

# Potencial de fungos filamentosos na produção de enzimas utilizando diferentes fontes de amido

## *Potential of filamentous fungi for the production of enzymes using different sources of starch*



### Resumo:

Dentro das novas tecnologias de produção, de compostos biológicos, pode-se considerar a produção enzimática como um dos campos mais promissores. As amilases, em particular, são bastante utilizadas nas indústrias de bebidas, na panificação, etc. Esse trabalho teve como objetivo avaliar o potencial de diferentes fungos filamentosos utilizando o amido de batata e amido de milho como substratos. Para o experimento foram utilizados os fungos *Aspergillus fumigatus* ATCC 6535, *Aspergillus tamaris* ATCC 2204, *Penicillium ocriseum* ATCC 6026, *Penicillium roqueforti* ATCC 10110, *Aspergillus niger* e *Rhizopus stolonifer*. Primeiramente foi preparado um extrato bruto enzimático com cada fungo, utilizando 1% de amido de trigo. Em seguida foi preparado um meio sólido contendo o amido de batata e de milho nas concentrações de 0,5%, 1% e 1,5%. Uma alíquota de 80 µL do extrato bruto de cada fungo foi inoculado em cup plates, nas placas. Essas foram incubadas a 35°C por 24 horas. A revelação do halo foi feita utilizando uma solução de iodo a 2% por 5 minutos. A atividade enzimática foi avaliada de acordo com o diâmetro do halo produzido por cada fungo. Os dados desta pesquisa evidenciaram que todos os fungos produziram amilases. O fungo AF apresentou a melhor atividade enzimática nos meios. Os fungos PR e AT, mostraram menor produção de halo no amido de batata e amido de milho, respectivamente.

### Abstract:

Within the new production technologies, biological compounds, can be considered the enzymatic production as one of the most promising fields. Amylases, in particular, are widely used in the beverage industry, in baking, etc. This work aimed to evaluate the potential of different filamentous fungi using potato starch and corn starch as substrates. For the experiment we used the fungi *Aspergillus fumigatus* ATCC 6535, *Aspergillus tamaris* ATCC 2204, *Penicillium ocriseum* ATCC 6026, *Penicillium roqueforti* ATCC 10110, *Aspergillus niger* and *Rhizopus stolonifer*. First it prepared a crude enzymatic extract with each fungus, using 1% wheat starch. Then a solid was prepared medium containing the potato starch and corn at concentrations of 0.5%, 1% and 1.5%. A 80 µL aliquot of the crude extract of each strain was inoculated into cup plates, the plates. These were incubated at 35 °C for 24 hours. The disclosure halo was made using an iodine solution at 2% for 5 minutes. The enzymatic activity was evaluated according to the diameter of the halo produced by each fungus. Data from this study showed that all fungal amylase produced. The AF fungus had the best enzyme activity in the media. The PR and AT fungi showed lower production of starch in tap halo and corn starch, respectively.

**Marilene S. Lima<sup>2</sup>;**  
**Betânia, A. C. Santos<sup>2</sup>;**  
**Jéssica, M. M.Q. Soares<sup>1</sup>;**  
**Tamara, R. A. Lima<sup>1</sup>;**  
**Thayná, H. L. Silva<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Graduando em Engenharia de Alimentos. - Universidade Federal Rural de Pernambuco. Av. Bom Pastor, s/n, Boa Vista, Garanhuns PE, CEP. 55292-270.

<sup>2</sup> Professor do curso de Engenharia de Alimentos - Universidade Federal Rural de Pernambuco. Av. Bom Pastor, s/n, Boa Vista, Garanhuns PE, CEP. 55292-270. Email: marilnelima02@yahoo.com.br

Contato principal:

**Marilene S. Lima<sup>1</sup>**



**Palavras chave:** atividade enzimática, batata, milho, temperatura

**Keywords:** enzymatic activity, potato, corn, temperature



## INTRODUÇÃO

Ainda que, diretamente ou indiretamente, o homem já utilizava preparações enzimáticas há milhares de anos, seja de origem vegetal ou de origem animal (SHARMA *et al.*, 2001).

