



POTENCIAL DE FUNGOS DA CAATINGA PARA PRODUÇÃO DE ENZIMAS AMILOLÍTICAS

Glauciane Danusa Coelho¹, Jucilene Pereira de Sousa², Caio de Azevedo Lima³, Simone Aparecida da Silva Lins⁴.

¹Professora Adjunta Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido/Universidade Federal de Campina Grande (UAEBB/UFCG). E-mail: glauciane@ufcg.edu.br

²Doutoranda do curso de Bioquímica, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular/Centro de Ciências/Universidade Federal do Ceará.

³Graduando de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos da Universidade Federal de Campina Grande

⁴Técnica em Química no Laboratório de Química Ambiental de solos/Departamento de Agronomia/Universidade Federal Rural de Pernambuco

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo realizar a prospecção de fungos com potencial para a produção de amilase a partir de fungos isolados no Semiárido Paraibano e depositados na Coleção de Fungos do Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido/Universidade Federal de Campina Grande (CDSA/UFCG). Esse trabalho representa uma estratégia para conhecer a diversidade enzimática de organismos desse bioma, bem como aplica-los em futuros processos biotecnológicos. As análises foram realizadas a partir de 50 isolados da referida coleção, dos quais apenas 27 apresentaram crescimento em meio BDA e destes apenas 10 (dez) (37,04 %) apresentaram atividade amilolítica. A determinação da produção enzimática foi realizada em meio sólido composto de ágar e amido solúvel, por meio da determinação do índice enzimático (IE). Os maiores valores de IE foram obtidos a partir dos isolados fúngicos denominados CDSA 09, 18, 23 e 24 com valores de $3,79\pm 0,5$; $3,50\pm 0,5$; $3,4\pm 0,4$ e $3,5\pm 1,0$, respectivamente. Os isolados fúngicos CDSA 23 e CDSA 54 apresentaram as maiores velocidades de crescimento, tendo preenchido toda placa de *Petri* no período de 144 horas (6 dias). A prospecção de enzimas a partir de microorganismos isolados da Caatinga é de extrema valia para que seja revelada a biodiversidade microbiana desta região que ainda é pouco explorada.

Descritores: Atividade enzimática. Biotecnologia. Microrganismos. Amido.

POTENTIAL OF CAATINGA FUNGI FOR AMILASE PRODUCTION

ABSTRACT

The objective of the present study was to prospect fungi with potential for production of amylase from fungi isolated in the Paraíba (semi - arid region) and deposited in the Fungi Collection of the Center for the Sustainable Development of the Semi - arid / Federal University of Campina Grande (CDSA / UFCG) . This work represents a strategy to know the enzymatic diversity of organisms in this biome, as well as to apply



them in future biotechnological processes. The analyzes were carried out from 50 isolates of this collection, of which only 27 showed growth in BDA medium and of these only 10 (ten) (37.04%) presented amylolytic activity. The determination of the enzymatic production was carried out in solid medium composed of agar and soluble starch, by means of the determination of the enzymatic index (IE). The highest IE values were obtained from the fungal isolates denominated CDSA 09, 18, 23 and 24 with values of 3.79 ± 0.5 ; 3.50 ± 0.5 ; 3.4 ± 0.4 and 3.5 ± 1.0 , respectively. Fungal isolates CDSA 23 and CDSA 54 showed the highest growth rates, filling the entire Petri dish in 144 hours (6 days). The prospection of enzymes from microorganisms isolated from the Caatinga is of extreme value in order to reveal the microbial biodiversity of this region that is still little explored.

Keywords: Enzymatic activity. Biotechnology. Microorganisms. Starch.

INTRODUÇÃO

O Brasil é um país favorecido devido à enorme quantidade e variedade de matérias-primas renováveis passíveis de serem transformadas, apresentando a maior biodiversidade do planeta de fonte de biocatalisadores. O semiárido, que faz parte do bioma brasileiro Caatinga, tem uma enorme diversidade em microrganismos, porém as espécies são pouco conhecidas. A Caatinga apresenta um acentuado processo de desertificação, ocasionado, principalmente, pelo desmatamento e uso inadequado dos recursos naturais, o qual resulta na redução de produção vegetal e mudanças nas interações que ocorrem no solo, com a consequente, e muitas vezes irreversível, perda da biodiversidade (1).

