

# XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

## Padronização do Cultivo do Micro-organismo *Aspergillus sp.* M2.3 para a Produção de Amilases

Izabela Nascimento Silva<sup>1</sup>, Liliane Tamires Alves Silva<sup>1</sup>, Mariana Tainná Silva Souza<sup>1</sup>,  
Barbhara Mota Marinho<sup>1</sup> e Vivian Machado Benassi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal dos Vales de Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM) *campus* Janaúba  
Instituto de Engenharia, Ciência e Tecnologia (IECT), 39440-000, Janaúba - MG  
E-mail para contato: belanascimento26@gmail.com

### RESUMO

*A utilização de enzimas na indústria tem crescido nos últimos anos, sendo utilizadas em melhorias nos processos para obtenção de produtos com maior qualidade. Objetivou-se padronizar o cultivo do micro-organismo *Aspergillus sp.* M2.3 para uma maior produção amilolítica. Analisou-se distintos meios de cultura, tempo de crescimento e a composição das soluções de sais do meio padronizado, os meios foram mantidos durante cinco dias à 30°C, em estufa bacteriológica. Para a determinação da atividade enzimática foi utilizado o método sacarificante, o substrato foi amido 1% em tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0 à 55°C. Observou-se que o meio CP foi o melhor para o crescimento e produção amilolítica, assim como, dentre as soluções de sais analisadas visualizou-se que os sais do próprio meio foram ideais para o crescimento fúngico e produção enzimática, em cultivos mantidos durante 7 dias. Assim o fungo e a amilase apresentam um grande potencial biotecnológico.*

Palavras-chave: Fungo filamentosos, Enzima, Amilase.

### INTRODUÇÃO

A prospecção de fungos filamentosos produtores de altos níveis de enzimas de interesse industrial em solo brasileiro ainda é um tema pouco explorado e de potencial interesse biotecnológico. Assim como, o conhecimento bioquímico e estrutural das amilases é necessário para a investigação da relação estrutura e mecanismo de ação destas biomoléculas. Os estudos com enzimas apresentam alternativas indubitáveis para a resolução de problemas nos mais diversos campos industriais e preservacionistas, possibilitando a substituição de reagentes químicos caros e altamente poluentes para o meio ambiente, por um produto que, após o uso, é facilmente degradável e, dessa maneira, não provoca danos à natureza (PASIN *et al.*, 2014). O uso de enzimas em processos industriais deve ser precedido, necessariamente, do estudo do micro-organismo para obtenção de uma maior produção enzimática. O objetivo desse trabalho foi identificar linhagens fúngicas, coletadas e isoladas na cidade de Janaúba, no Norte de Minas Gerais, que produzam enzimas amilolíticas, posteriormente, padronizar as condições ideais de cultivo do fungo para uma maior produção enzimática.

# XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

## MATERIAL E MÉTODOS

A partir da coleção de culturas do laboratório, foram selecionados quatro linhagens de fungos filamentosos (M1.5, M1.6, M2.3 e M2.4), todos coletados e isolados na cidade de Janaúba, localizada no Norte de Minas Gerais, para a determinação do potencial amilolítico de cada uma delas. Os fungos foram cultivados em meio proposto pela Simone de Carvalho Peixoto - Meio CP (PEIXOTO *et al.*, 2003), suplementado com amido 1,5% (m/v) como fonte de carbono, mantidos a 30°C, de forma estacionária, por 5 dias.

Após análises preliminares, 2 fungos considerados promissores foram selecionados e cultivados em diferentes meios de cultura líquidos, para a realização dos testes de padronização. Foram testados os meios de cultivo Czapek modificado (WISEMAM, 1975), CP (PEIXOTO *et al.*, 2003), meio proposto pela Ana C. Segato Rizzatti – Meio SR modificado (RIZZATTI *et al.*, 2001) e Khanna modificado (KHANNA *et al.*, 1995). As culturas foram obtidas mediante inóculo de 1,0 mL de suspensão de esporos, contendo  $3,6 \times 10^3$  esporos/mL, em 25 mL de meio. A fermentação ocorreu a 30°C, de forma estacionária, por 5 dias.

