

Quantificação de amilases produzidas por rizobactérias amazônicas em meio de cultura contendo farinha do mesocarpo de babaçu (*Orbignya phalerata* Mart.) como fonte de nutrientes

Quantification of amylases produced by Amazonian rhizobacteria in culture medium containing babassu mesocarp flour (*Orbignya phalerata* Mart.) as a source of nutrients

Cuantificación de amilasas producidas por rizobacterias amazónicas en medio de cultivo que contiene harina de mesocarpio de babasú (*Orbignya phalerata* Mart.) como fuente de nutrientes

Recebido: 21/02/2022 | Revisado: 01/03/2022 | Aceito: 25/03/2022 | Publicado: 31/03/2022

Thaíssa Cunha de Oliveira

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3124-8124>
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Brasil
E-mail: thaissa.olcunha@gmail.com

Cassiane Minelli-Oliveira

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4827-9955>
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Brasil
E-mail: cassymineilli@gmail.com

Nadionara Costa Menezes

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9716-0822>
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Brasil
nadionaracosta@gmail.com

Suziane Pinto Rodrigues

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5991-7716>
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Brasil
E-mail: rodrigues.suzi1996@gmail.com

José Carlos Ipuchima da Silva

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3628-7985>
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Brasil
E-mail: carlos.silva.jcids@gmail.com

Luiz Antonio de Oliveira

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2008-7292>
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Brasil
E-mail: luiz.oliveira@inpa.gov.br

Resumo

O mesocarpo do babaçu apresenta elevado teor de amido, que não é aproveitado biotecnologicamente na Amazônia. A obtenção de rizobactérias capazes de converter esse amido em glicose pode fortalecer a cadeia produtiva dessa palmeira, colocando-a como uma das espécies vegetais a contribuir com a bioeconomia amazônica. Esse trabalho avaliou o efeito dos pHs 4,0, 5,0, 6,0 e 7,0 e das temperaturas de 27 °C e 55 °C na capacidade de cinco rizobactérias amazônicas produzirem glicose usando o mesocarpo do babaçu. As rizobactérias INPA R015, INPA R028, INPA R034, INPA R 236 e INPA R269 converteram o amido em glicose em todos os pHs e temperaturas testados. A presença da atividade amilolítica na temperatura de 55 °C mostra que elas podem ser usadas em processos industriais sob altas temperaturas, quando há menos possibilidade de contaminação por microrganismos mesofílicos. Houve influência significativa do pH dos meios e das temperaturas de incubação na produção de glicose, que variou de 3,02-8,66 g.L⁻¹, com a menor ocorrendo 24 horas após o início de experimento usando a INPA R269 na temperatura de 27 °C e pH 5,0 e, a maior, com essa mesma bactéria e temperatura, mas no meio com pH 7,0 após 96 horas de incubação. A presença de glicose nos meios indica que essas cinco rizobactérias mostram potencial para serem usadas para fins biotecnológicos usando a farinha de babaçu para seus crescimentos, fortalecendo a cadeia produtiva dessa palmeira pouco usada na Amazônia. Novos estudos são necessários, como por exemplo, se misturas com essas rizobactérias possibilitam maior produção de glicose do que as produções de cada uma delas individualmente.

Palavras-chave: Metabolismo bacteriano; Microbiota amazônica; Atividade enzimática.

Abstract

The babassu mesocarp has a high content of starch, which is not used biotechnologically in the Amazon. Obtaining rhizobacteria capable of converting this starch into glucose can strengthen the production chain of this palm, placing it as one of the plant species to contribute to the Amazon bioeconomy. This work evaluated the effect of pH 4.0, 5.0, 6.0

and 7.0 and temperatures of 27 °C and 55 °C on the ability of five Amazonian rhizobacteria to produce glucose using the babassu mesocarp. Rhizobacteria INPA R015, INPA R028, INPA R034, INPA R 236 and INPA R269 converted starch to glucose at all tested pHs and temperatures. The presence of amylolytic activity at a temperature of 55 °C shows that they can be used in industrial processes at high temperatures, when there is less possibility of contamination by mesophilic microorganisms. There was a significant influence of media pH and incubation temperatures on glucose production, which ranged from 3.02 to 8.66 gL⁻¹, with the lowest occurring 24 hours after the beginning of the experiment using INPA R269 at a temperature of 27 °C and pH 5.0 and, the highest, with the same bacteria and temperature, but in the medium with pH 7.0 after 96 hours of incubation. The presence of glucose in the media indicates that these five rhizobacteria show potential to be used for biotechnological purposes using babassu flour for their growth, strengthening the production chain of this palm tree that is little used in the Amazon. Further studies are needed, such as whether mixtures with these rhizobacteria allow greater production of glucose than the production of each one of them individually.

Keywords: Bacterial metabolism; Amazonian microbiota; Enzymatic activity.