Enzimas são definidas como catalisadores de reações nos sistemas biológicos, tendo como objetivo aumentar a velocidade de uma reação. Apresentam alto grau de especificidade por seus substratos (LEHNINGER *et al.*, 2006).

A produção de enzimas, nos últimos anos, tem sido considerada um negócio altamente rentável na ordem de bilhões de dólares por ano e as enzimas produzidas a partir de microrganismos tem sido bastante explorada comercialmente. Ainda, enzimas, obtidas a partir de microrganismos apresentam vantagens por serem menos dispendiosas e menos prejudiciais ao meio ambiente, em relação ao uso de produtos químicos na indústria (PEREIRA, 2012). Além da vantagem, de se tratar um produto natural, as enzimas, apresentam atividade que pode ser regulada, como nível de concentração, pH e temperatura (BON *et al.*, 2008). Atualmente, grandes quantidades de amilases microbianas estão disponíveis comercialmente tendo uma aplicação quase completa na hidrólise do amido, auxiliando no processamento do mesmo dentro das indústrias (GUPTA, *et al.*, 2003; PANDEY, *et al.*, 2005).

Segundo Spier *et al.* (2006), dentre as diversas enzimas que são produzidas, as amilases são amplamente estudadas devido a sua importância na hidrólise do amido. Amilases são enzimas responsáveis pela quebra do amido e estão amplamente distribuídas na natureza. O amido é encontrado principalmente em sementes de cereais, como milho, trigo, arroz, e em tubérculos ou raízes, como batata e mandioca. São consideradas as enzimas mais importantes na hidrólise de glicídios. As amilases quebram as ligações glicosídicas presentes nas cadeias de amilose e amilopectina. São bastante utilizadas nas indústrias têxteis, de ração animal, cervejas, bebidas destiladas, panificação, cereais para alimentação infantil. (MORAES, 2004; PEREIRA, 2012).

De acordo com Pandey (2005), enzimas de origem microbianas encontram grande demanda industrial em detrimento daquelas oriundas de plantas e animais.

Diversos fatores devem ser considerados durante a produção de enzimas, tais como a composição do meio de cultivo, o substrato, a temperatura de incubação, o pH do meio de cultivo e de produção, a aeração e o uso de indutores, dentre outros. (THIRTY e CINGOLI, 2002;

LENINGHER *et al.*, 2006). De acordo com Pandey *et al.* (2000), as enzimas amilolíticas mais utilizadas são aquelas produzidas por fungos filamentosos.

Um dos parâmetros qualitativos para avaliar o potencial de fungos na produção de enzimas, consiste em verificar sua atividade enzimática em meio sólido. Essa análise qualitativa se dá basicamente pela medida do diâmetro da colônia e do halo de degradação produzido pelas enzimas (CESKA, 1971).

Assim, esse experimento objetivou avaliar o potencial de diferentes fungos filamentosos na produção de enzimas amilolíticas utilizando diferentes fontes de amidos.

## MATERIAL E MÉTODOS

Esse experimento foi conduzido no laboratório de ensino de biologia animal (LEBA) da Universidade Federal Rural de Pernambuco

### a) Microrganismos

Para a realização desse experimento, foram utilizados os seguintes fungos: *Aspergillus fumigatus* ATCC 6535 (AF), *Aspergillus tamarii* ATCC 2204 (AT), *Penicillium ocriseum* ATCC 6026 (PO), *Penicillium roquerti* ATCC 10110 (PR), *Aspergillus niger* (NA), isolado de caldo de feijão e *Rhizopus stolonifer* (RS), isolado de morango. Esses, foram repicados em meio BDA e levados a estufa a 30°C por 5 dias a fim de obter culturas jovens para o experimento.

### b) Amostra

Para a produção de amilases foi utilizado o amido de batata comercial (AB) e amido de milho (AM) adquiridos em supermercado local.