O conhecimento da biodiversidade e bioprospecção de novos microrganismos tornaram-se um dos focos principais da era biotecnológica, visto que a utilização de microrganismos na busca de soluções nas áreas de alimento, saúde, meio ambiente e indústria vêm crescendo de forma acelerada no atual cenário mundial. Frente a isso, a produção de enzimas é um vasto campo de estudo quando se trata de processos biotecnológicos. Esses biocatalisadores possuem características particulares pela sua alta eficiência em condições fisiológicas e alta especificidade. O potencial catalítico das enzimas é utilizado industrialmente, não só nos clássicos processos de fermentação, mas também em processos de biotransformações microbianas para a catálise de reações químicas de difícil ocorrência e de grande importância industrial (2). Enzimas são proteínas produzidas pelos organismos vivos e atuam como catalisadores, isto é, tem a função de acelerar as reações bioquímicas vitais. Devem



ser produzidas em grande número, em pouco tempo e com características específicas e desejadas para que possam ser utilizadas em um processo industrial (3, 4).

As amilases são enzimas do grupo das hidrolases e atuam sobre as moléculas de amido hidrolisando em dextrina, maltose e unidades de glicose. As enzimas são de importância industrial devido às aplicações comerciais em liquefação de amido, papel, desidratação de tecidos, preparação de revestimentos de amido de tintas, remoção de papel de parede, indústria de fabricação de cerveja, indução de açúcar pela produção de xaropes de açúcar, produtos farmacêuticos e preparação de dispersão de água fria em lavanderias (5). Essas enzimas estão entre as mais importantes na atual biotecnologia, podendo ser derivadas de diversas fontes, incluindo plantas, animais e microrganismos, porém as enzimas microbianas geralmente atendem com maior eficácia às demandas industriais, constituindo-se como uma alternativa barata para a produção, visto que requerem condições mínimas de nutrição e manutenção, além de secretarem as enzimas para o meio extracelular (6, 7, 8).

Na indústria alimentícia, o amido é convertido por ação enzimática em diversos produtos, como as *dextrinas* que são empregadas em formulações clínicas, na sacarificação enzimática; na produção de *maltose* que é utilizado em confeitarias e para a produção de cervejas e sorvetes; na geração de *glicose*, utilizada em panificação e como subsídio para produção de etanol; e como *frutose* utilizada em geleias, iogurtes e refrigerantes (9). Na indústria de panificação, as amilases proporcionam melhor coloração, volume e textura do miolo de pães, podendo ainda retardar o processo de envelhecimento, mantendo o pão fresco por mais tempo (10). Nas indústrias de papel utilizam-se amilases para proteção do papel contra danos mecânicos e melhoria do acabamento final. Na produção de glicose e frutose, as amilases são usadas para hidrolisar as moléculas de amido (11), sendo o amido transformado em xarope de milho de frutose. Essas enzimas apresentam propriedade edulcorante, podendo ser utilizadas em grandes quantidades na indústria de bebidas como edulcorantes para refrigerantes. O processo requer o uso de uma alfa-amilase altamente termoestável para liquefação de amido (12). Os edulcorantes são substitutos do açúcar, isto é, são utilizados em composição alimentícia que utilizem açúcar (13). Recentemente, a sacarificação de amido, a principal aplicação de amilase, substituiu completamente a utilização de produtos químicos (5).

Devido às características tão peculiares do Semiárido Paraibano, a prospecção de microrganismos, assim como de enzimas de interesse industrial, são ações



necessárias para conhecer a biodiversidade da Caatinga, além permitir o desenvolvimento de futuros processos biotecnológicos para satisfazer as necessidades da indústria, contexto do desenvolvimento sustentável. Esse trabalho objetivou realizar a prospecção de enzimas amilolíticas a partir de fungos isolados no Semiárido Paraibano e depositados na Coleção de Fungos do Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido/Universidade Federal de Campina Grande (CDSA/UFCG).

