DOI: 10.51189/iii-conbracib/7566

III CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS ON-LINE

# INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL DA PRODUÇÃO DE AMILASE DE UM NOVO ISOLADO DE *Aspergillus* sp. A PARTIR DE AGRORESÍDUOS

FABIANE CRUZ BEZERRA; CAMILA LANGER MARCIANO; ALINE PEREIRA DE ALMEIDA; ROBERTO RULLER; DOUGLAS CHODI MASUI

## RESUMO

**Introdução**: As amilases são enzimas amilolíticas que hidrolisam as ligações glicosídicas do amido. O amido é um dos polissacarídeos mais importantes da natureza, encontrado em quase todos os órgãos vegetais como reserva energética. Muitos substratos contendo amido estão disponíveis a partir de fontes vegetais baratas, tornando as aplicações da amilase mais abundantes em termos de custo. As amilases correspondem a 25% do mercado global de enzimas e possuem diversas aplicações na indústria. Os fungos filamentosos são os microrganismos mais promissores para a produção de enzimas. A Fermentação em Estado Sólido (FES) é um método de cultivo de microrganismos que permite o aproveitamento de resíduos sólidos agroindustriais como substratos para a produção de compostos de interesse industrial. **Objetivo**: Por isso, objetivou-se padronizar condições ideais de cultivo de um isolado fúngico do gênero *Aspergillus* para a maior produção de amilase. **Material e método**: Foram testados diferentes substratos como fonte de carbono para o crescimento do microrganismo, diferentes suplementações com fontes de nitrogênio e carbono, em diferentes temperaturas. Inicialmente, os meios de cultivo foram mantidos durante 4 dias à 30 °C em estufa, em seguida foi determinado a melhor temperatura de crescimento do fungo. A atividade enzimática foi determinada pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) a partir da liberação de açúcares redutores. **Resultados**: Observou-se que a quirera de arroz foi a melhor fonte de carbono para a atividade enzimática da amilase (181,10 ± 0,20 U/ mL). Além disso, a suplementação com 1% de torta de óleo de amêndoa aumentou a atividade enzimática em 40% (299,83 ± 0,5 U/ mL). A quirera de arroz é um resíduo gerado pela etapa de beneficiamento da indústria do arroz. Já, a torta de óleo de amêndoa é um resíduo gerado pela prensagem do fruto da macaúba para a produção de óleo a partir da amêndoa (semente). **Conclusão**: Ambos os agroresíduos são de fácil obtenção, baixo custo e podem ser usados como substratos para a produção enzimática. Esses testes evidenciam que este novo isolado de *Aspergillus* consegue em condições mínimas de cultivo, produzir quantidades de amilase que podem ser estudadas e avaliadas para aplicações biotecnológicas.

**Palavras-chave:** Enzima; Amido; Fungo filamentoso; Fermentação em Estado Sólido.

DOI: 10.51189/iii-conbracib/7566

## 1 INTRODUÇÃO

O amido é um dos mais importantes polissacarídeos da natureza, encontrado nas sementes, caules, raízes e frutos de plantas como reserva energética (BOŽIĆ *et al*., 2017). Sua composição consiste em dois polímeros de glicose: amilose e amilopectina, conectados por ligações glicosídicas (GOPINATH *et al*., 2017). As amilases são enzimas que hidrolisam as ligações glicosídicas da molécula de amido, originando carboidratos mais simples chamados de dextrinas (CRIPWELL *et al*., 2020). Muitos microrganismos como bactérias e fungos são capazes de produzir amilases de interesse industrial (GOPINATH *et al*., 2017). Entretanto, os fungos possuem a vantagem de secretarem amilases extracelularmente, e se aderirem facilmente à substratos duros favorecendo a hidrólise, além de serem altamente apropriados para a Fermentação em Estado Sólido (FES) (GOPINATH *et al*., 2017).

A Fermentação em Estado Sólido (FES) é um método de cultivo de microrganismos que permite a utilização de resíduos sólidos provenientes da agroindústria como fonte de carbono para o crescimento dos fungos. Dessa forma, esse método possui destaque no aproveitamento de resíduos agroindústrias objetivando a produção de diversos compostos de interesse industrial (DANTAS; AQUINO, 2010).

