

UNIVERSIDADE DO SAGRADO CORAÇÃO

MEGLYM ANGELICO

**BIOPROSPECÇÃO DE FUNGOS PRODUTORES DE
AMILASE**

BAURU
2014

MEGLYM ANGELICO

**BIOPROSPECÇÃO DE FUNGOS PRODUTORES DE
AMILASE**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Centro de Ciências da Saúde como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Biomedicina, sob orientação da Profª Drª Geisiany Maria de Queiroz.

BAURU
2014

Angelico, Meglym.

A582b

Bioprospecção de fungos produtores de Amilase /
Meglym Angelico -- 2014.

34f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Geisiany Maria de Queiroz.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em
Biomedicina) – Universidade do Sagrado Coração –
Bauru – SP.

1. Bioprospecção de fungos. 2. Amilase. 3. Lodo
ativado. I. Queiroz, Geisiany Maria de. II. Título.

MEGLYM ANGELICO

BIOPROSPECÇÃO DE FUNGOS PRODUTORES DE AMILASE

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Centro de Ciências da Saúde como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Biomedicina, sob orientação da Profª Drª Geisiany Maria de Queiroz.

Banca examinadora:

Profª. Drª. Geisiany Maria de Queiroz
Universidade do Sagrado Coração

Profª. Drª. Cynthia Barbosa Rustiguel
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (USP)

Profª. Ms. Vanessa Sato
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (USP)

Bauru, 01 de dezembro de 2014.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais,
razão da minha existência e aos quais
devo todas as minhas realizações.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pela vida e por me permitir alcançar esse sonho.

À Prof^a. Dr^a. Geisiany Maria de Queiroz, minha orientadora, pelos ensinamentos compartilhados, oportunidade, confiança e extrema paciência a mim dedicada.

À todos os meus professores que foram essenciais, ao longo desses anos, para meu amadurecimento.

Aos meus pais por todos os esforços para garantir meus estudos e pelos ensinamentos de vida, a quem devo parte do que tenho e do que sou. Agradeço a dedicação e amor recebidos sempre.

A meus amigos que participam, e me ajudaram nessa etapa, e acreditam no meu potencial.

À Universidade do Sagrado Coração pela oportunidade de concluir um curso de nível superior.

A todos, que de alguma forma, contribuíram para o meu crescimento acadêmico.

“Sonhos determinam o que você quer. Ação determina o que você conquista.”

(Aldo Novak)

RESUMO

Micro-organismos, principalmente fungos, são amplamente utilizados para a produção de enzimas aplicadas em indústrias, diminuindo custos e aumentando a rapidez e qualidade final dos produtos. As amilases são enzimas com potencial de hidrolisar as ligações glicosídicas do amido, e apresentam uma vasta gama de aplicações, tais como nas indústrias de papel, detergente, alimentícia e farmacêutica. Paralelamente aos estudos com enzimas, a bioprospecção tem sido alvo de incontestável interesse industrial, pois viabiliza tecnologias alternativas, permitem a reutilização de resíduos, minimizam os custos, além de contribuir para aquisição de produtos de qualidade. O objetivo deste estudo foi realizar a bioprospecção de fungos produtores de amilase de interesse industrial em lodo ativado residual obtido de uma indústria de celulose. O lodo ativado residual foi coletado após o processo de tratamento contínuo dos resíduos ácido e alcalino formados durante as etapas de branqueamento da celulose. Deste material, foram isolados em meio de cultura Ágar Sabouraud com Cloranfenicol (SDA+C), diferentes linhagens de micro-organismos, que pelas características macroscópicas, microscópicas e de crescimento, possivelmente são fungos filamentosos e leveduriformes. A obtenção do inóculo para a produção enzimática foi dada através do cultivo destes fungos em meio SDA+C e após a incubação as células foram contadas em câmara de Neubauer para a obtenção da concentração de 10^7 células/mL, utilizada em todas as produções enzimáticas. A produção de amilase foi realizada em agitador orbital com controle de temperatura, em Erlenmeyers de 200 mL com um volume total de 50 mL de meio de cultura previamente descrito na literatura. A determinação de proteínas foi realizada pelo método de Bradford e a quantificação da atividade enzimática pelo método de DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico), utilizando amido solúvel como substrato. A bioprospecção em lodo ativado residual foi efetiva, pois foi possível isolar 5 fungos capazes de produzir amilase, apresentando valores de atividade específica de linhagem 1: 238 U/mg, linhagem 2: 1008 U/mg, linhagem 3: 325,5 U/mg, linhagem 4: 1586 U/mg e linhagem 5: 1145 U/mg, sendo que, considerando este dado, a linhagem fúngica 4 foi o produtor de amilase mais eficiente.

