



ENEPEX

ENCONTRO DE ENSINO,
PESQUISA E EXTENSÃO

8° ENEPE UFGD • 5° EPEX UEMS

PRODUÇÃO DE AMILASE POR FUNGO FILAMENTOSO ISOLADO DA REGIÃO DE DOURADOS – MS

**Matheus Fernandes¹ Isadora Stranieri Saguine² Nathalia Barros Correia Godoy²
Gabriela Finoto Cavalheiro³ Flávia Regina da Silva Santos⁴ Rodrigo Simões
Ribeiro Leite⁵.**

UFGD-FCBA, C. Postal 533, 79804-970 Dourados-MS, E-mail: matheusfernandes_27@hotmail.com;
rodrigoleite@ufgd.edu.br

¹Acadêmico de Biotecnologia da UFGD, Bolsista de Iniciação Científica da UFGD.

²Acadêmico de Biotecnologia da UFGD.

³Mestranda em Ciência e Tecnologia Ambiental da UFGD

⁴Doutoranda em Ciência e Tecnologia Ambiental da UFGD

⁵Orientador do Projeto de Pesquisa FCBA/UFGD.

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo delinear as condições ótimas de cultivo para produção de amilases pelo fungo filamentoso *Gongronella* sp., linhagem recentemente isolada do solo do cerrado e selecionada para produção de amilases pelo nosso grupo de pesquisa. Dentre os parâmetros fermentativos avaliados, o fungo apresentou maior produção enzimática, cerca de 63,25 U/g, quando cultivado por 96 horas em farelo de trigo com 55% de umidade inicial a 25°C. A escassez de trabalhos científicos estimula a continuidade do presente estudo, visando em etapas futuras, a descrição das características bioquímica deste novo biocatalizador prospectado pela nossa equipe.

Palavras-chave: *Gongronella* sp; fermentação em estado sólido; resíduos agroindustriais.

1. INTRODUÇÃO

As amilases hidrolisam moléculas de amido liberando diversos produtos, como dextrinas, ciclodextrinas, maltose e glicose. As amilases podem ser divididas em quatro grupos: as α -amilases que rompem as ligações no interior do substrato (endoamilases) liberando dextrinas lineares e ramificadas, as isoamilases que atuam nas ramificações do

amido (desramificantes); as β -amilases que hidrolisam unidades das extremidades não redutoras do substrato (exoamilases) tendo como principal produto maltose e as glucoamilases (amiloglicosidases) que também atuam nas extremidades não-redutoras da molécula de amido, liberando unidades de glicose (SPIER, 2005).

As enzimas amilolíticas são amplamente aplicadas em processos biotecnológicos, tais como nas indústrias têxteis, papel e celulose, couro, detergentes, bebidas destiladas, cervejas, panificação, cereais para alimentação infantil, liquefação e sacarificação do amido (produção de xaropes), ração animal, indústria química e farmacêutica (BARATTO *et al.*, 2011).

Atualmente, existe uma forte tendência em utilizar fermentação em estado sólido para produção de enzimas industriais. Este processo de cultivo microbiano pode ser definido como o crescimento de microrganismos em substratos sólidos e poroso, na ausência de água livre entre as partículas da matriz sólida. A fermentação em estado sólido é vantajosa, pois além de simular o hábitat natural de microrganismos (principalmente fungos filamentosos), apresenta maior produtividade, menor susceptibilidade à inibição e maior estabilidade das enzimas (RODRIGUES-ZÚNIGA *et al.*, 2011).

Considerando a importância biotecnológica das amilases microbianas e o reduzido número trabalhos visando a produção de enzimas com a microbiota local, o presente estudo teve como objetivo delinear as condições ótimas de cultivo, em resíduos agroindustriais, para produção de amilases pelo fungo filamentoso *Gongronella* sp., linhagem recentemente isolada do solo do cerrado e selecionada para produção de amilases pelo nosso grupo de pesquisa.

2. METODOLOGIA

2.1 Microrganismo: Neste trabalho foi utilizado um fungo filamentoso mesófilo recentemente isolado do solo do cerrado, identificado como *Gongronella* sp. O isolado foi mantido em *ágar Sabouraud Dextrose* a 5°C.

2.2 Produção de amilases por Cultivo em Estado Sólido (CES): O cultivo microbiano ocorreu em frascos erlenmeyer de 250 mL com 5 g de substratos umedecidos com solução nutriente (0,1% de sulfato de amônio, 0,1% sulfato de magnésio hepta-hidratado e 0,1% nitrato de cálcio). Após a inoculação do microrganismo, os frascos erlenmeyer foram mantidos a 28°C. Alguns parâmetros fermentativos foram avaliados visando otimizar a produção de amilase pelo

microrganismo, dentre eles: utilização de diferentes resíduos como substratos, umidade inicial do meio, temperatura e tempo de cultivo.

