

## **Produção de amilase por fungo filamentosso endofítico em fermentação submersa**

**Luciana Amaral de Faria Silva<sup>1\*</sup>, Silmara Almeida de Carvalho<sup>2</sup>, Daniel Florêncio Filho<sup>3</sup>, Mariana Ferreira Alves<sup>1</sup>, Niebly Loren Tófolo Silva<sup>4</sup>, Joelton Rocha Gomes<sup>5</sup>, Kalila Silva Santos<sup>5</sup>**

### **Resumo**

As amilases são um grupo de hidrolases que catalisam as ligações  $\alpha$ -glicosídicas em amido e estão entre as enzimas de maior importância para a biotecnologia, encontrando demanda industrial crescente. O objetivo desse trabalho foi avaliar a produção de amilase por fungo filamentosso endofítico, através de fermentação submersa com agitação (FSA) e estática (FSE). Foi realizada uma seleção primária com 6 cepas diferentes por meio da análise de halo de hidrólise para verificar qual delas tinha capacidade de produzir a enzima amilase. A cepa que apresentou maior halo de hidrólise foi selecionada para etapa de seleção secundária, submetida ao processo fermentativo por 24h, 48h, 72h, 96h, 120h, 144h e 168 horas. Em seguida, foi determinada a atividade enzimática, baseado na atividade sacarificante das amilases. A maior atividade enzimática (0,47UA) foi observada no tempo de 72h e a menor (0,34UA), em 48h. Não foi verificada a produção de amilase a partir da FSE em nenhum tempo de fermentação. Mostra-se, portanto, que para esta situação o período de fermentação deverá ser prolongado para a obtenção da enzima.

**Palavras-chave:** Cepa. Enzima. Halo de hidrólise. Processo fermentativo.

## **Production of amylase by endophytic filamentous fungi by submerged fermentation**

### **Abstract**

Amylases are a group of hydrolases that catalyze  $\alpha$ -glycosidic bonds in starch and are among the enzymes of major importance for biotechnology, meeting growing industrial demand. The objective of this work was to evaluate the amylase production by endophytic filamentous fungus, through submerged fermentation with shaking (SFSHA) and static (SFSTA). A primary selection with 6 different strains was performed by halo hydrolysis analysis to verify which of them had the ability to produce the amylase enzyme. The strain with the highest hydrolysis halo was selected for the secondary selection stage, submitted to the fermentation process for 24h, 48h, 72h, 96h, 120h, 144h and 168h. Then the enzymatic activity, based

---

<sup>1</sup>Doutoranda em Engenharia e Ciência de Alimentos – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB

\*Autora para correspondência: lucianadefaria@gmail.com

<sup>2</sup>Professora Titular – Departamento de Ciências Exatas e Naturais (DCEN) – UESB

<sup>3</sup>Mestrando em Química – UESB

<sup>4</sup>Graduanda em Engenharia de Alimentos – UESB

<sup>5</sup>Graduando em Farmácia - UESB

**Recebido para publicação em 15 de novembro de 2017**

**Aceito para publicação em 15 de dezembro de 2017**

on the saccharifying activity of the amylases, was determined. The highest enzymatic activity (0.47UA) was observed in 72h and the lowest (0,34UA) in 48h. No amylase production was verified from the SFSTA at no fermentation time. It is shown, therefore, that for this situation the fermentation period should be extended to obtain the enzyme.

**Keywords:** Strain. Enzyme. Halo hydrolysis. Fermentative process.

## Introdução

As amilases são um grupo de hidrolases que catalisam as ligações  $\alpha$ -glicosídicas em amido e classificam-se em  $\alpha$ -amilase,  $\beta$ -amilase e amiloglucosidase. A  $\alpha$ -amilase quebra ligações  $\alpha$  (1,4) dos polissacarídeos que possuem três ou mais unidades de D-glucose em união  $\alpha$ -1,4. A  $\beta$ -amilase hidrolisa as ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4 de polissacarídeos a partir da extremidade não-redutora sobre a penúltima ligação óxido, separando duas unidades de glicose na forma de  $\beta$ -maltose, por uma inversão. Por fim, a amiloglucosidase, é uma enzima extracelular que rompe as ligações  $\alpha$ -1,4 e  $\alpha$ -1,6 do amido a partir da extremidade não redutora até glucose. As amilases estão entre as enzimas de maior importância para a biotecnologia, encontrando demanda industrial crescente e destaca-se por suas aplicações na indústria de celulose, durante o acabamento final do papel, na produção de pães, melhorando a cor e a maciez do produto final, e na produção de cervejas claras. As amilases podem ser obtidas de diferentes fontes, incluindo plantas, animais e micro-organismos, sendo os fungos filamentosos e as bactérias os principais produtores (SANTANA *et al.*, 2012; SELVAN *et al.*, 2016).