Palavras-chave: Bioprospecção de fungos. Amilase. Lodo ativado.

ABSTRACT

Microorganisms, especially fungi, are widely used for the production of enzyme applied in industries, reducing costs and increasing the speed and quality of end products. Amylases are enzymes with the potential to hydrolyze glycosidic linkages of starch, and exhibit a wide range of applications such as in paper, detergent, food and pharmaceutical industries. In parallel to the studies with enzymes, bioprospecting has undergone undeniable industrial interest because it enables alternative technologies, allow reuse of waste, minimize costs, and contribute to the acquisition of quality products. The aim of this study was to conduct bioprospecting fungus amylase producers of industrial interest in waste activated sludge obtained from a pulp industry. The waste activated sludge process was collected after the continuous treatment of acid and alkaline residues formed during the pulp bleaching stages. Of this material were isolated in culture medium Sabouraud Agar with Chloramphenicol (SDA+C), different strains of micro-organisms which by macroscopic features are possibly yeast and filamentous fungal. For obtaining the inoculum the enzyme production was given by cultivating the microorganisms among SDA+C and after incubation the cells were counted in a Neubauer chamber for obtaining the concentration 10^7 cell/mL, the enzyme used in all production. The amylase production was performed in an orbital shaker with temperature control, in 200 mL Erlenmeyer flasks with a total volume of 50 mL of culture medium previously described in the literature. The protein determination was performed by the Bradford method and quantification of enzymatic activity by DNS method (3,5-dinitrosalicílico) using soluble starch as a substrate. The bioprospecting in sludge activated was effective since it was observed that five fungi were isolated and all were capable of producing amylase, with values of specific activity lineage 1: 238 U/mg, 2 lineage: 1008 U/mg , lineage 3: 325.5 U/mg, lineage 4: 1586 U/mg and lineage 5: 1145 U/mg, the fungi 4 it is a producer more efficiently amylase.

Keywords: Bioprospecting of fungal. Amylase. Activated sludge.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Atuação de alfa-amilase e beta-amilase.....	15
Figura 2: Características macroscópicas dos fungos isolados a partir do lodo ativado residual.....	24
Figura 3: Extrato bruto e biomassa obtidos após a produção da enzima	24
Figura 4: Atividade específica de amilase produzida pelas 5 linhagens fúngicas isoladas do lodo ativado residual.....	26

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 FUNGOS E SUAS APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS	13
2.2 ENZIMAS	13
2.3 AMILASE.....	14
2.4 BIOPROSPECÇÃO EM LODO ATIVADO RESIDUAL.....	15
3 OBJETIVO	17
3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
4 MATERIAL E MÉTODOS	18
4.1 MATERIAIS	18
4.1.1 Solventes, reagentes e meios de cultura	18
4.1.2 Equipamentos.....	18
4.2 METODOLOGIA	19
4.2.1 Obtenção do lodo ativado residual	19
4.2.2 Isolamento dos fungos do lodo ativado residual.....	19
4.2.3 Manutenção dos fungos isolados	19
4.2.4 Obtenção de inóculo para a produção enzimática.....	19
4.2.5 Produção de Amilase.....	20
4.2.6 Recuperação da enzima	20
4.2.7 Métodos analíticos.....	20
4.2.7.1 Determinação do coeficiente de extinção molar	21
4.2.7.2 Determinação da atividade de amilase	21
4.2.7.3 Determinação de proteínas pelo método de Bradford.....	21
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	23
6 CONCLUSÃO	29
7 REFERÊNCIAS.....	30

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento sustentável é um grande desafio para a humanidade e os processos biotecnológicos que empregam recursos renováveis vêm contribuindo com essa questão, uma vez que, permitem a obtenção e desenvolvimento de produtos inovadores, com alta qualidade, reduzindo, em muitos casos, o acúmulo de resíduos considerados tóxicos ao meio ambiente (LOPES et al., 2005; GOGATE; KABADI, 2009).