2.3 Determinação da atividade de amilase: A atividade enzimática foi determinada pela adição de 0,1 mL de enzima em 0,9 mL de tampão acetato de sódio 0,1M, pH 5,0 contendo 1% de amido de milho (Maizena®). Após 10 minutos de reação, o açúcar redutor liberado foi quantificado pelo método de DNS (3,5-acido dinitrosalisílico) descrito por Miller em 1959. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1µmol de produto por minuto de reação.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O substrato que apresentou maior potencial para produção de amilase pelo microrganismo foi o farelo de trigo, com uma atividade enzimática de 35,57 U/g (Tabela 1).

Tabela 1. Produção de amilase pelo fungo *Gongronella* sp. em diferentes resíduos agroindustriais à 30°C com 65% de umidade no meio e 120 h de tempo de cultivo.

Substratos	U/g	U/ml
Palha de Milho	6,03	0,60
Sabugo de Milho	2,29	0,22
Casca de Arroz	2,71	0,27
Farelo de Soja	9,56	0,95
Farelo de Trigo	35,57	3,55

Segundo Pandey (1992) a maioria dos fungos quando submetidos a FES apresenta uma maior produção com farelo de trigo devido suas propriedades nutricionais e sua textura. Castro et. al (2012) descrevem que quatro linhagens fúngicas isoladas do cerrado produziram maior quantidade de enzima em farelo de trigo, quando comparado com a produção em sabugo de milho. Kunamneni et al. (2005) obtiveram uma atividade enzimática de 534 U/g quando utilizaram farelo de trigo, na produção de amilase por FES, a partir do fungo *Thermomyces lanuginosus*, após um período de 120h de fermentação, com 90% de umidade inicial a 50°C.

A umidade ótima para produção de amilase pelo fungo em farelo de trigo foi a 55% apresentando cerca de 51,26 U/g (figura 1A), após 120 horas de cultivo a 30°C. O nível de umidade do substrato é um dos fatores que mais influenciam o cultivo microbiano em estado sólido, podendo variar de acordo com a natureza do substrato,

tipo de produto final e necessidade do microrganismo. Um nível de umidade muito alto resulta na diminuição da porosidade, aumento no risco de contaminação e redução das trocas gasosas. Reduzidos níveis de umidade levam a um menor grau de crescimento em relação ao ótimo e baixo grau de substrato realmente utilizado (LONSANE et al., 1985).

Diferentes temperaturas foram avaliadas para o cultivo do microrganismo em farelo de trigo contendo 55% de umidade por 120 horas. A temperatura ótima de cultivo para produção de amilase foi 25°C com 52,54 U/g (figura 1B), isso pode ser explicado por se tratar de um microrganismo mesófilo.

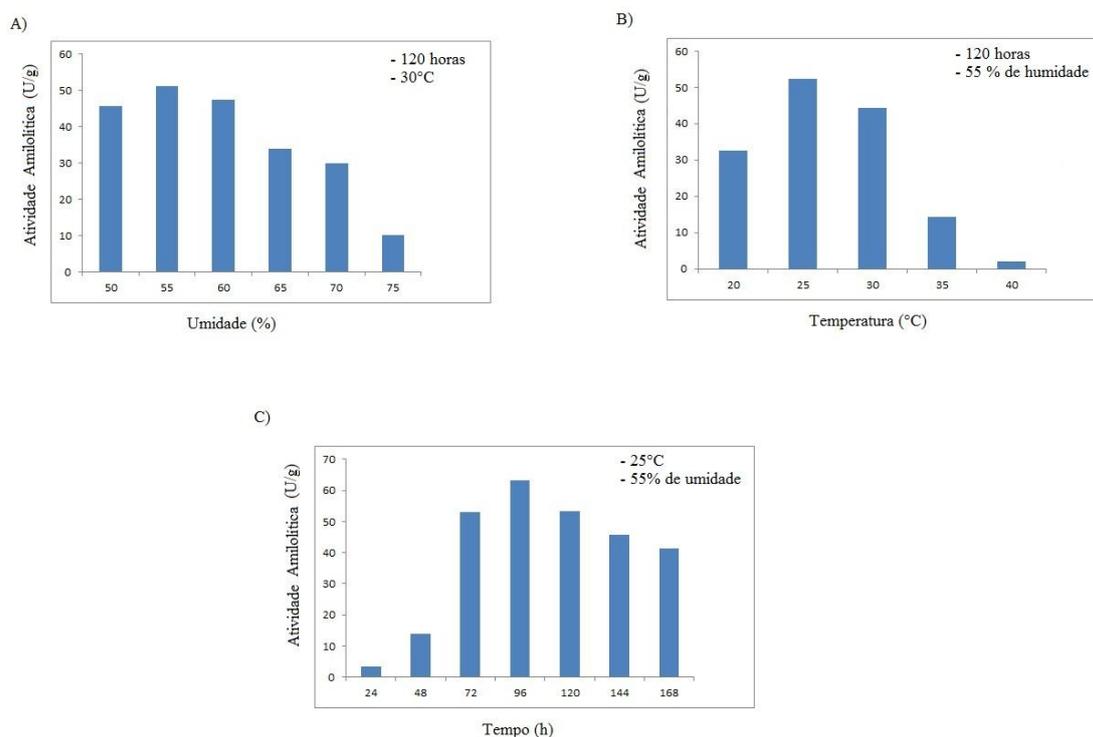


Figura 1. Produção de amilase pelo cultivo em estado sólido do fungo *Gongronella* sp em farelo de trigo. (A) umidade inicial, (B) temperatura de cultivo, (C) tempo de cultivo.