As amilases representam cerca de 25% do mercado global de enzimas. Isso ocorre em razão destas enzimas apresentarem inúmeras aplicações que vão desde a produção de xaropes de milho com alto teor de frutose nas indústrias de cerveja e refrigerante, produção de etanol e detergentes ao uso na indústria de papel e celulose, farmacêutica, alimentícia, têxtil e em rações para animais (GOPINATH *et al*., 2017; FAR, et al., 2020).

O objetivo desse trabalho foi padronizar as condições ideais de cultivo do fungo *Aspergillus* sp. para uma maior produção enzimática de amilase.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

O microrganismo foi coletado no município de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil, e está depositado no acervo da micoteca da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS). O fungo foi reconhecido por características morfológicas como pertencente ao gênero *Aspergillus* e será identificado futuramente a nível de espécie por análises moleculares. A metodologia *one-factor-at-a-time* (OFAT) foi empregada para determinar os testes de padronização para a melhor fonte de carbono e a melhor fonte suplementar de nitrogênio e carbono na concentração 1% (p/p). Os substratos testados para a fonte de carbono contendo 5 g foram: amido, casca de arroz, casca de arroz triturada, casca de macaúba, cevada, farelo de trigo, farinha de arroz, farinha de polpa, fubá, quirera de arroz, quirera de milho, e torta de óleo de amêndoa. Para a suplementação com 1% (p/p) de fonte de nitrogênio foram testados: caseína, extrato de levedura, peptona e ureia. E para a suplementação com 1% (p/p) de fonte de carbono foram testados: amido, cevada, farelo de trigo, ora-pro-nóbis, palha de milho, sabugo de milho, e torta de óleo de amêndoa.

As culturas foram obtidas por meio de inóculos de 2,0 mL de suspensão de esporos. A fermentação ocorreu inicialmente a 30 °C por 4 dias. A fonte de carbono que exibiu a melhor expressão enzimática foi escolhida para a avaliação dos outros parâmetros, sempre adotando a melhor condição de cada experimento nos ensaios seguintes. Em seguida, foram testadas diferentes temperaturas (25, 30, 35 e 40 °C) por 4 dias para avaliar a melhor condição de produção.

O meio reacional para a avaliação da atividade enzimática foi feito por uma micro- reação adaptada em placa usando 10 µL de solução enzimática, 40 µL de água destilada e 50

DOI: 10.51189/iii-conbracib/7566

µL de tampão acetato de sódio 100 mmol.L$^{-1}$, pH 5,0, contendo 1% amido (m/v). Após 10 min de incubação em banho maria a 50 °C, a reação foi interrompida com a adição de 100 µL de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (MILLER, 1959), seguida por aquecimento em banho fervente. Em seguida, uma alíquota de 100 µL foi retirada em microplaca para leitura a 540 nm em espectrofotômetro. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi determinada como a quantidade de enzima capaz de liberar 1,0 µmol de açúcar redutor por minuto nas condições de ensaio estabelecidas.

A concentração de proteínas totais (mg/mL) foi estabelecida pelo método descrito por Read & Nothcote (1981), utilizando albumina bovina como padrão.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Entre os 12 substratos testados, a quirera de arroz (181,10 ± 0,20 U/mL) foi a melhor fonte de carbono para a produção de amilase por *Aspergillus* sp. em Fermentação em Estado Sólido, seguida de quirera de milho (25,69 ± 1,39 U/mL), farelo de trigo (21,90 ± 0,37 U/mL), e farinha de arroz (16,66 ± 0,16 U/mL). Todas as outras fontes de carbono testadas resultaram em produção enzimática relativamente baixa (Tabela 1).