Micro-organismos são utilizados para a obtenção de produtos de interesse a saúde humana e ao meio ambiente nos mais variados setores industriais. A diversidade apresentada por estes micro-organismos permite a observação de inúmeras características metabólicas que levam a infinitas possibilidades de aplicação (DEMIAN e ADRIA et al., 2008; FERRER et al., 2009). Produtos de origem microbiana já geraram nos EUA cerca US\$ 100 bilhões no setor industrial (DEMIAN e ADRIA et al., 2008). Dentre esses produtos destacam-se as enzimas, que podem ser obtidas a partir de diferentes micro-organismos, como os fungos filamentosos, que são considerados bons produtores (SAID; PIETRO, 2004; TREICHEL et al., 2010).

Enzimas são proteínas que possuem atividade catalítica, ou seja, aceleram a velocidade de reações químicas. Devido aos problemas com o meio ambiente, muitos processos químicos em diferentes indústrias estão sendo substituídos por enzimas e atualmente essas são empregadas em diferentes setores como terapêutico, remoção de diferentes resíduos, indústria têxtil, kits diagnósticos, indústria farmacêutica e de alimentos, indústria de detergentes, petróleo, indústria celulose dentre outras. Para atuarem corretamente precisam de condições específicas como concentração de substrato, temperatura e pH ótimos. A principal vantagem do emprego de enzimas se deve a alta especificidade dessas em relação a seus substratos, gerando eficientemente seus produtos (BARREDO, 2005; SAID; PIETRO, 2004; TREICHEL et al., 2010).

Amilases são enzimas capazes de hidrolisar as ligações glicosídicas do amido e são divididas em alfa-amilases (EC 3.2.1.1) e beta-amilases (EC 3.2.1.2), dependendo da ligação onde atuam nos substratos. Podem ser obtidas a partir de plantas, animais e micro-organismos, como bactérias e fungos (PANDEY et al., 2005; RAJAGOPALAN ; KRISHNAN, 2008).

O processo de bioprospecção que é definido como a exploração da biodiversidade, para a descoberta de novos recursos, micro-organismos, compostos bioativos, proteínas e produtos para uso comercial, tem contribuído para a identificação de novos gêneros de fungos isolados do meio ambiente, com grande capacidade metabólica. A rica biodiversidade brasileira favorece os processos de bioprospecção, uma vez que, os solos são repletos de micro-organismos, muitas vezes, usados em pesquisas, para a produção de recursos naturais, na indústria, e ainda para a descoberta de novas enzimas microbianas, alimentos, cosméticos, inseticidas e defensivos. Neste contexto, verifica-se a importância de estudos de bioprospecção para a exploração de recursos genéticos e bioquímicos que podem contribuir para o desenvolvimento sustentável do Brasil (LOPES et al., 2005).

O tratamento biológico de resíduos industriais ocorre principalmente empregando-se lodos ativados, que no Brasil são, geralmente, fornecidos pela CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental). Sabe-se que o lodo ativado, em sua maior parte, é formado por uma população mista de bactérias e fungos, que por meio de processos fermentativos aeróbios são capazes de degradar substâncias tóxicas antes do descarte desses resíduos em águas fluviais. Após esses processos um lodo ativado residual é gerado, existindo duas possibilidades de descarte final, o uso como biofertilizante, ou a incineração (BEWICK, 1980), o que gera aumento de custos de fabricação de produtos, além de emissão de poluentes. Dentre esses micro-organismos são encontrados com maior frequência fungos do gênero *Geotrichum*, bactérias unicelulares, pertencentes aos gêneros *Achromobacterium*, *Chromobacterium* e *Pseudomonas* sp., todos com ação proteolítica, porém, sabe-se ainda que essa constituição microbiana pode sofrer variações no decorrer do tempo de utilização do lodo. Diante disso, e da possibilidade de ativação de diferentes rotas bioquímicas durante os processos de degradação de substâncias tóxicas, o lodo ativado residual, pode configurar uma importante fonte para o isolamento de fungos potencialmente produtores de enzimas de interesse industrial (LOPES et al., 2005; BRASIL, 2014).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 FUNGOS E SUAS APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS

Fungos são micro-organismos capazes de produzir uma vasta gama de enzimas, estão amplamente distribuídos na natureza e representam o segundo maior grupo em número de espécies, ficando atrás apenas dos insetos, são de fácil cultivo, podendo ser encontrado como fungos filamentosos e/ou leveduriformes (MADGAN et al., 2004).