Resumen

El mesocarpio de babasú tiene un alto contenido de almidón, que no se utiliza biotecnológicamente en la Amazonía. La obtención de rizobacterias capaces de convertir este almidón en glucosa puede fortalecer la cadena productiva de esta palma, ubicándola como una de las especies vegetales a contribuir con la bioeconomía amazónica. Este trabajo evaluó el efecto de pH 4.0, 5.0, 6.0 y 7.0 y temperaturas de 27 °C y 55 °C sobre la capacidad de cinco rizobacterias amazónicas para producir glucosa utilizando el mesocarpio de babasú. Las rizobacterias INPA R015, INPA R028, INPA R034, INPA R 236 e INPA R269 convirtieron el almidón en glucosa en todos los pH y temperaturas probados. La presencia de actividad amilolítica a una temperatura de 55 °C demuestra que pueden ser utilizados en procesos industriales a altas temperaturas, cuando existe menor posibilidad de contaminación por microorganismos mesófilos. Hubo una influencia significativa del pH del medio y las temperaturas de incubación en la producción de glucosa, que varió de 3,02 a 8,66 gL⁻¹, ocurriendo el mínimo a las 24 horas del inicio del experimento utilizando INPA R269 a una temperatura de 27 °C y pH 5,0 y, el más alto, con las mismas bacterias y temperatura, pero en el medio con pH 7,0 después de 96 horas de incubación. La presencia de glucosa en los medios indica que estas cinco rizobacterias muestran potencial para ser utilizadas con fines biotecnológicos utilizando harina de babasú para su crecimiento, fortaleciendo la cadena productiva de esta palmera poco utilizada en la Amazonía. Son necesarios más estudios, como por ejemplo si las mezclas con estas rizobacterias permiten una mayor producción de glucosa que la producción de cada una de ellas individualmente.

Palabras clave: Metabolismo bacteriano; Microbiota amazónica; Actividad enzimática.

1 Introdução

A farinha do mesocarpo do fruto do babaçu (*Orbignya phalerata* Mart.) possui 63,5% de teor de amido (Cunha et al., 1980), mas estudos mais recentes indicam que esses valores variam de 50 % e 68,3 % de amido (Cruz, 2011) e pode servir para fins biotecnológicos mais valorizados do que o seu uso para alimentação animal e humana esporadicamente observada na Amazônia. Por apresentar uma cadeia produtiva ainda fragmentada e com baixo valor comercial, essa palmeira, bastante usada no Estado do Maranhão (Ayres Júnior, 2007), ainda não foi inserida na bioeconomia amazônica apesar de ser bastante conhecida.

Esse polissacarídeo é abundante na natureza, sendo encontrado principalmente em sementes de cereais como o milho, cevada, trigo, arroz e em tubérculos ou raízes como batata e mandioca. Possui longas cadeias de moléculas de glicose, retas e ramificadas ligadas entre si. Entretanto, apresenta o inconveniente de não ser diretamente fermentado pelas leveduras, necessitando de um processo de hidrólise preliminar, em que as amilases atuam nesse processo de quebra do amido (Giordano, 1992).

As indústrias alimentícias são as maiores consumidoras de amido. Entretanto, é usado também em diversos fins industriais como espessante, ligante ou estabilizante em diferentes segmentos da indústria de alimentos, indústrias têxteis, e em vários produtos da indústria papelreira, tendo aplicações ainda na indústria química, metalúrgica, plástica, lavanderias e, para a produção de etanol (Leonel & Cereda, 2002).

A conversão desse constituinte presente no mesocarpo do babaçu em glicose pode proporcionar inúmeras oportunidades biotecnológicas, enriquecendo a cadeia produtiva dessa palmeira na Amazônia, transformando-a em uma espécie de interesse industrial, haja vista sua pouca importância econômica atual.

Os microrganismos são fontes inesgotáveis de enzimas de importância econômica, como as amilases, encontradas com variações elevadas na natureza quanto às suas características bioquímicas (Reddy et al., 2003; Souza & Magalhães, 2010; Abdulaal et al., 2018; Bussa et al., 2019; Chapman et al., 2018; Ahmad et al., 2019; Angelia et al., 2019; Roth et al., 2019; Sweta et al., 2019; Santos et al., 2020).

Diversas rizobactérias amazônicas têm mostrado capacidade de degradar o amido (Oliveira et al., 2007 a,b, 2010, , Cauper et al., 2017; Minelli-Oliveira et al., 2019; 2020 a,b), bem como a farinha de babaçu (Costa et al., 2016) permitindo, assim, usá-las para essa finalidade usando a farinha do mesocarpo do babaçu.

Esse trabalho teve como objetivo, avaliar se o pH e a temperatura do meio influenciam a capacidade de seis rizobactérias em converterem a farinha do babaçu em glicose, permitindo assim, usar o mesocarpo dessa palmeira para fins biotecnológicos.

2 Metodologia

Para o planejamento, execução, coleta e análises dos dados foram usados os trabalhos de Koke (2011) e Pereira et al. (2018) como referências.

2.1 Extração de amido da farinha do mesocarpo de babaçu

Com o objetivo de reduzir a quantidade de fibras presentes na farinha do mesocarpo de babaçu, foi realizada uma extração de amido de acordo com Costa (2019) com modificações. Para isso, 15g de farinha de babaçu foram colocadas em erlenmeyer contendo 1000mL de água destilada. A solução foi deixada decantando por 24h a 4°C e em seguida foi processada em liquidificador na potência máxima por 3 minutos. Por fim, foi realizada uma filtração simples com algodão.

A filtragem com o algodão permitiu a eliminação da parte fibrosa da farinha do babaçu. Para isso, o algodão seco em estufa a 80°C foi pesado antes e após a filtração e seco em estufa a 80°C até atingir peso constante. Conhecendo o peso do algodão e a quantidade adicionada inicialmente, foi possível calcular quanto ficou retido pelo algodão e por diferença, conhecer a quantidade dissolvida na solução.