**Tabela 1 –** Determinação da melhor fonte de carbono.

| Meio de cultivo | Atividade U/mL | Proteína (mg/ mL) | AE (U/ mg) |
|---|---|---|---|
| Amido | 3,58 ± 0,079 | 0,34 | 11,20 ± 0,06 |
| Casca de Arroz | 11,62 ± 0,62 | 0,18 | 68,07 ± 0,68 |
| Casca de Arroz Triturada | 12,08 ± 0,77 | 0,26 | 44,72 ± 1,85 |
| Casca de Macaúba | 0 ± 0,31 | 0,11 | 0 ± 1,13 |
| Cevada | 10,54 ± 0,22 | 0,88 | 12,65 ± 0,28 |
| Farelo de Trigo | 21,90 ± 0,37 | 0,90 | 24,39 ± 0,47 |
| Farinha de Arroz | 16,66 ± 0,16 | 0,68 | 24,48 ± 0,23 |
| Farinha de Polpa | 12,28 ± 0,89 | 0,52 | 28,48 ± 1,24 |
| Fubá | 5,21 ± 0,94 | 0,22 | 16,84 ± 1,59 |
| Quirera de Arroz | 181,10 ± 0,20 | 0,63 | 306,13 ± 0,78 |
| Quirera de Milho | 25,69 ± 1,39 | 0,30 | 30,31 ± 0,40 |
| Torta de Óleo de Amêndoa | 10,49 ± 0,15 | 0,93 | 12,77 ± 0,30 |

AE: Atividade Específica (U/mg proteína). Fonte: Autor.

A adição de 1% (p/p) de diferentes fontes suplementares de nitrogênio à melhor fonte de carbono, quirera de arroz, não resultou em aumento da produção de amilase por *Aspergillus* sp. (Tabela 2). Sivaramakrishnan *et al*. (2007) também relatou a ausência de melhoria na atividade enzimática com a suplementação de fontes de nitrogênio para *Aspergillus oryzae*. Além da redução no rendimento enzimático com os suplementos de peptona e extrato de levedura devido ao excesso de nitrogênio que acabou tendo efeito adverso na síntese da enzima (SIVARAMAKRISHNAN *et al*., 2007).

**Tabela 2 –** Determinação da melhor fonte suplementar de 1% (p/p) nitrogênio.

| Meio de cultivo | Atividade U/ mL | Proteína (mg/ mL) | AE (U/ mg) |
|---|---|---|---|
| Caseína | 31,12 ± 0,79 | 0,51 | 65,18 ± 1,72 |
| Extrato de levedura | 58,18 ±0,78 | 0,53 | 129,32 ± 0,52 |
| Peptona | 30,34 ± 0,19 | 0,60 | 54,05 ± 0,34 |
| Ureia | 3,38 ± 0,29 | 0,53 | 6,33 ± 0,54 |

AE: Atividade Específica (U/mg proteína). Fonte: Autor.

Na determinação da melhor fonte suplementar de 1% (p/p) carbono, a torta de óleo de amêndoa (299,83 ± 0,5 U/mL) exibiu uma melhoria de 40 % na produção enzimática quando

DOI: 10.51189/iii-conbracib/7566

adicionada ao meio 5 g de quirera de arroz (Tabela 3). Outros estudos relatam a torta de óleo de amendoim como sendo a fonte de carbono ideal para a produção de amilase por *Aspergillus niger* (SUGANTHI *et al*., 2011) e *Aspergillus oryzae* (BALAKRISHNAN *et al*., 2021).

**Tabela 3 –** Determinação da melhor fonte suplementar de 1% (p/p) carbono.

| Meio de cultivo | Atividade U/ mL | Proteína (mg/mL) | AE (U/ mg) |
|---|---|---|---|
| Amido | 241,27 ± 0,84 | 0,59 | 408,27 ± 0,46 |
| Cevada | 176,21 ± 0,28 | 0,66 | 264,26 ± 0,42 |
| Farelo de Trigo | 247,63 ± 0,78 | 0,66 | 372,35 ± 2,03 |
| Ora-pro-nóbis | 198,39 ± 0,23 | 0,65 | 303,62 ± 0,35 |
| Palha de Milho | 144,63 ± 0,94 | 0,53 | 282,25 ± 0,95 |
| Sabugo de Milho | 117 ± 0,52 | 0,66 | 175,29 ± 0,79 |
| Torta de Óleo de Amêndoa | 299,83 ± 0,5 | 0,72 | 411,08 ± 0,69 |

AE: Atividade Específica (U/mg proteína). Fonte: Autor.