Fungos filamentosos habitam os mais diferentes ambientes naturais como solo, corpos de água, matérias orgânicas em decomposição, compostagem e parasitam ainda plantas e animais, possuem grande capacidade de usar uma extensa variedade de fontes de carbono e nitrogênio para seu desenvolvimento (FEOFILOVA, 2001).

As enzimas extracelulares de micro-organismos são preferidas na produção industrial por diversos motivos como melhor custo-benefício, uniformidade, menos tempo e espaço necessários para produção e pela facilidade de modificar e aperfeiçoar o processo. Diferentemente das enzimas vegetais e animais, as de origem microbiana não estão sujeitas as intempéries climáticas, uma vez que são produzidas em fermentadores onde as condições de cultivo podem ser facilmente controladas e manipuladas (GUIMARÃES et al., 2006; MITCHELL, 2000).

Com o decorrer de inúmeros estudos e avanços científicos os fungos vêm adquirindo um *status* de destaque em vários tipos de indústrias, uma vez que existe a possibilidade de utilizá-los como produtores de diferentes substâncias de interesse econômico como enzimas, antibióticos, vitaminas, entre outras (SOARES et al., 2010).

2.2 ENZIMAS

Enzimas são proteínas biocatalisadoras com alto grau de especificidade em relação às reações que catalisam e aos substratos que estão envolvidos nessas reações, sendo em sua maioria, polímeros constituídos por aminoácidos ligados por ligações peptídicas covalentes. Com a propriedade de catalisar a maioria das reações bioquímicas, as enzimas diminuem a energia de ativação necessária para que se dê uma reação química. E por serem eficientes catalisadores, são empregadas em diferentes setores industriais como na indústria farmacêutica, alimentar, têxtil, entre outras. Sua atividade catalítica depende da integridade de sua conformação, sendo

essenciais suas estruturas primárias, secundárias, terciárias e quaternárias. Dessa forma, se uma enzima for desnaturada ou dissociada em suas subunidades, a atividade catalítica é normalmente perdida (TREICHEL et al., 2010).

Essas proteínas são amplamente utilizadas nas indústrias, pois efetuam conversões eficientes, econômicas, podem atuar em concentrações baixas, sob condições brandas de pH e temperatura e, principalmente, são biodegradáveis o que contribui para a preservação do meio ambiente. As amilases, celulasas, pectinases, lipases e proteases são exemplos de enzimas vastamente utilizadas, sendo úteis em vários setores da economia demonstrando sua importância comercial (MACIEL et al., 2010; SILVA, 2010).

2.3 AMILASE

Dentre as enzimas mais estudadas e utilizadas em diferentes segmentos industriais encontram-se as amilases, que devido à sua especificidade atua sobre moléculas de amido. O amido está amplamente distribuído na natureza, sendo encontrado, principalmente, em sementes de cereais, como milho, trigo e arroz, em raízes, como mandioca e batata, sendo considerado o principal polissacarídeo de reserva das plantas superiores.

Amilases são enzimas que possuem a capacidade de hidrolisar as ligações glicosídicas dos monossacarídeos de carboidratos, são divididas em alfa-amilase e beta-amilase. Alfa-amilase são endoenzimas que hidrolisam as ligações glicosídicas α -1,4 internas da amilose e amilopectina, que libera oligossacarídeos, beta-amilase são exoenzimas que hidrolisam α -1,4- a partir da extremidade não redutora da cadeia do amido, que libera unidades de maltose e 1,6 glicosídicas de polissacarídeos, como representado na Figura 1 (KOBBLITZ, 2008; SILVA, 2009).