2.2 Cultivo em meio líquido

Para a determinação das melhores condições de cultivo em meio contendo babaçu foram selecionadas 5 rizobactérias que apresentaram os melhores crescimentos, bem como apresentaram a presença de amilases em estudos anteriores.

As rizobactérias foram inoculadas em erlenmeyers com 50 mL de meio de cultivo YM, deixadas sob agitação orbital a 150 rpm, 28°C por 24 horas (pré-inóculo). Posteriormente foram inoculadas 1×10^5 células/mL em erlenmeyers contendo 50 mL de meio YM modificado com amido de babaçu, nos meios com pHs 4,0, 5,0, 6,0, 7,0 e em duas temperaturas 27 °C e 55 °C. As amostras foram incubadas em agitador orbital a 150 rpm por 10 dias, sendo retiradas alíquotas a cada 24h para a avaliação de crescimento e quantificação de amilases.

A quantificação do crescimento foi feita através da leitura da densidade óptica em espectrofotômetro com comprimento de 595 nm e contagens em câmara de Neubauer.

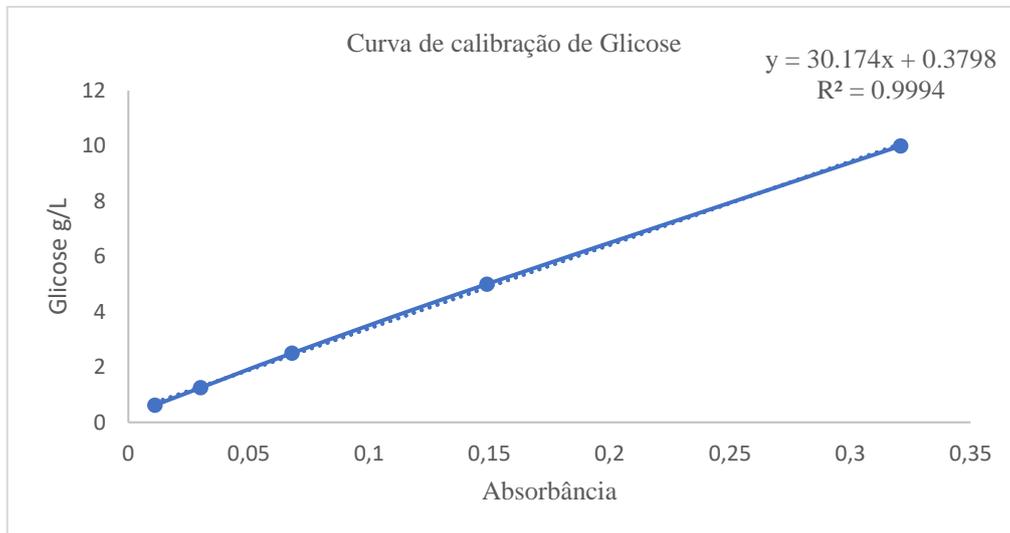
2.3 Quantificação de amilase

A atividade enzimática foi determinada a partir dos extratos pela quantificação de açúcares redutores (glicose), utilizando o método de Miller (1959). Para isso, esses extratos foram centrifugados a 4500 rpm por 15 minutos a 4°C. Posteriormente, 0,5 mL do sobrenadante livre de células foram transferidos para tubos de ensaio contendo 0,5 mL de DNS, incubado a 100°C por 10 minutos. As amostras foram resfriadas em banho de gelo para a paralização da reação e acrescentados

8 mL de água destilada. A leitura foi feita em espectrofotômetro em 540 nm obedecendo a lei de Lambert-Beer. O branco foi feito da mesma forma que as amostras, substituindo o estrato enzimático por água.

A quantificação de amilases foi feita por regressão linear utilizando a curva padrão de glicose (Figura 1).

Figura 1. Curva de calibração de glicose.



Source: Authors.

3. Resultados e discussão

As tabelas de 1 a 7 mostram os resultados da produção de glicose pelas rizobactérias usando farinha de babaçu para seus crescimentos em quatro pHs e duas temperaturas. A única diferença entre elas se refere aos tempos de coletas dos extratos bacterianos para avaliar a presença da glicose.

Com 24 horas de crescimento (Tabela 1) e analisando as médias das temperaturas, observa-se que houve maior produção de glicose quando as rizobactérias estavam sob 55 °C (5,87 g de glicose L⁻¹) do que sob 27 °C (4,46 g). Ao se analisar as médias considerando-se os pHs, observa-se que as maiores produções de glicose ocorreram nos pHs 6,0 e 7,0 sob a temperatura de 55 °C (6,75 g de glicose L⁻¹) e as menores, sob 27 °C com os meios de cultura com os pHs 4,0 ou 5,0.

Houve também, diferenças entre as rizobactérias quando são comparadas dentro de cada pH e temperatura. Em nenhuma das condições de cultivo elas foram estatisticamente iguais, sempre havendo alguma ou algumas que se sobressaíram. Sob o pH 4,0 e temperatura de 27 °C por exemplo, a INPA R015 se sobressaiu estatisticamente em relação às demais, enquanto sob o pH 5,0 e essa temperatura, as mais produtivas foram a INPA R028 e R034. Observou-se também, algumas interações entre pHs e temperaturas. Devido a isso, a maior produção de glicose ocorreu com a rizobactéria INPA R269 sob a temperatura de 55 °C e pH 7,0 e, a menor produção com a rizobactéria INPA R236 sob 27 °C e pH 4,0.