MATERIAL E MÉTODOS

Material Biológico

Para a realização das atividades foram utilizados os fungos isolados de folhas de plantas e do solo no semiárido paraibano, os quais estão depositados na Coleção de Fungos do Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido/Universidade Federal de Campina Grande (CDSA/UFCG), na cidade de Sumé-PB.

Reativação das Culturas

Os isolados da Coleção de Fungos do CDSA/UFCG foram mantidos em placas de *Petri* contendo meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA) à temperatura de 28°C. Para a preparação deste meio de cultura, cortaram-se as batatas (200g) em pequenos pedaços, que foram fervidos em água destilada durante 10 minutos, contados a partir do início da ebulição. O material foi filtrado e acrescido de dextrose (20g) e ágar (20g). O volume foi ajustado para 1 L e esterilizado em autoclave por 20 min, a 121°C.

Após a reativação, os isolados que apresentaram crescimento em meio BDA e que foram utilizados para verificar as atividades enzimáticas foram armazenados de acordo com o método Castellani (14), que consistiu na transferência de discos de micélio contendo o fungo, crescido em meio BDA, para tubos cônicos tipo *ependorf* contendo 1 mL de água destilada esterilizada e mantidos em geladeira.

Prospecção Enzimática

A prospecção enzimática dos fungos da coleção do CDSA foi realizada por meio do método de difusão em gel de ágar, em placas de *Petri* tendo meio diferencial esterilizado constituído por amido (20g) e ágar (20g) e água destilada (1L). A produção



de atividade amilolítica foi caracterizada por meio da formação de halos de degradação do amido. Após 72 h de incubação a 30°C as placas foram reveladas com adição de 2,0 mL de solução de iodo. O halo de degradação do substrato, bem como o halo de crescimento fúngico foi medido com auxílio de régua milimetrada. Os isolados que apresentaram halo de degradação do amido em torno da colônia tiveram a atividade avaliada pelo índice enzimático (IE), Equação de Hankin e Anagnostakis (15).

$$IE = \frac{\varnothing_h}{\varnothing_c}$$

Em que:

IE = Índice Enzimático;

\varnothing_h = Diâmetro médio do halo de degradação, cm;

\varnothing_c = Diâmetro médio da colônia, cm.

Velocidade de Crescimento dos Isolados

Os isolados que apresentaram atividade positiva para produção de amilase foram inoculados em meio de cultura, em duplicata, por um período de 144 horas em BOD, em temperatura de 28°C. O crescimento micelial foi verificado a cada 24 horas, a partir de medições do diâmetro das colônias em dois eixos perpendiculares entre si.

Análise estatística

Todos os dados foram analisados quanto à sua distribuição. Para tanto, foi realizado o teste de Kolmogorov-Sminorv a fim de determinar se as amostras apresentavam distribuição normal, seguido da aplicação do teste de Tukey. Foram consideradas médias estatisticamente diferentes aquelas cujos resultados do teste estatístico foram menores que 0.05 ($p < 0.05$). As análises estatísticas foram realizadas no programa IBM SPSS Statistics 21.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente trabalho obteve-se a reativação de apenas de 27 (vinte e sete) isolados fúngicos, que corresponde a 54 % dos 50 (cinquenta) isolados fúngicos selecionados, que pertencentes a Coleção de Fungos do CDSA/UFCG. Os isolados fúngicos reativados em meio BDA foram armazenados segundo o método Castellani, visto que este é um método de baixo custo e altamente eficaz. Segundo (16), após 11



anos de conservação de fungos dermatófitos, 93% apresentaram-se viáveis e sem alterações morfológicas.

Dentre os 27 (vinte e sete) isolados fúngicos que apresentaram crescimento em meio BDA, apenas 10 (dez) (37%) demonstraram ser capazes para a produção de enzimas amilolíticas, apresentando assim halo de degradação (Tabela 1). Pesquisadores verificaram que de 35 (trinta e cinco) fungos isolados do solo, frutas, vegetais e alimentos cozidos apenas 10 (dez) apresentaram reação positiva para produção de amilases (17).