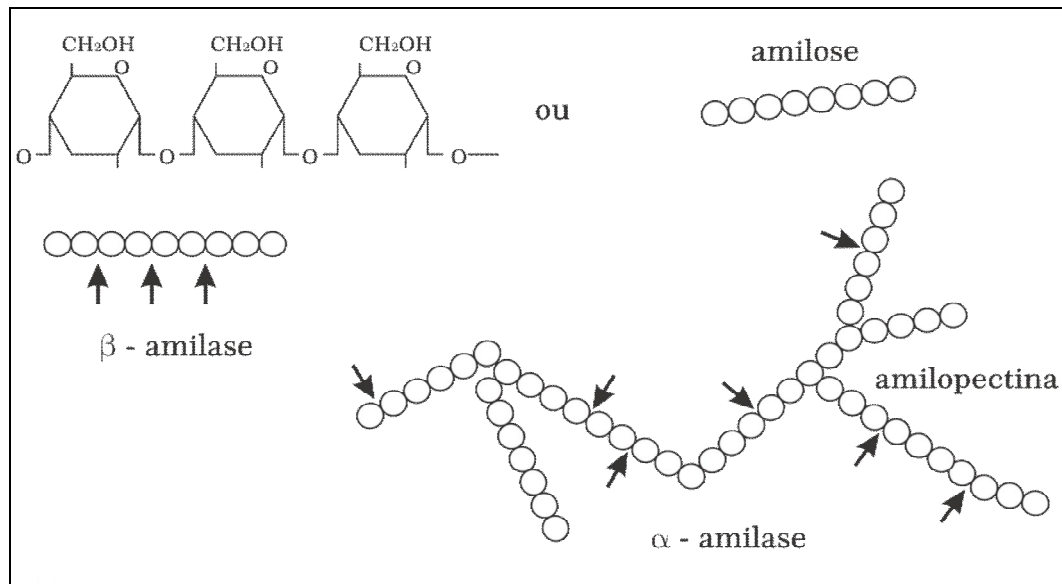


Figura 1: Atuação de alfa-amilase e beta-amilase (GAVA et al., 2008).

Essas enzimas ocupam cerca de 30% da produção mundial de enzimas voltada para a indústria, ficando atrás apenas das proteases. Dentre as amilases fúngicas, as que apresentam maior interesse industrial são as alfa-amilase e beta-amilase (OLIVEIRA et al., 2010).

2.4 BIOPROSPECÇÃO EM LODO ATIVADO RESIDUAL

A bioprospecção vem sendo estudada paralelamente à produção de enzimas fúngicas, sendo caracterizada como uma prática rentável dentro da biotecnologia, pois além de contribuir para a aquisição de novos produtos de qualidade possibilita a utilização de tecnologias alternativas que permitem a reutilização de resíduos, favorecendo a redução de custos na obtenção desses bioprodutos, configurando uma prática sustentável.

De acordo com Saccaro Júnior (2011), a bioprospecção é uma das maneiras de se extrair valor econômico da biodiversidade, sendo definida como a busca sistemática por organismos, genes, enzimas, compostos, processos e partes provenientes de seres vivos em geral, que possam ter um potencial econômico e, eventualmente, levar ao desenvolvimento de um produto.

Lodo ativado é resultante de um processo de tratamento de esgoto destinado à destruição de poluentes orgânicos biodegradáveis presentes em águas residuárias,

efluentes e esgotos. Seu emprego se baseia na oxidação da matéria orgânica, por meio de bactérias aeróbias, controlando o excesso de oxigênio em tanques de aeração e posteriormente direcionado aos decantadores. O lodo decantado retorna ao tanque de aeração como forma de reativação da população de bactérias no tanque de aeração. Este retorno ocorre na entrada do tanque onde o lodo em fase endógena se mistura ao efluente rico em poluente, aumentando assim a eficiência do processo, é um dos processos mais utilizados no tratamento biológico aerado contínuo com reciclagem de biomassa.

Porém, parte desse lodo, é considerado residual e precisa ser descartado, sendo reaproveitado em processos de adubagem ou incinerado, sendo que nesse último caso, há geração de poluentes que são lançados a atmosfera. O lodo ativado em sua maior parte é formado por uma população mista de bactérias agregadas e fungos, que podem apresentar grande potencial para a produção de substâncias economicamente interessantes como, por exemplo, enzimas (BRASIL, 2014).