Tabela 1. Concentração de glicose em 24h em meio contendo farinha de babaçu.

Isolado	Glicose em g/L - Tempo de 24h							
	Temperatura 27°C				Temperatura 55°C			
	pH 4,0	pH 5,0	pH 6,0	pH 7,0	pH 4,0	pH 5,0	pH 6,0	pH 7,0
INPA_R015	5,14a	4,23b	6,19 a	5,97 a	5,00 a	4,50b	6,31b	5,07c
INPA_R028	4,06bc	4,79 a	6,16 a	4,61b	4,58 b	4,75b	6,62b	6,55 b
INPA_R034	4,30b	4,71 a	5,43b	5,12 a	4,50 b	4,69b	6,76 ab	7,25 a
INPA_R236	3,05c	3,33c	4,69c	3,29c	4,94 a	6,15 a	7,12 a	7,23 a
INPA_R269	3,59bc	3,02c	3,48d	4,13b	4,95 a	5,78 a	6,94 a	7,64 a
Médias dos pHs	4,03D	4,02D	5,19B	4,62C	4,79C	5,17 B	6,75 A	6,75 A
Médias de temperaturas				4,46Y				5,87X

Obs.: Médias diferentes maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas indicam diferenças significativas pelo Tukey a 5 %.
 Fonte: Autores.

As concentrações de glicose nas 48 horas (Tabela 2), ao contrário das 24 horas, foram maiores na temperatura de 27 °C, destacando o uso do pH 6,0 e, com o pH 4,0 na temperatura de 55 °C proporcionando a menor concentração. Ao se analisar as interações dos pHs com as temperaturas, observou-se que a maior concentração ocorreu com a INPA R 015 na temperatura de 27 °C e pH 6,0 e, a menor, com a INPA R269 na temperatura de 55 °C e pH 4,0.

Tabela 2. Concentração de glicose em 48h em meio contendo farinha de babaçu.

Isolado	Glicose em g/L - Tempo de 48h							
	Temperatura 27°C				Temperatura 55°C			
	pH 4,0	pH 5,0	pH 6,0	pH 7,0	pH 4,0	pH 5,0	pH 6,0	pH 7,0
INPA_R015	4,12b	4,53 ab	7,07 a	5,46b	3,57 ab	4,02 a	5,06 ab	5,39 a
INPA_R028	4,33 ab	4,43 ab	6,71 a	5,76b	3,92 a	3,87 ab	5,34 a	3,58c
INPA_R034	4,90 a	4,33 ab	6,85 a	5,60b	3,60 ab	3,59 ab	4,82 b	4,93 ab
INPA_R236	3,50c	4,17 b	6,06b	6,14 ab	3,48 ab	3,45 b	4,90 ab	4,70b
INPA_R269	4,34 ab	4,71 a	6,64 ab	6,33 a	3,33b	3,69 ab	4,90 ab	5,70 a
Média dos pHs	4,24D	4,43CD	6,67A	5,86 B	3,58D	3,72D	5,00C	4,86C
Médias de temperaturas				5,30X				4,29Y

Obs.: Médias diferentes maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas indicam diferenças significativas pelo Tukey a 5 %. Fonte: Autores.

Ao se analisar os dados coletados com 72 horas de incubação (Tabela 3), a produção de glicose proveniente do consumo da farinha de babaçu pelas rizobactérias se manteve maior na temperatura de 27 °C conforme observado com 48 horas (Tabela 2). Após três dias de crescimento, observou-se também, que a maior produção ocorreu no meio com pH 6,0 e temperatura de 27 °C e a menor, no pH 4,0 e temperatura de 55 °C. Mas nesse tempo de avaliação não se observou diferenças entre as rizobactérias crescidas no meio sob pH 4,0 e temperatura de 25 °C, embora nas demais condições de pHs elas mostrassem diferenças entre si (Tabela 3).

Houve também interações entre as bactérias nos pHs e temperaturas testados. A maior produção de glicose proveniente da transformação da farinha de babaçu nesse tempo de análise ocorreu com a rizobactéria INPA R 269 no meio com pH 7,0 e temperatura de 27 °C e a menor, com a INPA R015 no meio com pH 4,0 e temperatura de 55 °C.

Tabela 3. Concentração de glicose em 72h em meio contendo farinha de babaçu.

Isolado	Glicose em g/L - Tempo de 72h								
	Temperatura 27°C				Temperatura 55°C				
	pH 4,0	pH 5,0	pH 6,0	pH 7,0	pH 4,0	pH 5,0	pH 6,0	pH 7,0	
INPA_R015	5,24 a	4,28c	7,07c	7,63b	4,12b	4,53 a	5,28b	5,22c	
INPA_R028	5,13 a	5,38b	7,95 a	6,58b	4,19b	5,33 ab	6,27 a	5,39c	
INPA_R034	5,12 a	5,86b	7,33bc	6,58b	4,53 ab	4,95b	6,37 a	5,98b	
INPA_R236	4,79 a	5,27b	7,31bc	4,58c	4,77 a	5,67 a	6,33 a	6,52 a	
INPA_R269	5,20 a	7,36 a	7,61b	8,63 a	4,72 a	5,70 a	6,37 a	6,37 ab	
Média dos pHs	5,10E	5,63CD	7,45A	6,80B	4,46F	5,24DE	6,12C	5,90C	
Médias de temperaturas					6,24X				5,43Y

Obs.: Médias diferentes maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas indicam diferenças significativas pelo Tukey a 5 %.
 Fonte: Autores.