Na Figura 1 verifica-se que com exceção dos isolados fúngicos denominados CDSA 06 e CDSA 69, todos os demais apresentam IE superior a 2. Sendo que os maiores valores de IE foram verificados para os isolados fúngicos CDSA 9, CDSA 18, CDSA 23 e CDSA 24 que apresentaram IEs de $3,79\pm 0,5$; $3,50\pm 0,5$; $3,4\pm 0,4$ e $3,5\pm 1,0$, respectivamente. Apesar dos diferentes valores de IE observados na Figura 1, a análise estatística demonstrou que não há diferença significativa na produção de enzimas amilolíticas pelos isolados fúngicos estudados.

Os valores de IE obtidos nesse trabalho assemelham –se aos obtidos em estudo utilizando leveduras e bactérias, em que em um período de 72 horas os isolados apresentaram IE entre 1,00 e 3,85 (18).

Tabela 1. Avaliação de atividade amilolítica de 27 fungos da coleção do CDSA/UFCG

	ISOLADOS	IE AMILASE
1	CDSA 01	-
2	CDSA 02	-
3	CDSA 06	+
4	CDSA 07	-
5	CDSA 09	+
6	CDSA 10	-
7	CDSA 12	-
8	CDSA 17	+
9	CDSA 18	+
10	CDSA 20	-
11	CDSA 21	-
12	CDSA 22	-
13	CDSA 23	+
14	CDSA 24	+
15	CDSA 49	-
16	CDSA 54	+
17	CDSA 56	+



18	CDSA 59	-
19	CDSA 60	-
20	CDSA 65	-
21	CDSA 66	+
22	CDSA 69	+
23	CDSA 70	-
24	CDSA 71	-
25	CDSA 72	-
26	CDSA 78	-
27	CDSA 106	-

Nota: Símbolo (+) detecção de atividade enzimática e (-) ausência de atividade enzimática a partir do índice enzimático (IE).

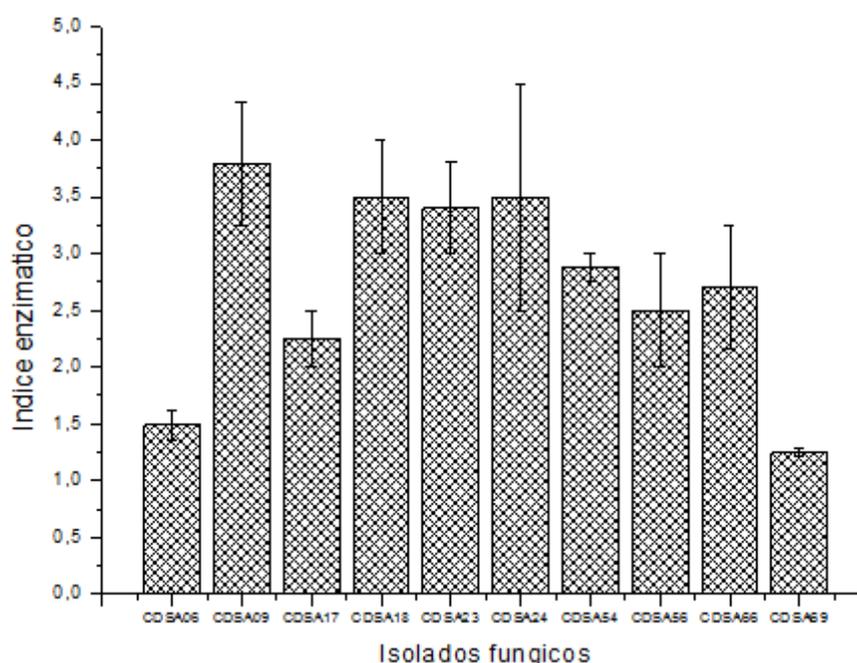


Figura 1 – Índice enzimático para atividade amilolítica dos isolados fúngicos estudados.