3 OBJETIVOS GERAIS

O presente trabalho de pesquisa teve como objetivo realizar bioprospecção de fungos produtores de amilase em lodo ativado residual de uma indústria de celulose.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter o lodo ativado residual;
- Isolar fungos do lodo ativado residual;
- Promover o crescimento e manutenção das linhagens fúngicas isoladas;
- Produzir amilase a partir dessas linhagens fúngicas;
- Determinar a concentração de proteínas totais no extrato bruto enzimático;
- Determinar a atividade de amilase no extrato bruto enzimático;
- Calcular a atividade específica da amilase obtida.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

4.1.1 Solventes, reagentes e meios de cultura

Ágar Sabouraud dextrose com Cloranfenicol (SDA+C) – Acumedia

Glicose - Nuclear

Amido solúvel- Dinâmica

Peptona- Acumedia

Extrato de levedura- Merck

Sulfato de amônio- Dinâmica

Fosfato de potássio- Merck

Sulfato de magnésio- Dinâmica

Cloreto de sódio- Cromoline

Cloreto de cálcio- Synth

Sulfato de zinco- Dinâmica

Cloreto de cobalto- Synth

Sulfato de manganês- Reagen

Reagente de Bradford- Sigma Aldrich

NaOH- Dinâmica

Tartarato de sódio e potássio- Neon

Metabissulfito de sódio- Reagen

Fenol- Dinâmica

Acetato de sódio- Dinâmica

ácido acético- Dinâmica

4.1.2 Equipamentos

Shaker- Tecnal TE 420

Fluxo Laminar- VECO

Estufa micológica- Fanem

Banho maria- FANEM

Microscópio- Nikon E 100

Espectrofotômetro-BEL

Autoclave vertical- Phoenix
Placas de Petri
Pipetas de volume variável
Ponteiras
Tubos Falcon
Espátulas

4.2 METODOLOGIA

4.2.1 Obtenção do lodo ativado residual

O lodo ativado residual foi cedido por uma indústria de celulose do Estado de São Paulo, sendo que esse foi coletado após o processo de tratamento contínuo dos resíduos ácido e alcalino formados durante as etapas de branqueamento da celulose.

4.2.2 Isolamento dos fungos do lodo ativado residual

Para o isolamento dos fungos empregou-se o meio de cultura Ágar Sabouraud com Cloranfenicol (SDA+C), que foi preparado segundo as orientações do fabricante, esterilizados em autoclave a 121 °C e vertido em placas de Petri de 25 mm.

Pesou-se 1g do lodo ativado residual e diluiu-se em 9 mL de água destilada previamente esterilizada (diluição 1:9), homogeneizou-se e transferiu-se 1 mL desse líquido para duas placas de Petri contendo o meio SDA+C e com o auxílio de alça de Drigalski espalhou-se o líquido sobre o meio. As placas foram incubadas a 28 °C por cerca de 7 dias.

Após o período de incubação observou-se o crescimento de diferentes colônias que foram isoladas com auxílio de agulha em tubos contendo o meio SDA+C. Todos os procedimentos foram realizados em zona asséptica, utilizando a capela de fluxo laminar e bico de Bunsen.

4.2.3 Manutenção dos fungos isolados

A manutenção destes fungos se deu em meio de cultura Ágar Sabouraud com Cloranfenicol (SDA+C) a 28 °C com repiques quinzenais.

4.2.4 Obtenção de inóculo para a produção enzimática

Para obtenção dos inóculos, os fungos foram cultivados em placas de Petri, contendo 25 mL de meio SDA+C e foram incubados por cerca de 7 dias em estufa a 28°C. Após este período, as placas foram raspadas e as células microbianas foram ressuspensas em água, previamente esterilizada, e contadas em câmara de Neubauer para a obtenção da concentração 10^7 células/mL, utilizada em todas as produções enzimáticas.

4.2.5 Produção de Amilase

A produção de amilase foi realizada em agitador orbital com controle de temperatura, em Erlenmeyers de 200 mL com um volume total de 50 mL de meio de cultura em cada.

