



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Seleção do Fungo Filamentoso Produtor de Amilase e Padronização das Condições de Cultivo

Mariana Tainná Silva Souza¹, Liliane Tamires Alves Silva¹ e Vivian Machado Benassi¹

¹Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM) *campus* Janaúba
Instituto de Engenharia, Ciência e Tecnologia (IECT), Janaúba – MG
E-mail: marianatainna12@gmail.com

RESUMO

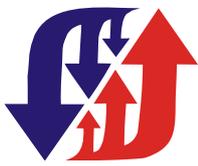
*Há uma grande busca por novas fontes de enzimas para uso industrial, concomitantemente existem muitos fungos filamentosos ainda não identificados, muitos dos quais podem ser organismos promissores para aplicações industriais. Diante disto, objetivou-se selecionar o micro-organismo melhor produtor de amilases e padronizar o cultivo deste fungo para uma maior produção enzimática. Quatro distintos meios de cultura foram testados, assim como analisou quatro diferentes soluções de sais componentes do meio de cultura. A atividade foi determinada utilizando-se amido 1% em tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0, 50°C. O fungo que apresentou maior atividade enzimática foi o *Penicillium M1.7.2*, em meio CP (412 U totais) e a solução de sais que proporcionou maior atividade enzimática foi a própria componente do meio CP. Conclui-se que um fungo bom produtor de amilases foi isolado e através da otimização do cultivo deste, obtém-se alta produção desta enzima.*

Palavras-chave: Fungo Filamentoso, Enzima, Amilases, Otimização.

INTRODUÇÃO

A necessidade de desenvolvimento potencial para uso biotecnológico levou a procura de fontes mais ricas de enzimas como, por exemplo, micro-organismos com possíveis aplicações industriais (LOGUERCIO-LEITE *et al.*, 2006; PASIN, 2015). Os fungos filamentosos alimentam-se transportando os nutrientes (compostos de baixo peso molecular) através da membrana plasmática. Para isso, eles secretam enzimas, que hidrolisam as macromoléculas (substrato) presentes até atingirem a forma e a solubilidade necessária para que sejam transportadas pela membrana (PUTZKE E PUTZKE, 2002). Um dos tipos de enzimas secretadas pelos fungos são as amilases, enzimas de grande importância na biotecnologia atual.

A aplicação industrial de enzimas é determinada pela sua especificidade, atividade, estabilidade de armazenamento e uso, disponibilidade e custos. A atividade de uma enzima é determinada pela sua concentração e do seu substrato, concentração de cofatores, a presença, concentração e tipos de inibidores, potencial iônico, pH, temperatura e tempo de reação (SAID e PIETRO, 2010).



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Dessa forma, esse trabalho objetivou padronizar o cultivo do fungo *Penicillium* M1.7.2. para uma maior produção enzimática, sendo analisado o melhor meio de cultivo e a composição de sais do meio.

MATERIAL E MÉTODOS

A coleta do material para análise dos micro-organismos foi realizada no Norte de Minas Gerais, na cidade de Janaúba, onde foram coletados três materiais distintos, destas amostras, 21 fungos filamentosos foram isolados. Os fungos filamentosos foram caracterizados macroscopicamente, dentre estes, foram escolhidos quatro fungos para análise da produção amilolítica, sendo estes M1.3, M1.8, M1.7.2 e M1.11 todos pertencentes ao gênero *Penicillium*. Padronizou-se o organismo M1.7.2, que comparado aos demais fungos filamentosos isolados foi o que obteve melhor produção amilolítica em meio de cultura líquido CP, durante 5 dias, a 30°C.

Testaram-se diferentes meios de cultura líquidos, sendo eles SR modificado (RIZZATTI *et al.*, 2001), Czapek modificado (WISEMAM, 1975), CP (PEIXOTO *et al.*, 2003) e Khanna modificado (KHANNA *et al.*, 1995). As culturas foram obtidas mediante inóculo de 1,0 mL de solução de esporos em 25 mL de meio, previamente autoclavados durante 20 minutos a uma pressão de 1,5 atm e temperatura de 120°C. O crescimento ocorreu em estufa bacteriológica, de forma estacionária, a 30°C, por quatro dias.

Em seguida, analisou-se diferentes soluções de sais no meio de cultura CP, sendo essas: (1) os próprios sais do meio CP (0,03 g de KH_2PO_4 e 0,05 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$); (2) solução de sais do meio Khanna; (3) 0,05 g de Sais Wesson e (4) os sais CP e Wesson acrescidos juntos no meio. Os meios foram mantidos durante seis dias em estufa bacteriológica, de forma estacionária, a 30°C, sendo a dosagem enzimática realizada a cada 24 horas.

Para a realização da quantificação da atividade enzimática foi utilizando como substrato o amido Dinâmica®, na concentração de 1% em tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0. A determinação ocorreu através da formação dos açúcares redutores durante a incubação da enzima com o amido, utilizando-se o reagente DNS (ácido 3',5'-dinitrosalicílico) (MILLER, 1959), a 55°C. O método foi previamente padronizado por uma curva padrão de glicose (0,1 a 1,0 mg/mL), sendo a unidade de atividade (U) definida como a quantidade de enzima que hidrolisa um μmol de substrato por minuto, nas condições de ensaio. A atividade total (U total) = $\mu\text{mol/mL} \times \text{volume do filtrado}$.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Objetivou-se selecionar o micro-organismo melhor produtor de amilases através de análise da produção amilolítica dos quatro fungos, previamente selecionados dentre os 21 isolados. Para isso, os fungos 1.3, 1.7.2, 1.8 e 1.11 foram inoculados em meio de cultura CP PEIXOTO *et al.*, 2003) e mantidos em estufa bacteriológica a 30°C, por quatro dias, de forma estacionária. Após a filtração foi realizada a dosagem da atividade enzimática por determinação de açúcares redutores.