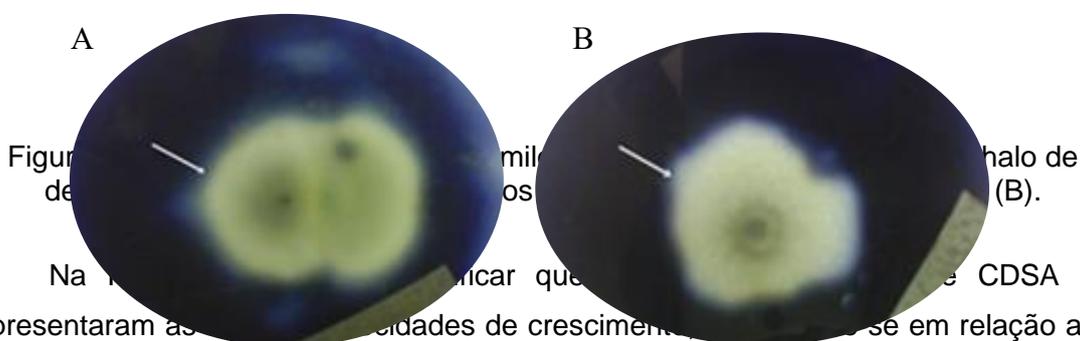
A formação de halo de degradação em meio sólido indica que esses isolados fúngicos podem ser investigados em processo fermentativo para produção dessa enzima, sendo que SIMAIR e colaboradores (5) sugerem que o melaço pode ser potencialmente fonte de energia muito econômica para a produção comercial dessa enzima e que a utilização de melaço não só reduz o custo do meio de fermentação, mas também ajuda a reduzir o problema de poluição. E representa um meio de



produção barata de amilase usando resíduos agroindustriais como fonte de carbono econômica para aplicações biotecnológicas.

O método de difusão em gel de ágar baseia-se na capacidade da enzima em difundir-se pelo meio de cultura, e esse processo deve-se entre outros motivos, ao tamanho da molécula da enzima (19). O que justifica os altos valores de desvios padrões verificados na Figura 1.

A Figura 2 mostra o halo de degradação para atividade amilolítica dos isolados fúngicos CDSA 09 e CDSA 18 em meio sólido.



Na Figura 2, é possível observar que os isolados fúngicos CDSA 09 e CDSA 18 apresentaram as maiores velocidades de crescimento em relação aos demais por apresentarem um crescimento de 1,49, 1,54, e 1,50 (cm/dia), respectivamente. Dessa forma, esses isolados fúngicos preencheram completamente a placa de Petri no período de 144 horas. Em trabalho desenvolvido com *Aspergillus terreus* isolado de solo de Caatinga foi verificado crescimento de 8 cm no décimo dia a uma temperatura de 28°C (20). O isolado fúngico CDSA 69, estudado neste estudo cresceu cerca de 8,85 cm \pm 0,1 em apenas 6 dias.