A produção de enzimas por processos fermentativos, pode ocorrer de duas formas: por fermentação submersa (FS) e por fermentação em estado sólido (FES). Neste artigo, a técnica apresentada foi a FS, principalmente devido à facilidade de crescimento dos microrganismos em condições controladas de pH e temperatura e por ser fácil a recuperação das enzimas extracelulares (FEITOSA, 2009).

No processo fermentativo líquido, o desenvolvimento de micro-organismos ocorre na presença de água livre e as fontes de nutrientes utilizadas são solúveis. O conteúdo de água nesse processo é superior a 95%. Já na FES, o cultivo dos micro-organismos é feito em substrato sólido contendo umidade suficiente para manter o crescimento e o metabolismo (RODRIGUES; SANTANA, 2001; FEITOSA, 2009).

Diante da crescente aplicabilidade de enzimas, faz-se necessário estudos que busquem micro-organismos capazes de produzirem-nos, e o estudo com fungos filamentosos endofíticos pode possibilitar o conhecimento acerca de novas moléculas e de novas espécies produtoras de enzimas.

Por apresentarem facilidade de cultivo, os fungos filamentosos se destacam, pois conseguem secretar suas enzimas diretamente no meio em que se encontram, não carecendo de ruptura celular para sua liberação (POLIZELI *et al.*, 2005, GUIMARÃES *et al.*, 2006).

Os fungos endofíticos são micro-organismos que colonizam os tecidos internos das plantas, sem causar algum dano imediato ao seu hospedeiro, produzindo ou induzindo a produção de metabólitos primários e secundários que podem conferir vantagens à planta (CAMPOS, 2009). A produção de enzimas a partir desses fungos vai depender da especificidade entre a planta hospedeira e o fungo. Através do conhecimento da fisiologia, bioquímica e genética de fungos filamentosos tornou possível a exploração de seu imenso potencial para a produção de uma grande variedade de enzimas de aplicação industrial (TORRES *et al.*, 2008).

Nesse contexto, o objetivo desse trabalho foi avaliar, através de um estudo inicial, a produção de amilase por fungo filamentoso endofítico, por fermentação submersa com agitação e estática.

## Metodologia

### Micro-organismos

Os micro-organismos testados pertenciam à Coleção de Cultura de Fungos Filamentosos Endofíticos do LPNBio da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia.

### Seleção primária

Placas de Petri contendo ágar amido (extrato de levedura 10g/L, peptona de caseína 20g/L, amido solúvel 10g/L, ágar 20g/L, pH 6,5) foram inoculadas com 6 cepas diferentes de fungos filamentosos e incubadas a 30°C, por cinco dias. Após o período de incubação, as placas foram reveladas com lugol e os halos de hidrólise foram medidos. A cepa com maior média de halo de hidrólise foi selecionada para a etapa de seleção secundária.

### Seleção secundária

Foi preparada uma suspensão de esporos  $1,6 \times 10^8$  esporos/mL, em solução de Tween 80 0,02%. A contagem de esporos foi realizada em câmara de Neubauer. Foram realizados dois tipos de fermentação submersa (FS): fermentação submersa com agitação (FSA) e fermentação submersa estática (FSE). Todas as fermentações foram conduzidas em Erlenmeyers de 250mL contendo 50ml do meio amido ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  5g/L,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  3,8g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3,5g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,5g/L, extrato de levedura 10g/L, amido solúvel 20g/L, pH 5) e em cada frasco foram inoculados 10mL de suspensão de esporos. Os frascos foram incubados a 30°C, em diferentes tempos de fermentação (24h, 48h, 72h, 96h, 120h, 144h e 168horas), sob agitação a 150rpm, para a FSA, e sem agitação, para a FSE. Após o período de fermentação, os conteúdos dos frascos foram submetidos à filtração para separação da biomassa do caldo fermentado, denominado extrato enzimático.