### c) Produção do extrato bruto enzimático

Para a produção do extrato bruto enzimático, um meio líquido, adaptado, foi preparado, com a seguinte composição (g/L): K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (5); (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (5); MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (1); Amido de trigo – 1%(p/v). Esse meio teve o pH ajustado para 5,5 com solução de NaOH a 0,1 Molar. Em seguida o meio foi autoclavado a 121°C por 15 minutos.

Foram feitas suspensões de cada fungo do tubo BDA com água destilada estéril e posteriormente transferidos para os *erlemeyers* com o meio líquido. Esses foram colocados em mesa agitadora (*shaker*) por 5 dias a 150 rpm. Após esse período, o extrato foi filtrado em gase estéril para obtenção do extrato enzimático bruto. O

extrato foi armazenado em freezer a  $-18^{\circ}\text{C}$  para posterior inoculação em meio sólido.

e) Teste da atividade enzimática

A atividade enzimática, consistiu na avaliação do potencial de produção das enzimas pelos fungos. O teste foi realizado utilizando um meio sólido produzido com os amidos de batata (AB) e amido de milho (AM) nas concentrações de 0,5%, 1%, e 1,5%, para cada amido. O meio teve a seguinte composição (g/L): Ágar bacteriológico (18g);  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – (5);  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  -  $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (1) e o amido testado a 0,5%, 1%, 1,5% (p/v). Esses meios foram autoclavados a  $121^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos. Em seguida foram vertidos em placas de *petri*. Posteriormente foram feitos *plugs* de 6mm no meio sólido. Uma alíquota de 80  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático, de cada fungo, foi colocado nos orifícios. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a  $35^{\circ}\text{C}$  por 24 horas. Após esse período, procedeu-se a revelação, utilizando-se uma solução de iodo a 2% por 5 minutos, a fim de visualizar a área de degradação. A atividade enzimática foi determinada semi quantitativamente medindo-se o diâmetro do halo de degradação em torno de cada *cup plate*, em milímetros, com régua milimetrada (TAVARES *et al*, 2012).

As análises foram realizadas em triplicata. Os resultados foram avaliados, comparando as médias através da análise de variância ANOVA Statgraphics Centurium XVI versão 16.2.04 ( $p < 0,05$ ).

**RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os dados da atividade enzimática dos diferentes fungos, em diferentes meios podem ser vistos nas Tabelas 1 e 2. Conforme Tabela 1, praticamente não houve diferença estatística, nas diferentes concentrações de cada fungo testados. A diferença foi observada apenas entre as concentrações do fungo RS, no qual observou-se que 1% e 1,5% obtiveram maior produção do halo em relação a concentração 0,5%. Quando a atividade enzimática foi comparada entre diferentes fungos, observou-se que AF a 0,5%, 1% e AN 0,5% obtiveram os maiores diâmetros de halo em relação aos demais fungos. O *Penicillium roquefort* (PR) obteve os menores resultados (Tabela 1) principalmente quando utilizou-se a maior concentração de amido de batata (1,5%).

A atividade enzimática dos diferentes fungos filamentosos em meio de amido de milho pode ser vista na Tabela 2. Analisando as concentrações, dentro de cada grupo, observa-se que na concentração de 1,5% houve

maior produção de halos. Quando a comparação foi feita entre os fungos, verificou-se que os fungos AF (16mm), AN (12,6 mm) e RS (12,6mm) obtiveram os melhores resultados, sendo o AF o melhor produtor. O fungo AT obteve a menor produção quando testado com amido a 1%. Apesar do RS não ter sido o melhor produtor, pode-se verificar que houve bom desempenho na produção de halo quando comparado aos demais (Tabela 2), corroborando com Pandey *et al* (1999). Os mesmos citam o *Rhizopus sp* como um dos melhores produtores de amilases.

Tabela 1. Atividade enzimática (mm) de diferentes fungos filamentos, utilizando o amido de batata (AB) em diferentes concentrações a  $35^{\circ}\text{C}$ .