Em seguida, analisou-se diferentes soluções de sais no meio de cultura CP, sendo esses: (1) os próprios sais do meio CP (0,03 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e 0,05 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ ); (2) 0,05 g de Sais Wesson e (3) ambos os sais adicionados ao meio. Os meios foram mantidos durante sete dias de forma estacionária, a 30°C, sendo a dosagem enzimática realizada a cada 24 horas.

Para a realização da quantificação da atividade enzimática utilizou-se 1% (m/v) amido Dinâmica®, em tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0. A determinação da atividade enzimática foi possível através da detecção dos açúcares redutores formados durante a incubação do extrato enzimático bruto com o substrato a 55°C, por 5 minutos, pelo método de DNS (MILLER, 1959) e lida em espectrofotometricamente a 540 nm. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para gerar 1  $\mu\text{mol}$  de produto por minuto, nas condições de ensaio, a atividade total (U total) =  $\mu\text{mol/mL} \times$  volume do filtrado. O método foi previamente padronizado por uma curva padrão de glicose (0,1 a 1,0 mg/mL).

## RESULTADOS E DISCUSSÕES

As linhagens de fungos M1.5, M1.6, M2.3 e M2.4, foram cultivados em meio CP, durante 5 dias de forma estacionária a 30°C, observando-se que após o tempo decorrido de crescimento, o fungo M2.3, que apresentou maior produção de amilase, atingindo um máximo de 6,58 U totais (Tabela 1). Os fungos M1.5 e M1.6 não apresentaram uma boa produção de amilases quando comparado com M2.3, atingindo valores de 0,52 U totais e 0,61 U totais, respectivamente (Tabela 1).

Tabela 1 - Determinação do fungo para produção de amilase.

| Fungos | pH final meio | Volume (mL)  | Massa (g)    | Atividade Total (U total) |
|--------|---------------|--------------|--------------|---------------------------|
| M1.5   | 8,13          | 12,70        | 0,226        | 0,52                      |
| M1.6   | 6,69          | 16,70        | 0,097        | 0,61                      |
| M2.3   | <b>6,76</b>   | <b>17,83</b> | <b>0,219</b> | <b>6,58</b>               |
| M2.4   | <b>4,82</b>   | <b>16,83</b> | <b>0,147</b> | <b>4,70</b>               |

## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Ao observar que os fungos M2.3 e M2.4 mostraram-se potenciais produtores de amilases, objetivou-se analisar qual dos dois micro-organismos produzissem amilases com maior atividade, e qual o melhor meio de cultura para cultivo dos organismos. Então, foram testados distintos meios, sendo esses: SR modificado (RIZZATTI *et al.*, 2001), Czapek modificado (WISEMAM, 1975), CP (PEIXOTO *et al.*, 2003) e Khanna modificado (KHANNA *et al.*, 1995), os quais foram mantidos durante 5 dias, a 30°C, de forma estacionária.

De acordo com os resultados obtidos, o meio CP foi claramente o melhor meio para a produção da amilase pelo fungo *Aspergillus sp.* M2.3, com uma atividade de 68,68 U totais, seguido do meio SR, com 29,5 U totais, apresentando uma atividade enzimática de 57% mais baixa em relação à atividade do meio CP (Tabela 2).

Tabela 2 - Determinação do meio de cultura do *Aspergillus sp.* M2.3 para produção de amilase.

| Meios de Cultura Líquidos Testados | Atividade Total (U total) |
|------------------------------------|---------------------------|
| <b>CP</b>                          | <b>68,68</b>              |
| Khanna modificado                  | 0,90                      |
| Czapeck modificado                 | 0,90                      |
| SR modificado                      | 29,50                     |

Enquanto que, pode-se verificar que o fungo *Aspergillus sp.* 2.4 mostrou-se produzir amilase com maior atividade total em meio de cultura SR modificado, com uma atividade 21,23 U totais. Entretanto, essa atividade foi 70% inferior à atividade observada pelo *Aspergillus sp.* M2.3. Dessa forma, o fungo M2.3 foi o padronizado para desenvolvimento desse trabalho.