O meio de cultura e as condições de cultivo utilizadas foram as descritos por Carlsen e Nielsen (2001), modificado por (Queiroz, 2014). Este meio consistiu de 5 g de amido solúvel; 0,5 g de peptona; 0,5 g de extrato de levedura; 2,5 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,75 g de KH_2PO_4 ; 1,0 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1,0 g de NaCl; 0,1 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e 0,5 mL solução de traços de metais. Esta solução contém por litro: 14,3 g de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 2,5 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 0,5 g de $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e 13,8 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, previamente esterilizado. O pH inicial do meio foi ajustado para 6,0, com ácido e/ou base fraca; incubado durante 7 dias, com agitação na velocidade de 200 rpm e temperatura de 30°C. A produção enzimática foi realizada em duplicata biológica.

4.2.6 Recuperação da enzima

Após a produção enzimática, os extratos brutos foram filtrados em papel de filtro de 0,45 μm com bomba a vácuo para retirada da biomassa e o filtrado foi armazenado a -20°C para posteriores análises.

4.2.7 Métodos analíticos

4.2.7.1 Determinação do coeficiente de extinção molar

As curvas analíticas foram baseadas em soluções-padrão, com substâncias específicas para cada caso, no caso da curva analítica para determinação da

concentração de proteínas empregou-se a solução de soro albumina bovino e da atividade de amilase solução de glicose, com concentrações de 0,1 a 2 mg/mL, e que foram submetidas ao mesmo procedimento das amostras. A determinação do coeficiente de extinção molar foi baseada na lei de Lambert-Beer e se deu da seguinte maneira: o gráfico da curva da absorbância x concentração da amostra ($\mu\text{mols/mL}$) foi traçado e determinado o coeficiente angular. O coeficiente de extinção molar (ϵ) foi determinado a partir da seguinte equação: $A = \epsilon \cdot b \cdot c$, em que $A =$ Absorbância, $\epsilon =$ absorvidade, $b =$ caminho óptico (1 cm) e $c =$ concentração. Como $b = 1$, obtivemos: $\epsilon = A \div c$, em que ϵ é dado por $\mu\text{mols} \cdot \mu\text{L}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Os valores de ϵ para a curva de albumina de soro bovino, foi $\epsilon = 0,001$, e para a curva glicose $\epsilon = 0,002$.

4.2.7.2 Determinação da atividade de amilase

Para a quantificação da atividade enzimática que foi realizada segundo o método descrito por Kammoun et al. (2008), com modificações, utilizou-se amido solúvel como substrato. Foram adicionados a um tubo contendo 500 μL de solução de amido solúvel a 1% em tampão acetato (pH- 5,6) 50 μL do extrato enzimático, e no branco foi adicionado 500 μL de solução de amido solúvel a 1% em tampão acetato (pH- 5,6) 50 μL de água destilada, esta reação foi incubada a 60°C por 30 minutos. Os açúcares redutores liberados foram quantificados pelo método do ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS). Em seguida, a atividade enzimática foi calculada de acordo com a seguinte fórmula:

$$\frac{\text{absorbância (540 nm)} \times \text{vol. ensaio}}{\epsilon \times \text{tempo (min)} \times \text{vol. amostra}}$$

Considerou-se que uma unidade de amilase foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de glicose por minuto de reação conforme as condições descritas.

4.2.7.3 Determinação de proteínas pelo método de Bradford

Foram adicionados em tubo de ensaio 50 µL dos extratos brutos enzimáticos a serem dosados e 1,5 mL do reagente de Bradford, adquirido comercialmente. Esta mistura foi incubada por 5 minutos em temperatura ambiente e procedeu-se a leitura em 595 nm em espectrofotômetro, as proteínas foram quantificadas empregando-se uma curva analítica contendo albumina de soro bovino como padrão (BRADFORD, 1976).

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Foram isoladas cinco linhagens diferentes de fungos do lodo ativado residual, tendo como características macroscópicas aspectos filamentosos e leveduriformes, além de outras características descritas na Tabela 1 e demonstradas ainda na Figura 2.

Tabela1: Características macroscópicas, microscópicas e de crescimento das linhagens fúngicas isoladas.