FUNGOS	CONCENTRAÇÕES DO AMIDO (%)		
	0,5	1	1,5
AF	12,0±1,0 <sup>aA</sup>	11,3±1,1 <sup>aA</sup>	10,6±1,1 <sup>aE</sup>
AT	7,0±1,4 <sup>aC</sup>	5,3±1,1 <sup>aF</sup>	6,6±3,0 <sup>aB</sup>
NA	11,0±0,8 <sup>aA</sup>	8,60,7 <sup>aD</sup>	8,60,7 <sup>aD</sup>
PO	8,0±0,0 <sup>aD</sup>	6,6±1,1 <sup>aB</sup>	6,6±2,3 <sup>aB</sup>
PR	6,0±0,0 <sup>aB</sup>	6,6±1,1 <sup>aB</sup>	5,3±3,0 <sup>aF</sup>
RS	7,3±2,3 <sup>aC</sup>	10,0±0,0 <sup>bE</sup>	10,0±3,4 <sup>bE</sup>

AB- amido de batata; AF. *Aspergillus fumigatus* 6535, AT- *Aspergillus tamarii* 2204, AN- *Aspergillus niger*, PO – *Penicillium ohriseum* 6026, PR – *Penicillium roqueforti* 10110, RS- *Rhizophus stolonifer*. \*Letras iguais indicam não haver diferença significativa ( $P > 0,05$ ); Letras minúsculas – comparação das diferentes concentrações; Letras maiúsculas – comparação dos diferentes fungos.

Tabela 2. Atividade enzimática (mm) de diferentes fungos filamentos, utilizando o amido de milho (AM) em diferentes concentrações a  $35^{\circ}\text{C}$ .

FUNGOS	CONCENTRAÇÕES DO AMIDO (%)		
	0,5	1	1,5
AF	10,0±2,8 <sup>aF</sup>	11,3±1,1 <sup>aA</sup>	16,0±0,0 <sup>bD</sup>
AT	9,0±4,2 <sup>bE</sup>	4,6±1,1 <sup>aB</sup>	9,3±1,1 <sup>bE</sup>
NA	10,0±0,0 <sup>bF</sup>	8,0±0,0 <sup>aE</sup>	10,6±1,1 <sup>bF</sup>
PO	6,0±0,0 <sup>aC</sup>	6,6±1,1 <sup>aC</sup>	12,6±1,1 <sup>bA</sup>
PR	6,0±0,0 <sup>aC</sup>	7,3±1,1 <sup>aC</sup>	9,3±3,0 <sup>bE</sup>
RS	10,0±0,0 <sup>aF</sup>	10,0±0,0 <sup>aF</sup>	12,6±3,0 <sup>aA</sup>

AM- amido de milho; AF. *Aspergillus fumigatus* 6535, AT- *Aspergillus tamarii* 2204, AN- *Aspergillus niger*, PO – *Penicillium ohriseum* 6026, PR – *Penicillium roqueforti* 10110, RS- *Rizophus stolonifer*. \*Letras iguais indicam não haver diferença significativa ( $P > 0,05$ ); Letras minúsculas – comparação das diferentes concentrações; Letras maiúsculas – comparação dos diferentes fungos.

Os resultados desse experimento estão acima dos encontrados resultados por Firmino e Furtado (2014), que testou a produção de amilases com vários isolados do fungo *Ceracystis spp*. Esse conseguiu a produção média

de 1mm de diâmetro da atividade pelas amilases produzidas. Souza *et al* (2008), avaliaram a produção de amilases em diferentes basidomicetos utilizando o farelo de trigo como substrato e conseguiram uma média de 27,5 mm de halo para o *Daedalea sp. 4E6*. Tavares *et al* (2012) conseguiram uma média de 29 mm de halo quando utilizaram os *Aspergillus* N34 e N35, isolados *Morinda citrifolia L.* Esses resultados estão bem acima dos dados encontrados nesse estudo. Soares *et al.* (2010), em um estudo com amilases, sugerem que que condições estressantes, ao fungo, possam influenciar no aumento da produção enzimática. Isso poderia explicar a baixa produção enzimática encontrada no nosso experimento, já que composição do meio mineral continha muitas fontes nutritivas, o que não tornaria um ambiente estressante para o fungo.