### Determinação da atividade enzimática

A reação baseou-se na atividade sacarificante das amilases. A amilase foi quantificada através da adição de 0,5mL de uma solução contendo 1,6% de amido solúvel em tampão acetato 2N pH 4,3 e 0,5mL do extrato enzimático em tubos de ensaio, que foram incubados por 15 minutos a 60°C. Os açúcares redutores produzidos nessa reação foram quantificados pela técnica do ácido dinitrosalicílico (DNS), em que 2 mL desse reagente foram adicionados a 0,5mL do extrato anterior e deixando em fervura por 5 minutos. A leitura foi feita em 540nm e os resultados analisados Segundo curva padrão de glicose. (MILLER, 1959). Uma unidade de atividade enzimática corresponde à quantidade de enzima capaz de liberar 0,1µg (micromol) de açúcar redutor em um minuto.

### Resultados e Discussão

Através da seleção primária em ágar amido (figura 1), foi possível detectar a formação de halos de hidrólise (zona mais clara ao redor das colônias), sendo selecionada a cepa de fungo filamentosso do gênero *Chaetomium* sp., que foi submetida ao processo fermentativo.

Figura 1 – Cepa selecionada pela revelação do halo de hidrólise em ágar amido



Fonte: Elaborada pelos autores, 2017.

Os resultados dessa seleção primária permitiram verificar que o diâmetro do halo de hidrólise serve para prever o rendimento da enzima como um auxílio para o processo de seleção dos microrganismos capazes de degradar polissacarídeos. Tal seleção, também conhecida por screening, indica a presença de determinada substância pela detecção de alguma atividade específica, tal como a detecção de uma atividade enzimática via reação colorimétrica ou fluorimétrica (ZHANG *et al.*, 2006).

Alguns estudos utilizando esse mesmo método de screening, observaram a formação do halo de hidrólise para seleção de microrganismos com potencial celulolítico. Kasana *et al.* (2008) observaram a formação do halo de hidrólise em bactérias e fungos, assim como também Lopes *et al.* (2009) e Ruegger e Tauk-Tornisielo (2004) analisaram a atividade celulolítica por meio de ensaios com placas e cálculo dos índices enzimáticos.

Vários fatores podem interferir na visualização do halo, entre eles, a composição

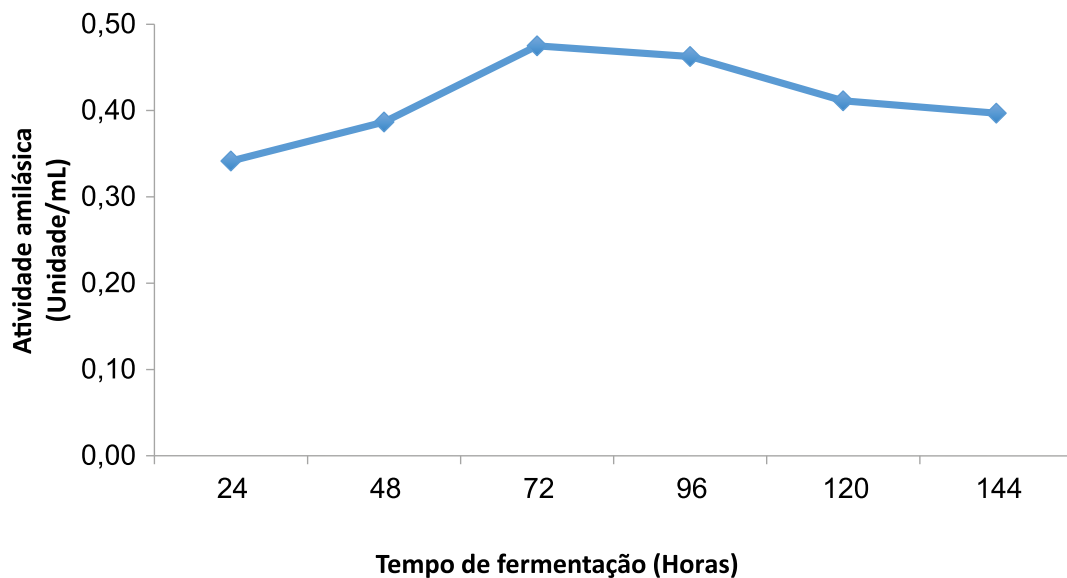
do meio de cultura e as substâncias químicas que podem intervir no corante proporcionando resultados falso-positivos ou ainda provocar sua precipitação ou impedir a ligação com os polissacarídeos (CASTRO, 2006).