Sato e Sudo (1999) relatam que a temperatura afeta tanto o crescimento quanto a produção das enzimas, sendo necessário eficiência na remoção de calor. Bianchi et al. (2001) complementam que devido as atividades metabólicas dos microrganismos e dependendo da altura da camada de substrato, uma grande quantidade de calor pode ser produzida durante o processo fermentativo em estado sólido. Como a temperatura afeta diretamente a germinação dos esporos, o crescimento dos microrganismos e a formação de produto, o calor produzido deverá ser imediatamente dissipado para que o aumento

da temperatura não prejudique o processo fermentativo e o produto de interesse (SANTANA, 2012).

A maior produção da enzima foi obtida com 96 horas de cultivo, cerca de 63,25 U/g, utilizando os demais parâmetros obtidos como ótimos nos ensaios anteriores (figura 1C). O tempo de cultivo obtido (96 h) foi próximo ou menor que o descrito para produção de amilases por outras linhagens fúngicas. Kunamneni et al. (2005) relatam maior produção de amilase após 120 horas de cultivo em estado sólido do fungo *Thermomyces lanuginosus* em farelo de trigo. ELLAIAH et al. (2002) descrevem uma maior produção de amilase pelo fungo *Aspergillus* sp. A3 também em 120 horas de cultivo em estado sólido.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos permitem inferir que o fungo filamentosso *Gongronella* sp. apresenta potencial para produção de amilases em meios de cultivo com reduzido valor comercial (resíduos agroindustriais) e com tempo de produção relativamente baixo. Estas características são muito apreciáveis para redução do custo final destas enzimas, favorecendo sua aplicação em processos industriais. Outro aspecto importante que deve ser ressaltado, é o reduzido número de trabalhos utilizando fungos pertencentes a este gênero para produção de amilases, o que incentiva a continuidade do trabalho.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARATTO, C. M.; SALAMONI, S. P.; COSTA, R.; OLIVEIRA, C. B.; LOCATELLI, G. O. **Seleção de Microrganismos Produtores de Enzimas Hidrolíticas Isolados da Região do Meio Oeste de Santa Catarina, Brasil.** Evidência, Joaçaba v. 11 n. 2, p. 15-28, julho/dezembro 2011.

BIANCHI, V. L. D., MORAES, I. O., CAPALBO, D. M. F. **Fermentação em estado sólido.** In: Schmidell, Wi., Lima, V.A., Aquarone, E., Borzani, W. Biotecnologia Industrial. Edgard Blucher LTDA. V.3: p. 247-276, 2001.

CASTRO, M. C. ; BRASILIANO, R. A. P. ; SENNA, S. N. ; ALVES-PRADO, H. F. . **Produção de amilase por fungos isolados em áreas de cerrado - MS.** In: VII Encontro de Ciências da Vida, Ilha Solteira, SP. VII Encontro de Ciências da Vida, 2013.

ELLIAIAH, P.; ADINARAYANA, K.; BHAVANI, Y.; PADMAJA, P.; SRINIVASULU, B. **Optimization of process parameters for glucoamylase production under solid state fermentation by a newly isolated *Aspergillus* species.** Process Biochem. v. 38, p. 615-620, 2002.

KUNAMNENI, A.; PERMAUL, K.; SINGH, S. **Amylase production in solid state fermentation by the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*.** Journal of Bioscience and Bioengineering, v. 100, n. 2, p. 168-171, 2005.

LONSANE, B. K.; GHILDYAL, N. P.; BUDIATMAN, S.; RAMAKRISHNA, S. V. **Engineering Aspects of Solid State Fermentation.** Enzyme Microbiology Technology. v.7, p.258-265, 1985.

PANDEY, A. **Production of starch saccharifying enzyme in solid culture.** Starch-Stärke, v. 44, n. 2, p. 75-77, 1992.

RODRIGUEZ - ZÚNIGA, U. F.; FARINAS, C. S.; NETO, V. B.; COURI, S.; CRESTANA, S. **Produção de Celulases por *Arpergillus níger* por fermentação em estado sólido.** Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v.46, n.8, p.912-919, ago. 2011.

SANTANA, R. S. M. de; **Produção de enzimas amilolíticas através da fermentação em estado sólido.** 2012. 73 f. Dissertação (Mestrato em Engenharia de Alimentos) - Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, 2012.

SATO, K.; SUDO, S. **Small-scale solid-state fermentations.** Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology. p.60-79, 1999.

SPIER, M. R. **Produção de Enzimas Amilolíticas Fúngicas α -Amilase e Amiloglucosidase por Fermentação no Estado Sólido.** Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.