Fatores como temperatura e faixa de pH, são de extrema importância na produção de enzimas, devendo, portanto, avaliar essas condições para um melhor desempenho reacional das enzimas (POLLIZELLI *et al*, 2005).

## CONCLUSÕES

Os dados desse experimento mostraram que todos os fungos testados, produziram amilases nos meios testados. O fungo AF apresentou a melhor atividade enzimática nos amidos batata e milho. O fungo PR, no amido de batata, e o fungo AT, no amido de milho, mostraram menor produção de halo sob as condições desse experimento.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BON, E.P.S.; FERRARA, M.A.; CORVO, M.L. Enzimas em biotecnologia – produção, aplicações e mercado. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2008, 506p.

CESKA, M. Enzymatic catalysis of solidified media. **European Journal Biochemistry**, v. 22, n. 2, p. 186-192, 1971.

FIRMINO, A. C.; FURTADO, E. L. Produção de enzimas extracelulares por *Ceratocystis spp.* **Summa Phytopathology**, v. 40, n. 4, p. 371-374, 2014.

GUPTA, R. ; MOHAPATRA, H. ; GOSWAMI, V.K. ; CHAUHAN, B. Microbial  $\alpha$ -amylases: a biotechnological perspective. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 1599-1616, 2003.

LEHNINGER, A. L. NELSON, DAVID L., COX, MICHAEL M. Bioquímica: Princípios de bioquímica. 4. ed. São Paulo: Sarvier. 2006. 1202 p.

MORAES, L. M. P. Amilases. In: SAID, S.; PIETRO, R. (Ed.). Enzimas como agentes biotecnológicos. **Ribeirão preto: Legis Summa**. 2004.

PANDEY, A.; WEBB, C.; SOCCOL, C. R.; LARROCHE, C. Enzyme Technology. **New Delhi: Asiatech Publishers, Inc**, 2005. 760p.

PANDEY, A.; SOCCOL, C.R. ; SOCCOL, V.T. ; SINGH, D. ; MOHAN, R. Advances in Microbial Amylases. **Biotechnol. Appl. Biochem.** v. 31, p. 135-152, 2000.

PEREIRA, V. M. Avaliação do potencial enzimático de fungos filamentosos e otimização da produção de celulase por *Aspergillus sulphureus*, **Lavras, UFLA**, 2012.

POLIZELLI, M.L.; RIZZATTI, A.C.; MONTI, R.; TERENCEZI, H.; JORGE, J. AMORIM, D. Xylans and xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Appl. Microbial. Biotechnol.**, v. 67, n. 5, p. 577-591, 2005.

SOARES, I. A.; FLORES, A. C.; ZANETTIN, L.; PIN, H. K.; MENDONÇA, M. M.; BARCELOS, R. P.; TREVISOL, L.R.; CARVALHO, R. D.; SCHAUREN, D.; ROCHA, C. L. M. S. C. BARONI, S. Identificação do potencial amilolítico de linhagens mutantes do fungo *Aspergillus nidulans*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 3, p. 700-705, 2010.

SPIER, M.R.; WOICIECHOWSKI, A .L.; VANDENBERGUE, L.; SOCCOL, C.R. Production and characterization of amylases by *Aspergillus niger* under solid fermentation using agro industrials products. **Int. J. Food Eng.**, 2: 6-1-19, 2006.

SOUZA, H.Q; OLIVEIRA, L. A.; ANDRADE, J. S. Seleção de basidiomycetes da Amazônia para a produção de enzimas de interesse biotecnológico. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, p. 116-124, 2008.

THIRY, M.; CINGOLANI, D. Optimizing scale-up fermentation process. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v.20, n.3, 2002.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Production, purification, characterization, and application of lipases. **Biotechnology Advances**, New York, v. 19, n. 8, p. 627-662, Dec. 2001.

TAVARES, A. C. D.; FONSECA, J. S.; FONSECA, T. R. B.; BARRONCAS, J. F.; SOUZA, R. A. T.; SILVA, T. A.; TEIXEIRA, M. F. S. Extracellular Enzymes of Anamorphic fungi Isolated from *Morinda citrifolia* L. **Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 1, n. 2, p 1-6, 2012.