Com quatro dias de crescimento (Tabela 4) os resultados se mantiveram semelhantes aos anteriores, mas havendo diferenças entre as rizobactérias em todos os pHs analisados. As maiores produções de glicose ocorreram com a INPA R269 nos meios com pHs 6,0 e 7,0 e, INPA R 028 no meio com pH 6,0, todas sob a temperatura de 27 °C.

Tabela 4. Concentração de glicose em 96h em meio contendo farinha de babaçu.

Isolado	Glicose em g/L - Tempo de 96h								
	Temperatura 27°C				Temperatura 55°C				
	pH 4,0	pH 5,0	pH 6,0	pH 7,0	pH 4,0	pH 5,0	pH 6,0	pH 7,0	
INPA_R015	4,65b	5,70 a	7,72 a	6,22c	4,37b	4,56b	5,39c	5,47 ab	
INPA_R028	5,10 a	4,98 b	8,42 a	7,41b	4,32b	4,36b	6,19 a	5,04b	
INPA_R034	4,87 ab	5,48 ab	7,95 a	7,19b	4,11b	4,87b	6,09 a	5,83 a	
INPA_R236	5,25 a	5,84 a	7,20b	7,46 b	4,99 a	5,71 a	5,68bc	5,59 a	
INPA_R269	4,88 ab	5,61 a	8,20 a	8,66 a	4,02	4,95b	6,06 a	5,71 a	
Média dos pHs	4,95D	5,52B	7,90A	7,39B	4,36E	4,89DE	5,88B	5,53B	
Médias de temperaturas					6,44X				5,17Y

Obs.: Médias diferentes maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas indicam diferenças significativas pelo Tukey a 5 %. Fonte: Autores.

A partir do sexto dia (Tabela 5) começa a haver uma reversão do efeito da temperatura na produção de glicose. No sexto dia não houve diferença entre as duas temperaturas (Tabela 5), mas a produção de glicose foi maior significativamente quando a temperatura de incubação foi de 55 °C nas avaliações com 168 horas (Tabela 6) e 192 horas (Tabela 7).

O pH que proporcionou maior produção de glicose no tempo de 144 horas foi o 6,0 e o menor, pH 4,0, ambos sob a temperatura de 27 °C (Tabela 5). A maior produção foi pela rizobactéria INPA R034 no pH 6,0 e temperatura de 55 °C e a menor, com a INPA R269 no meio com pH 4,0 sob a temperatura de 27 °C.

Tabela 5. Concentração de glicose em 144h em meio contendo farinha de babaçu.

Isolado	Glicose em g/L - Tempo de 144h							
	Temperatura 27°C				Temperatura 55°C			
	pH 4,0	pH 5,0	pH 6,0	pH 7,0	pH 4,0	pH 5,0	pH 6,0	pH 7,0
INPA_R015	5,12b	5,32 a	8,04 a	6,50 ab	5,35c	6,09b	6,56d	6,00c
INPA_R028	5,63 a	4,78b	6,92b	6,31b	6,12b	5,07c	6,14d	5,26d
INPA_R034	4,79bc	5,40 a	6,90 b	6,24bc	5,14c	5,90b	7,91 a	7,24 a
INPA_R236	4,95bc	5,70 a	7,67 a	5,80c	6,75 a	7,48 a	7,10 b	6,93 a
INPA_R269	4,57c	5,28 a	7,57 a	6,99 a	6,91 a	7,72 a	6,94 c	6,64 b
Média dos pHs	5,01D	5,30D	7,42A	6,37C	6,05C	6,45BC	6,93B	6,41C
Médias de temperaturas	6,02 X				6,46X			

Obs.: Médias diferentes maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas indicam diferenças significativas pelo Tukey a 5 %.
 Fonte: Autores.

Com sete dias de incubação (Tabela 6), o pH que proporcionou a maior produção de glicose foi 5,0 sob a temperatura de 55 °C e a menor ocorreu nos meios com pH 4,0 e pH 5,0, sob a temperatura de 27 °C. A maior produção nesse período de avaliação ocorreu com a rizobactéria INPA R236 no meio com pH 5,0 e temperatura de 55 °C e a menor, com a INPA R034 no meio com pH 4,0 e temperatura de 27 °C.

Tabela 6. Concentração de glicose em 168h em meio contendo farinha de babaçu.

Isolado	Glicose em g/L - Tempo de 168h							
	Temperatura 27°C				Temperatura 55°C			
	pH 4,0	pH 5,0	pH 6,0	pH 7,0	pH 4,0	pH 5,0	pH 6,0	pH 7,0
INPA_R015	3,35c	4,17c	6,79b	4,33c	5,75c	7,38bc	7,10 a	6,90 a
INPA_R028	4,72 a	4,69 ab	6,03c	6,27b	7,96 a	6,80d	7,00 a	5,76c
INPA_R034	4,03b	4,42bc	7,96 a	6,12b	7,63 a	7,52b	6,12b	5,78c
INPA_R236	4,65 a	4,53abc	7,13b	4,59c	6,74b	8,62 a	6,60b	7,27 a
INPA_R269	4,52 ab	4,95 a	6,89b	7,22 a	5,08d	6,94cd	6,34b	5,72c
Média dos pHs	4,25D	4,55D	6,96B	5,71C	6,63B	7,45A	6,63B	6,29b
Médias de temperaturas	5,37Y				6,75X			

Obs.: Médias diferentes maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas indicam diferenças significativas pelo Tukey a 5 %. Fonte: Autores.