Observou-se que dentre os quatro micro-organismos testados em meio CP, o fungo *Penicillium* M1.7.2 mostrou-se ser o fungo com maior produção de amilases (412 U totais),



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

seguido do *Penicillium* M1.3 com, aproximadamente, 59 U totais, representando 14% da atividade visualizada pelo organismo M1.7.2 (Tabela 1). Dessa forma, padronizou-se o fungo *Penicillium* M1.7.2 para o desenvolvimento do trabalho.

Tabela 1. Determinação do fungo para produção amilolítica.

Fungo	Atividade amilolítica (U totais)
1.3	59,203
1.7.2	411,849
1.8	1,055
1.11	54,873

Objetivando padronizar o cultivo do fungo M1.7.2 para uma maior produção enzimática, o fungo foi inoculado em quatro meios de cultura distintos: SR modificado (RIZZATTI *et al.*, 2001), Czapek modificado (WISEMAM, 1975), CP (PEIXOTO *et al.*, 2003) e Khanna modificado (KHANNA *et al.*, 1995), estes foram mantidos em estufa bacteriológica, de forma estacionária, a 30 °C, por quatro dias. Passados estes dias, os meios foram filtrados e a quantidade de enzimas presentes em cada meio, foi determinada.

Como pode ser visto na Tabela 2, o meio CP proporcionou a melhor produção enzimática (cerca de 362 U totais), claramente o meio preferencial para o cultivo do fungo M1.7.2, seguido do meio SR (cerca de 150 U totais), representando cerca de 65% menor atividade quando comparada com o meio CP. Então, padronizou-se o cultivo do fungo M1.7.2 em meio CP, durante quatro dias

Tabela 2. Produção de amilases em diferentes meios de cultura líquidos pelo fungo *Penicillium* M1.7.2.

Meios de cultura	Atividade amilolítica (U totais)
CP	361,73
Khanna modificado	64,22
SR modificado	150,34
Czapek modificado	15,16

Objetivando aumentar a produção amilolítica pelo fungo *Penicillium* M1.7.2, foram testados quatro distintas soluções de sais do Meio CP, (1) os próprios sais do meio CP (0,03 g de KH_2PO_4 e 0,05 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$); (2) solução de sais do meio Khanna; (3) 0,05 g de Sais Wesson e (4) os sais CP e Wesson acrescidos juntos no meio. Os meios foram mantidos durante seis dias em estufa bacteriológica, de forma estacionária, a 30°C, sendo a dosagem enzimática realizada a cada 24 horas.

Dentre as soluções de sais do meio CP analisados, verificou-se que o melhor tempo de crescimento e produção enzimática do fungo *Penicillium* M1.7.2 foi de seis dias, a 30°C, com exceção do meio CP com sais CP + sais Wesson, que foi de cinco dias. Assim como, observou-se que o Meio CP com seus próprios sais foi favorável à produção amilolítica, com



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

621,4 U totais, seguido do meio CP contendo sais do próprio meio e sais de Wesson, com 512,3 U totais (Tabela 3).

Tabela 3. Screening de amilases em meio com solução de sais CP.

Tempo de crescimento (dias)	Atividade (U totais) Sais CP	Atividade (U totais) Sais Khanna	Atividade (U totais) Sais Wesson	Atividade (U totais) Sais CP + Wesson
1	18,4	13,0	8,4	45,8
2	237,2	321,6	103,5	268,7
3	462,9	360,3	34,3	368,5
4	479,9	340,3	149,2	379,0
5	486,7	426,2	144,6	512,3
6	621,4	465,1	261,1	465,2

CONCLUSÕES

Concluiu-se que o trabalho é de interesse científico, uma vez que o fungo *Penicillium* M1.7.2 apresentou expressiva atividade amilolítica após a padronização de alguns parâmetros físicos-químicos de seu cultivo. O meio selecionado foi o CP com seus próprios sais, visto que a maior produção enzimática ocorreu neste meio, após seis dias de crescimento, a 30°C, de forma estacionária. Estes resultados demonstram que o fungo M1.7.2 é um micro-organismo potencial para produção de amilases, enzimas tão importantes para a indústria alimentícia.

APOIO FINANCEIRO

CICT/CNPq 001/2015 (PIBIC)

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Loguercio-Leite, C., Groposo, C., Dreschler-Santos, E. R., Figueiredo, N., Godinho, P. S., Abrão, R. L. 2006. A particularidade de ser um fungo – I. Constituintes celulares. *Biotermas*. 19(2): 17-27.
- Pasim, T. M. 2015. Prospecção, purificação e propriedades funcionais de uma glucoamilase de *Aspergillus japonicus*: Aplicação do extrato enzimático em reciclagem de papel. 02p.
- Putzke, J. E Putzke, M. T. L. 2002. O Reino dos Fungos. Vol. 2. Ed. da Universidade de Santa Cruz do Sul. Rio Grande do Sul.
- Said, S.; Pietro, R. Enzimas de interesse industrial e biotecnológico. 2ª ed. Ed. *Legis Summa* Ribeirão Preto, 2010. 160p.
- 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 β -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.