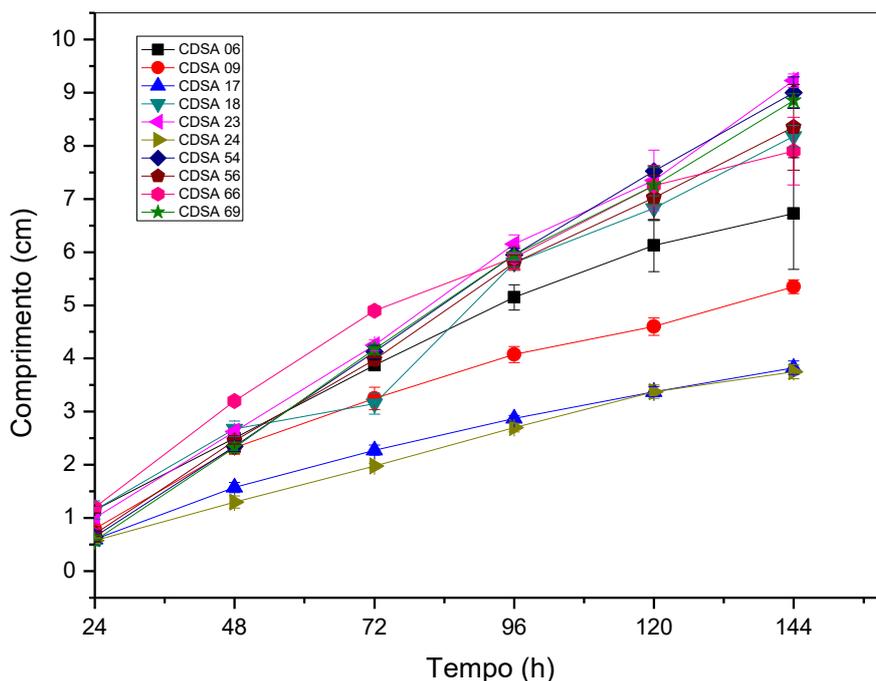


Figura 3 – Velocidade de crescimento dos isolados fúngicos até 144h

Pode se enfatizar que, em média, os isolados fúngicos tiveram maior crescimento micelial entre 48 horas e 120 horas. Os isolados fúngicos CDSA 17 e CDSA 24 foram os que apresentaram crescimento mais lento, sendo que no período de 144 h cresceram apenas $3,83\text{cm}\pm 0,1$ e $3,75\text{cm}\pm 0,1$, respectivamente, como pode ser observado na Figura 3. Pode-se destacar ainda que dentre os isolados que apresentaram maior crescimento está os isolados CDSA 18 e CDSA 23, os quais também mostraram um bom potencial para produção de amilase, enfatizando ainda mais o potencial desses fungos para a aplicação em bioprocessos. Ainda, o teste estatístico não apresentou diferença na velocidade de crescimento entre os isolados.

CONCLUSÕES

- Este trabalho contribui para o conhecimento do potencial dos microrganismos isolados da Caatinga para a aplicação em bioprocessos;
- A dificuldade de reativação de alguns isolados indica a necessidade de uso de métodos distintos para a conservação das culturas para melhor manutenção das características;



• Os altos valores de IE apresentados por alguns isolados fúngicos indicam que esses isolados podem ser empregados em bioprocessos para produção de enzimas com atividade amilolítica.

REFERÊNCIAS

1. SKUJIŇŠ J, ALLEN MF. Use of mycorrhizae for land rehabilitation. *Mircen Journal*. 1986; v. 2, p. 161-176.
2. PEREIRA JÚNIOR N, BON OS, FERRARA MA. Séries em Biotecnologia: Tecnologia de Bioprocessos. Escola de Química, UFRJ. v. 1, Rio de Janeiro; 2008; 62 p.
3. LOURENZONI MR. *et al.* Brancura Total. *Revista Pesquisa FAPESP*, São Paulo; 2012; 193. ed., mar.
4. TRIBST, AAL. Tecnologia acelera atividade de enzimas na produção de alimentos. *Jornal da UNICAMP*, Campinas; 2013; p. 9.
5. SIMAIR, A. A. *et al.* Production and Partial Characterization of α -Amylase Enzyme from *Bacillus* sp. BCC 01-50 and Potential Applications. *BioMed Research International*; 2017; p. 1-9.
6. TORTORA, GJ, FUNKE BR, CASE CL. *Metabolismo Microbiano*. In: UFCG-CDSA. *Org. Microbiologia*. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012. 967 p.
7. ALMEIDA MCO, *et al.* Análise da Produção de Amiloglucosidase e Alfa-Amilase por *Aspergillus Awamori* através de Fermentação Batelada em Frascos Agitados. In: Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica, 8; 2009; Uberlândia; UFU.
8. KUNAMNENI A, PERMAUL K, SINGH S. Amylase Production in Solid State Fermentation by the Thermophilic Fungus *Thermomyces lanuginosus*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Durban; 2005; v. 100, n. 2, p. 168–171.
9. SILVA TM. **Produção e Determinação das Propriedades Funcionais das amilases de *Aspergillus niveus***; 2009; 216 f. Tese (Doutorado em Ciências) Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.
10. NOVOZYMES. 2014. Disponível em: <<http://www.novozymes.com>>. Acesso em: 13 mai.
11. SANTANA RSM. **Produção de Enzimas Amilolíticas através da Fermentação em Estado Sólido**. 2012. 73 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga.
12. PANDEY A, *et al.* Advances in microbial amylases. ***Biotechnol Appl Biochem***; 2000; v. 31, p. 135-52.
13. TEIXEIRA SI, GONÇALVES JI, VIEIRA E. Edulcorantes: uso e aplicação na alimentação, com especial incidência na dos diabéticos. ***Alimentação Humana***; 2011; v. 17, n. 1/2/3.