Finalmente, com oito dias de incubação (Tabela 7), o melhor pH para a produção de glicose foi 6,0 em ambas as temperaturas e, os com menores produções foram os pH 4,0 e pH 5,0 sob a temperatura de 27 °C. A maior produção de glicose ocorreu quando se usou a INPA R236 no meio com pH 6,0 e temperatura de 55 °C e a menor, com a INPA R015, no pH 4,0 e temperatura de 27 °C.

Tabela 7. Concentração de glicose em 192h em meio contendo farinha de babaçu.

Glicose em g/L - Tempo de 192h	Temperatura 27°C				Temperatura 55°C			
	pH 4,0	pH 5,0	pH 6,0	pH 7,0	pH 4,0	pH 5,0	pH 6,0	pH 7,0
INPA_R015	3,71c	4,73b	7,60bc	4,98c	6,28b	7,39 a	6,91c	4,34d
INPA_R028	5,60 a	5,30 a	7,44c	6,24b	6,45b	6,25b	7,62b	5,36c
INPA_R034	4,76b	5,09 ab	8,03 a	6,97 a	5,64c	6,38b	6,92c	7,11b
INPA_R236	5,05b	5,47 a	5,25d	6,60 b	7,17 a	4,80c	8,45 a	8,56 a
INPA_R269	4,80b	5,16 ab	8,15 a	7,30 a	5,94c	7,78 a	7,29bc	7,34b
Média dos pHs	4,78C	5,15C	7,29A	6,42B	6,30B	6,52B	7,44A	6,54B
Médias de temperaturas	5,91Y				6,70X			

Obs.: Médias diferentes maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas indicam diferenças significativas pelo Tukey a 5 %. Fonte: Autores.

Diversos estudos foram realizados com rizobactérias isoladas de solos amazônicos, mostrando que apresentam uma gama ampla de potencial biotecnológico (Brito et al., 2016; Oliveira & Oliveira, 2016; Hara & Oliveira, 2004, 2005, 2007; Chagas Jr et al., 2009; Menezes & Oliveira, 2016) e entre eles, a capacidade de produzirem amilases (Oliveira et al., 2007 a,b, 2010; Cauper et al., 2017; Minelli-Oliveira et al., 2019; 2020 a,b), havendo também, publicações mostrando suas capacidades de crescerem em meio contendo farinha de babaçu (Costa et al., 2016).

No entanto, nenhum desses estudos verificou a capacidade de produzir glicose usando a farinha de babaçu no meio de cultura, conforme demonstrado nas Tabelas 1 a 7 do presente estudo, confirmando-as e indicando-as para uso biotecnológico. A glicose produzida convertida do amido da farinha do babaçu pode servir para diversas finalidades, como na produção de etanol, etc.

O fato dessas cinco rizobactérias decomporem o amido da farinha do babaçu e o converterem em glicose sob a temperatura de 55 °C é muito importante do ponto de vista industrial, uma vez que enzimas termoestáveis podem ser usadas nos processos biotecnológicos conduzidos sob altas temperaturas, quando há menos possibilidade de surgir contaminação por microrganismos mesofílicos (Palma-Fernandez et al., 2002).

Essas rizobactérias produtoras de amilases passam a compor um grupo de microrganismos capazes de servir a um mercado bem amplo, uma vez que esse grupo de enzimas apresenta um amplo espectro de utilização nas indústrias, correspondendo a aproximadamente 25 % do mercado mundial de enzimas (Reddy et al., 2003; Souza & Magalhães, 2010). Ênfase deve ser dada à sua capacidade de usar o amido da farinha do babaçu, pois podem contribuir para a incorporação dessa palmeira na bioeconomia amazônica, carente de espécies vegetais para suprir um mercado cada vez mais abrangente. Por ocorrer espontaneamente nas matas da Amazônia (Miranda et al., 2001; Clement et al., 2005), essa palmeira pode servir para esse fim sem que seja necessário desmatar áreas de florestas.

4 Conclusões

As rizobactérias INPA R015, INPA R028, INPA R034, INPA R 236 e INPA R269 converteram o amido da farinha de babaçu em glicose em todos os pHs e temperaturas testados.

A presença da atividade amilolítica na temperatura de 55 °C mostra que elas podem ser usadas em processos industriais sob altas temperaturas, quando há menos possibilidade de contaminação por microrganismos sensíveis a essas temperaturas.

Essa habilidade foi observada em todos os oito dias que durou o experimento.

Houve influência significativa do pH dos meios e das temperaturas de incubação na produção de glicose.

A produção de glicose variou de 3,02-8,66 g.L⁻¹, com a menor ocorrendo 24 horas após o início de experimento usando a INPA R269 na temperatura de 27 °C e pH 5,0 e, a maior, com essa mesma bactéria e temperatura, mas no meio com pH 7,0 após 96 horas de incubação.

A presença de glicose nos meios indica que essas cinco rizobactérias mostram potencial para serem usadas para fins biotecnológicos usando a farinha de babaçu para seus crescimentos, fortalecendo a cadeia produtiva dessa palmeira pouco usada na Amazônia.

Novos estudos são necessários, como por exemplo, se misturas com essas rizobactérias possibilitam maior produção de glicose do que as produções de cada uma delas individualmente.

Agradecimentos

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e à FAPEAM (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas), pelo apoio financeiro que permitiu realizar essa pesquisa.