A variação da atividade enzimática em função do tempo de fermentação está demonstrada na Figura 2. A maior atividade enzimática (0,47UA) foi observada no tempo de 72h e a menor (0,34UA), em 48h. Foi observado um incremento na atividade enzimática até o terceiro dia de fermentação, e após esse tempo ocorreu a diminuição da atividade. Esse comportamento normalmente é esperado e a redução na atividade enzimática após 72 horas de fermentação pode ser explicada devido ao esgotamento de nutrientes

ou por acúmulo de produtos inibidores da síntese enzimática. Geralmente as enzimas apresentam mecanismo de controle que são estimulados ou inibidos por produtos do meio (SANTANA *et al.*, 2012). Biazus *et al.* (2006) e Santana *et al.* (2012) observaram que a produção de amilase a princípio é lenta, acelerando posteriormente até alcançar seu valor máximo, apresentando a melhor atividade enzimática também no terceiro dia de fermentação, seguido pela redução da atividade enzimática.

Não foi verificada a produção de amilase a partir da FSE em nenhum tempo de fermentação, apesar de ter havido crescimento do fungo filamentosos sob a superfície do meio.

Figura 2 – Gráfico de atividade amilásica em função do tempo de fermentação



Fonte: Elaborada pelos autores, 2017.

### Conclusão

Foi possível verificar a capacidade do gênero *Chaetomium* sp. de produzir amilase por fermentação submersa com agitação. Entretanto,

essa mesma cepa não foi capaz de produzir a mesma enzima por fermentação submersa estática, indicando a necessidade de prolongar o tempo de fermentação nessa condição.

### Referências

BIAZUS, J. P. M. *et al.* Caracterização da atividade amilásica do malte de milho (*Zea mays* L.). *Acta Scientiarum Technology*, Maringá, v. 28, n. 1, p. 13-19, 2006.

CASTRO, A.M. **Produção e Propriedades de Celulases de Fungos Filamentosos, Obtidas a Partir de Celulignina de Bagaço de Cana-de-Açúcar (*Saccharum spp.*)**. 2006. 212f. Tese de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

FEITOSA, I. C. **Produção de enzimas lipolíticas utilizando**

- bactéria isolada de solo com histórico de contato com petróleo em fermentação submersa.** 2009. 104 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos) – Universidade Tiradentes, Aracaju, 2009.
- GUIMARÃES, L. H. S. *et al.* Screening of filamentous fungi for production of enzymes of biotechnological interest. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 37, n. 4, p. 474-480, 2006.
- KASANA, R. C. *et al.* Rapid and Easy Method for Detection of Microbial Cellulases on Agar plates Using Gram's Iodine. **Current Microbiology**, v. 57, p. 503–507, 2008.
- LOPES, V. R. *et al.* **Atividade da Xilanase em Cepas de Colletotrichum e Trichoderma.** SINAFERM, Natal, RN, 2009.
- POLIZELI, M. L. T. M. *et al.* Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 67, n. 5, p. 577-591, 2005
- RODRIGUES, A. M.; SANTANA, E. S. Efeito do cloreto de sódio na produção de proteínas (*Saccharomyces cerevisiae*) em fermentação semi-sólida. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 21, n.1, p. 57-62, jan./abr. 2001.
- RUEGGER, M. J. S.; TAU-K-TORSINIELO, S. M. Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 27, n. 2, p. 205-211, abr-jun. 2004.
- SANTANA, R. S. M. *et al.* Produção de amiloglucosidase utilizando como substrato a palma forrageira. **Revista Caatinga**, v. 25, n. 1, p. 188-193, 2012.
- SELVAM K. *et al.* Enhanced production of amylase from *Bacillus* sp. using groundnut shell and cassava waste as a substrate under process optimization: waste to wealth approach. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 7, p. 250–256, 2016.
- TORRES, F. A. G. *et al.* O uso de leveduras e fungos filamentosos para a expressão heteróloga de enzimas. In: BON, E. P. S.; FERRARA, M. A. A.; CORVO, M. L. (Eds.). **Enzimas em Biotecnologia: produção, aplicações e mercado.** Rio de Janeiro: Interciência, 2008. p. 55-70.
- ZHANG, Y.H.P.; HIMMEL, M.E.; MIELENZ, J.R. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. **Biotechnology Advances**, v. 24, n.5, p. 452-481, 2006.