A atividade da amilase aumentou quando o meio de cultivo contendo 5 g de quirera de arroz e 1% (p/p) torta óleo de amêndoa foi cultivado a temperatura de 25 °C (193,37 ± 0,72 U/mL). A partir de 35 °C a atividade da enzima começou a diminuir (Tabela 4), chegando a apenas 38% na temperatura de 40 °C (75,02 ± 0,88 U/mL).

**Tabela 4** – Determinação da melhor temperatura

| Temperatura (°C) | Atividade U/ mL | Proteína (mg/mL) | AE (U/ mg) |
|---|---|---|---|
| 25 | 193,37 ± 0,72 | 0,47 | 413,87 ± 0,71 |
| 30 | 156,57 ± 1,29 | 0,61 | 322,06 ± 1,29 |
| 35 | 118,71 ± 0,28 | 0,57 | 210,69 ± 0,5 |
| 40 | 75,02 ± 0,88 | 0,47 | 161,81 ± 1,23 |

AE: Atividade Específica (U/mg proteína). Fonte: Autor.

## 4 CONCLUSÃO

Pode-se concluir que a melhor condição de cultivo para *Aspergillus* sp. na produção de amilase foi um meio de baixo custo contendo apenas 5 g de quirera de arroz e 1% (p/p) de torta de óleo de amêndoa. A temperatura de 25 °C apresentou as melhores expressões enzimáticas.

Portanto, *Aspergillus* sp. pode ser considerado um bom produtor de amilase com alta atividade extracelular. Sugerindo que esta enzima possa se um potencial fonte biotecnológica para aplicações industriais futuras.

Os resultados deste trabalho são animadores para dar continuidade aos experimentos, como a caracterização e aplicação desta enzima.

## REFERÊNCIAS

BALAKRISHNAN, M.; JEEVARATHINAM, G.; KUMAR, K. S.; MUNIRAJ, I.; UTHANDI, S. Optimization and scale-up of α-amylase production by *Aspergillus oryzae* using solid-state fermentation of edible oil cakes. **BMC biotechnology**, v. 21, n. 1, p. 1-11, 2021.

BOŽIĆ, N.; LONČAR, N.; SLAVIĆ, M. S..; VUJČIĆ, Z. Raw starch degrading α-amylases: an unsolved riddle. **Amylase**, v. 1, n. 1, p. 12-25, 2017.

DOI: 10.51189/iii-conbracib/7566

CRIPWELL, R. A.; VAN ZYL, W. H.; VILJOEN-BLOOM, M. Fungal biotechnology: fungal amylases and their applications. 2020.

DANTAS, E. M.; AQUINO, L. C. L. Fermentação em Estado Sólido de diferentes resíduos para a obtenção de lipase microbiana. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande. v. 12, n. 1, p. 81-87, 2010.

FAR, B. E.; AHMADI, Y.; KHOSROUSHAHI, A. Y.; DILMAGHANI, A. Microbial alpha-amylase production: progress, challenges and perspectives. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 10, n. 3, p. 350- 358, 2020.

GOPINATH, S. C. B.; ANBU, P.; ARSHAD, M. K. Md., LAKSHMIPRIYA, T.; VOON, C. H.; HASMIN, U.; CHINNI, S. V. Biotechnological processes in microbial amylase production. **BioMed Research International**, v. 2017, n. 3, p. 1- 9, 2017.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-428, 1959.

READ, S. M.; NORTHCOTE, D. H. Minimization of variation in the response to different proteins of the Coomassie blue G dye-binding assay for protein. **Analytical Biochemistry**, v. 116, n.1, p. 53-64, 1981.

SIVARAMAKRISHNAN, S.; GANGADHARAN, D.; NAMPOOTHIRI, K. M.; SOCCOL, C.; PANDEY, A. Alpha amylase production by *Aspergillus oryzae* employing solid-state fermentation. **Journal of Scientific and Industrial Research**, v. 66, n. 8, p. 621 – 626, 2007.

SUGANTHI, R.; BENAZIR, J. F.; SANTHI, R.; RAMESH, V. K.; ANJANA, H.; NITYA, M.; NIDHIYA, K. A; KAVITHA, G.; LAKSHMI, R. Amylase production by *Aspergillus niger* under solid state fermentation using agroindustrial wastes. **International Journal of Engineering Science and Technology**, v. 3, n. 2, p. 1756-1763, 2011.