Referências

- Abdulaal, W. H. (2018). Purification and characterization of α -amylase from *Trichoderma pseudokoningii*. *BMC Biochemistry*, 19(1), 4–9. <https://doi.org/10.1186/s12858-018-0094-8>
- Ahmad, M. A., Isah, U., Raubilu, I.A., Muhammad, S. I. & Ibrahim, D. (2019). An overview of the enzyme: amylase and its industrial potentials. *Bayero Journal of Pure and Applied Sciences*, 12(1):352-358. <http://dx.doi.org/10.4314/bajopas.v12i1.53S>
- Angelia, C., Sanjaya, A., Aida, Tanudjaja, E., Victor, H., Cahyani, A. D., Tan, T. J. & Pinontoan, R. (2019). Characterization of alpha-amylase from *Aspergillus niger* aggregate F isolated from a fermented cassava gatot grown in potato peel waste medium. *Microbiol. Biotechnol. Lett.*, 47(3):364-371. <http://dx.doi.org/10.4014/mbl.1811.11011>
- Ayres Júnior, J.C. (2007). *A organização das quebradeiras de coco babaçu e a funcionalização de um espaço regional na Microrregião do Médio Mearim Maranhense*. Dissertação de mestrado em Desenvolvimento Regional e Urbano. Universidade Federal de Santa Catarina, 176p.
- Brito, L. L., Menezes, N. C., Minelli-Oliveira, C. & Oliveira, L. A. (2016). *Biodegradação de petróleo por isolados de rizóbios provenientes de solos amazônicos*. In: Oliveira et al. (Eds.) *Diversidade Microbiana da Amazônia*. Editora INPA, 2016, 1, 41-46.
- Bussa, N. F., Moges, M., Muthuswamy, M., & Abdisa, M. (2019). Isolation and Characterization of Amylase Enzyme from Selected Fungal Strains of Wof Washa Forest of. *Scientific Journal of Biology & Life Sciences*, 1(2), 1–10.
- Cauper, F. R.M., Brito, L. L., Minelli-Oliveira, C., Costa, S. S., Menezes, N. C. & Oliveira, L. A. (2017). *Potencial de produção de amilase por rizóbios isolados de nódulos de feijão caupi cultivado em solo da Amazônia* In: Oliveira et al. (Eds.) *Diversidade Microbiana da Amazônia*. INPA, 2, 107-114.
- Chagas Jr, A. F., Oliveira, L. A. & Oliveira, A.N. (2009). Tolerância à acidez e alumínio tóxico por isolados de rizóbios de solos no Amazonas, Brasil. *Acta Amazonica*, 39(2):467 – 470.
- Chapman, J., Ismail, A., & Dinu, C. (2018). Industrial Applications of Enzymes: Recent Advances, Techniques, and Outlooks. *Catalysts*, 8(6), 238. <https://doi.org/10.3390/catal8060238>
- Chapman, J., Ismail, A., & Dinu, C. (2018). Industrial Applications of Enzymes: Recent Advances, Techniques, and Outlooks. *Catalysts*, 8(6), 238. <https://doi.org/10.3390/catal8060238>
- Clement, C. R., Lheras P. E. & Van Leewen. J. (2005). O potencial das palmeiras tropicais no Brasil: Acertos e fracassos das últimas décadas. *Agrociências*, 9(1-2):67-71.
- Costa Junior, J. A., Rosa, G. M., Wastowski, A. D., Soriani, H. H., Locatelli, A. P. C., Silva, D. W., Gonçalves, D. B., Volpi, G. B., Konzen, I. S., Flach, K. A., Bones, U. A. (2021). Biotechnology: identification and evaluation of the *Bacillus cereus* amylolytic activity. *Research, Society and Development*, 10(13), e437101321301. DOI: 10.33448/rsd-v10i13.21301.
- Costa, B.P. (2019). *Potencial tecnológico do amido da semente de nêspera (Eryobotria japonica): características e efeitos de diferentes métodos de extração*. Dissertação, Programa de PG em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná, 93p.
- Costa, T. P., Menezes, N. C. & Oliveira, L. A. (2016). *Crescimento de rizobactérias em meio de cultura usando o mesocarpo do babaçu (Orbignya phalerata Mart) como fonte de carbono para fins biotecnológicos*. In: Oliveira et al. (Eds.) *Diversidade Microbiana da Amazônia*. 1 ed. Manaus: Editora INPA, 1, 69-74.
- Cruz, E.T.L. (2011). *Caracterização do Mesocarpo de Babaçu (Orbignya sp): Termoanálise (TG/DTA) e Avaliação do conteúdo de Amido*. Monografia do curso de Farmácia. Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2011.

