.; KRISHNAN, C. α -Amylase production from catabolite derepresse *Bacillus subtilis* KCC103 utilizing sugarcane bagasse hydrolysate. *Bioresource Technology*, v.99, p.3044-3050, 2008.
- SANABRIA, G. G. R. *Propriedades físico-químicas do amido isolado, estudo de parâmetros enzimáticos durante o armazenamento e caracterização de enzimas amilolíticas em raízes de maca (*Lepidium meyenii* Walp)* 2010, 115p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP, São Paulo, 2011
- SANTANA, N. B. *Eficiência da hidrólise de amido de mandioca por diferentes fontes de enzimas e rendimento da fermentação alcoólica para produção de etanol*. M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, Out., 2007.