Tabela 3 - Determinação do meio de cultura do *Aspergillus sp.* 2.4 para produção de amilase.

| Meios de Cultura Líquidos Testados | Atividade Total (U total) |
|------------------------------------|---------------------------|
| <b>CP</b>                          | <b>14,72</b>              |
| Khanna modificado                  | 5,35                      |
| Czapeck modificado                 | 0                         |
| <b>SR modificado</b>               | <b>21,23</b>              |

Após determinação do melhor meio de cultura e do micro-organismo para continuação do trabalho, sendo esses o Meio CP e o fungo M2.3, fez-se a determinação da composição de sais no meio e a análise da influência do tempo de crescimento do fungo em relação à produção enzimática.

Para isso, o fungo *Aspergillus sp.* M2.3 foi cultivado em meio CP com diferentes soluções de sais: (1) com solução de sais do próprio meio CP; (2) solução de sais CP com o acréscimo da solução de sais Wesson e (3) meio CP apenas com sais de Wesson, os meios foram mantidos em estufa bacteriológica, a 30°C, durante sete dias, sendo retirado o meio e dosado a atividade enzimática a cada 24 horas.

## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Pode-se observar que a solução de sais que mostrou maior desempenho para o crescimento do micro-organismo e produção enzimática foi a solução de sais do próprio meio CP, adquirindo uma atividade enzimática 74% maior que a atividade da amilase quando o fungo foi cultivado em meio CP acrescido de sais de Wesson, com atividade de 21 U totais. Enquanto que, o meio CP apenas com a solução de sais Wesson teve a menor atividade em relação a todos os outros meios, sendo cerca de 86,5% menor que o meio CP (Figura 1).

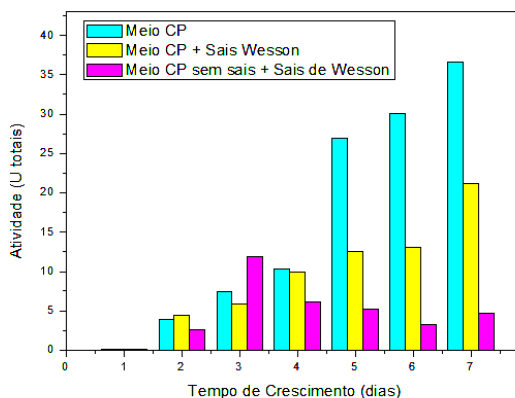


Figura 1 - Análise da influência do tempo de crescimento e da solução de sais do meio CP no cultivo do *Aspergillus sp.* M2.3 para uma maior produção amilolítica.

### CONCLUSÕES

Concluindo-se que o fungo *Aspergillus sp.* M2.3, coletado e isolado no Norte de Minas Gerais, demonstrou produzir uma amilase com alta atividade extracelular após a padronização de algumas condições de cultivo como o meio de cultura para crescimento fúngico, composição da solução de sais do Meio CP, e o tempo de crescimento do micro-organismo.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Pasin TM, Benass, VM, Moreira EA, Jorge JA, Polizeli MLTM. 2014. Prospecting Filamentous Fungi for Amylase Production: Standardization of *Aspergillus japonicus* Culture Conditions. *British Biotechnology Journal*. 4(4): 482-498.
- Khanna P, Sundari SS, Kumar, N.J. 1995. Production, isolation and partial purification of xylanase from *Aspergillus sp.* *World J. Microbiol. Biotechnol*, 11: 242-243.
- Peixoto SC, Jorge JA, Terenzi HF, Polizeli MLTM. 2003. *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis*: a thermotolerant fungus with potential for production of thermostable amylases. *Int. Microbiol.* 6: 269-273.
- Rizzatti ACS, Jorge JA, Terenzi HF, Rechia CGV, Polizeli MLTM. 2001. Purification and properties of a thermostable extracellular  $\beta$ -D-xylosidase produced by thermotolerant *Aspergillus phoenicis*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 26: 156-160.
- Wiseman A. 1975. *Handbook of enzyme biotechnology*. Ellis Horwood Ltd John Wiley & Sons, p.148.