- Giordano, R. L. C. (1992). Estudo da coimobilização de glicoamilase e levedura para a fermentação alcoólica contínua de matéria-prima amilácea. Tese Doutorado, Escola Politécnica, USP, 232p.
- Hara, F.A.S. & Oliveira, L. A. (2005). Características fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbios oriundos de solos ácidos de Iraduba, Amazonas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 40:667 - 672.
- Hara, F.A.S. & Oliveira, L. A. (2004). Características fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbios oriundos de solos ácidos e álicos de Presidente Figueiredo. Amazonas. *Acta Amazonica*, 34:343 - 357.
- Hara, F. A. S. & Oliveira, L. A. (2007). Características fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbio oriundos de solos ácidos do município do Rio Preto da Eva, Amazonas. *Revista de Ciências Agrárias* (Belém), 48:55 - 70.
- Köche, J.C. (2011). Fundamentos de Metodologia Científica. Teoria da ciência e iniciação à pesquisa. Editora Vozes, Petrópolis, 185p. https://btux.com.br/wp-content/uploads/sites/10/2018/07/K%C3%B6che-Jos%C3%A9-Carlos0D0AFundamentos-de-metodologia-cient%C3%ADfica_-teoria-da0D0Aci%C3%AAncia-e-inicia%C3%A7%C3%A3o-%C3%A0-pesquisa.pdf
- Leonel, M. & Cereda, M.P. (2002). Caracterização físico-química de algumas tuberosas amiláceas. *Food Sci. Technol.* 22(1) <https://doi.org/10.1590/S0101-20612002000100012>.
- Menezes, N. C. & Oliveira, L. A. (2016). Tolerância de rizóbios à acidez e ao alumínio In: Oliveira et al. (Eds.) Diversidade Microbiana da Amazônia. Editora INPA, 1, 156-161.
- Miller, G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3):426-428.
- Minelli-Oliveira, C., Miyamoto, M. S. F., Astolfi Filho, S., Oliveira, L. A., Pereira, J. O. (2019). Characterization of A-Amylases complex produced by a *Bradyrhizobium* sp. isolated from an Amazonian soil. *International Journal of Development Research*, 09:32868 - 32871, 2019.
- Minelli-Oliveira, C., Miyamoto, M. S. F., Astolfi Filho, S., Oliveira, L. A. & Pereira, J. O. (2020a). Effect of temperature and pH on amyolytic activities of *Bacillus atropheus* and *Paenibacillus polymyxa* isolated from Amazonian soils. *International Journal of Development Research*, 10(01):33249 - 33251.
- Minelli-Oliveira, C., Miyamoto, M. S. F., Astolfi Filho, S., Oliveira, L. A. & Pereira, J. O. (2020b). Presence of a-amylases in rhizobacteria isolated from Amazonian soils. *International Journal of Development Research*, 10:32252-32255.
- Miranda, I. P. A., Rabelo, A., Bueno, C. R., Barbosa, E. M. & Ribeiro, M. N. S. (2001). *Frutos das Palmeiras da Amazônia*. Manaus: Ministério da Ciência e Tecnologia/MCT INPA. 110p. 2001.
- Oliveira, A. N., Flor, N.S. & Oliveira, L. A. (2010). Influência do pH e temperatura sobre a atividade amilolítica de rizóbios isolados de solos da Amazônia. *Acta Amazonica*, 40:401 - 404.
- Oliveira, F.R. & Oliveira, L. A. (2016). *Micro-organismos de solos amazônicos com habilidade em degradar gasolina obtida da Refinaria de Manaus (REMAN)*. In: Oliveira et al. (Eds.) Diversidade Microbiana da Amazônia. Editora INPA, 1, 185-191.
- Oliveira, A. N., Oliveira, L. A. & Andrade, J. S. (2010). Partial characterization of amylases of two indigenous Central Amazonian rhizobia strains. *Brazilian Archives of Biology and Technology* (Impresso), 53:35-45.
- Oliveira, A. N., Oliveira, L. A., Andrade, J. S. & Chagas Jr, A. F. (2007 a). Production of amylase by rhizobia using peach palm flour as substrate. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 27:61-66.
- Oliveira, A.N., Oliveira, L. A., Andrade, J. S. & Chagas Jr, A. F. (2007 b). Rhizobia amylase production using various starchy substances as carbon substrates. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38:208-216.
- Palma-Fernandez E.R., Gomes E. & Da Silva R. (2002). Purification and characterization of two beta-glucosidases from the thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus*. *Folia Microbiol.* (Praha). 47(6):685-90.
- Pereira, A. S., Shitsuka, D. M., Parreira, F. J. & Shitsuka, R. (2018). *Metodologia da pesquisa científica*. UFSM. https://repositorio.ufsm.br/bitstream/handle/1/15824/Lic_Computacao_Metodologia-Pesquisa-Cientifica.pdf?sequence=1
- Reddy, N. S., Nimmagadda, A. & Sambasiva Rao, K. R. S. (2003). An overview of the microbial -amylase family. *Afr. J. Biotechnol.* 2, 645- 648.
- Roth, C., Moroz, O.V., Turkenburg, J.P., Blagova, E., Waterman, J., Ariza, A., Ming, L., Tianql, S., Andersen, C., Davies, G.J. & Wilson, K.S. (2019). Structural and functional characterization of three novel fungal amylases with enhanced stability and pH tolerance. *International Journal of Molecular Science*, 20, 4902, doi:10.3390/ijms20194902
- Santos, I. R., Mendes, T. P. S., Miranda, A. C. dos A., Costa, D. N., Figueroa, G. M., Soares, V. D. M., Valasques Junior, G. L., Cedro, P. & Évelin P. (2020). Production and characterization of amylase obtained from *Rhizopus microsporus* var. oligosporus. *Research, Society and Development*, 9(7): e694974810, 10.33448/rsd-v9i7.4810.
- Souza, P. M. & Magalhães, P. O. (2010). Application on microbial a-amilase in industry – a review. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41:850-861.
- Sweta, K., Tyagi, S. & Bamal, A. (2019). A review: Characteristics and application of amylase. *Int. J. Adv. Microbiol. Health. Res.*, 3(4):18-29.