14. CASTELLANI A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. **Journal of Tropical Medicine & Hygiene**, [S.l.]; 1939; v. 24, p. 270-276.
15. HANKIN L, ANAGNOSTAKIS SL. The use of solid media for detection of enzymes production by fungi. **Mycologia**, New Haven; 1975; v. 67, n. 3, p. 597-607.
16. NEUFELD PM, OLIVEIRA PC. Preservação de dermatófitos pela técnica da água destilada estéril. **Revista Brasileira Análises Clínicas**, São Paulo; 2008; v. 40, n. 3, p. 167-169.
17. Sujeeta, KM, Shikha M, Khushboo S. Isolation and Screening of Amylase Producing Fungi. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*; 2017; v. 6, p. 783-788, n. 4.
18. BARATTO CM, *et al.* Seleção de microrganismos produtores de enzimas hidrolíticas isolados da região do meio oeste de Santa Catarina, Brasil. **Evidência**, Joaçaba; 2011; v. 11, n. 2, p. 15-28, jul./dez.
19. GIONGO JL. Caracterização e Aplicação de Proteases Produzidas por Linhagens de *Bacillus* sp; 2006; 81p. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre – RS.
20. SANTOS JEF, *et al.* Avaliação do crescimento de *Aspergillus terreus* isolado em solos de Caatinga. In: **Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão**, 13; 2013; Recife.

ANEXO 1

Teste de Tukey aplicado ao estudo do crescimento fúngico dos isolados CDSA 06, CDSA 09, CDSA 17, CDSA 18, CDSA 23, CDSA 24, CDSA 54, CDSA 56, CDSA 66 e CDSA 69 em diferentes tempos (24 – 144 horas)

	Tempo (h)					
	24	48	72	96	120	144
CDSA 06	1,15±0,1c	2,50±0,0cde	3,88±0,1bcd	5,15±0,2c	6,13±0,5c	6,73±1,1c
CDSA 09	0,80±0,1a b	2,33±0,1c	3,25±0,2abc	4,08±0,2b	4,60±0,2b	5,35±0,1b
CDSA 17	0,60±0,1a	1,58±0,1b	2,28±0,1ab	2,88±0,1a	3,38±0,1a	3,83±0,1a
CDSA 18	1,15±0,2c	2,68±0,2d	3,15±2,1abc	5,80±0,1d	6,83±0,2cd	8,18±0,2de
CDSA 23	1,00±0,2bc	2,63±0,1de	4,25±0,1cd	6,15±0,2d	7,35±0,6d	9,23±0,1e
CDSA 24	0,58±0,1a	1,30±0,1 ^a	1,98±0,1a	2,70±0,1a	3,38±0,1a	3,75±0,1a
CDSA 54	0,65±0,1a	2,35±0,1c	4,13±0,1cd	5,95±0,1d	7,53±0,1d	9,0±0,1de



CDSA							
56	0,70±0,1a	2,45±0,1cd	3,98±0,1cd	5,80±0,1d	7,03±0,4d	8,35±0,8de	
CDSA							
66	1,20±0,0c	3,20±0,0f	4,90±0,1d	5,90±0,2d	7,25±0,4d	7,90±0,1±0,6d	
CDSA							
69	0,58±0,1a	2,33±0,1c	4,18±0,1cd	5,95±0,1d	7,25±0,3d	8,85±0,1de	

Nota: Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes segundo o teste de Tukey considerando o $p < 0,05$.