Fungos	Macroscopia	Microscopia	Crescimento
Linhagem 1	Filamentoso Verde musgo	Esporos enegrecidos	Lento
Linhagem 2	Filamentoso Verde acinzentado	Esporos enegrecidos	Lento
Linhagem 3	Filamentoso, algodonoso Verde e branco	Esporos	Lento
Linhagem 4	Leveduriforme, rugosa Branca, cremoso	Blatoconídeo, pseudohifas, hifas verdadeiras	Rápido
Linhagem 5	Leveduriforme, rugosa Branca, cremoso	Blatoconídeo, pseudohifas, hifas verdadeiras	Rápido

(Fonte: arquivo próprio)

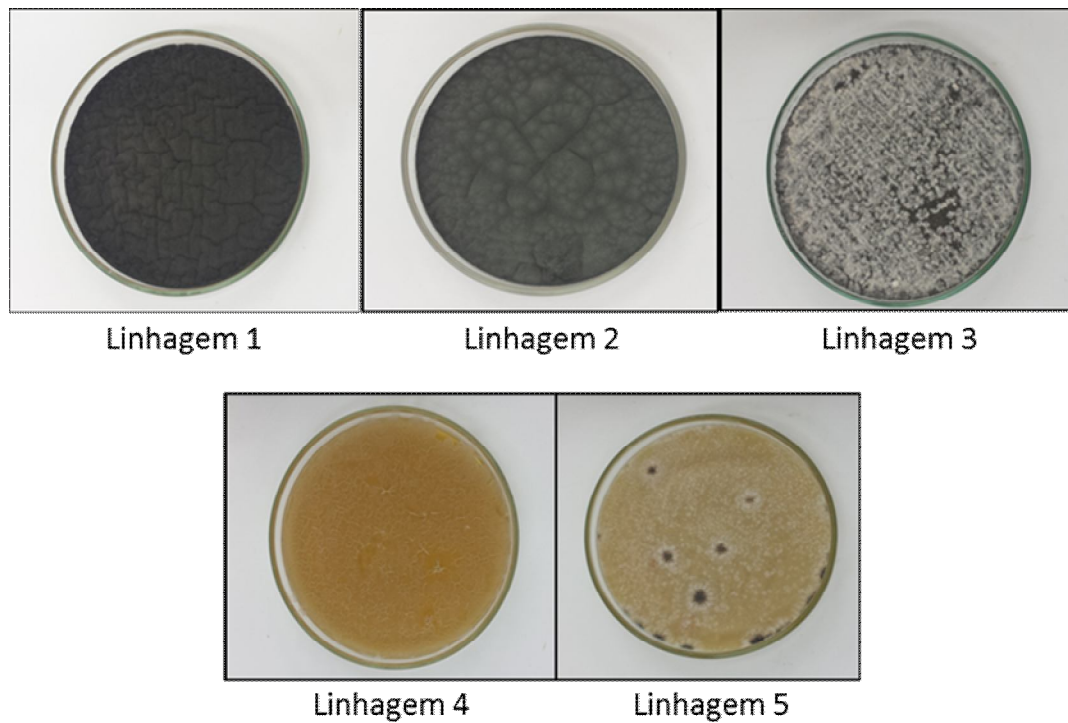


Figura 2: Características macroscópicas dos fungos isolados a partir do lodo ativado residual. (Fonte: arquivo próprio)

Após o período de incubação das linhagens fúngicas obteve-se o extrato bruto e a biomassa, representados na Figura 3, que foram separados por processo de filtragem.



Figura 3: Extrato bruto e biomassa obtidos após a produção da enzima, após 7 dias incubação a 30°C. (Fonte: arquivo próprio)

A partir da leitura dos valores de absorbância, de soluções padrões de concentrações conhecidas, obteve-se a curva analítica com a qual pode-se determinar a concentração de proteínas totais pelo método de Bradford. A atividade enzimática pode ser avaliada medindo-se a velocidade de consumo do substrato ou a velocidade de aparecimento do produto. Esta atividade depende de vários fatores, tais como o tempo de reação, a concentração da enzima, a concentração do substrato, a temperatura, o pH do meio e a presença de cofatores e/ou inibidores (MACIEL, PACHECO, GONÇALVES, 2010; SILVA, 2010). A atividade específica é o número de unidade de enzimas por miligrama de proteína, mede a pureza da enzima (MACIEL, PACHECO, GONÇALVES, 2010; SILVA, 2010). Os resultados obtidos das médias dos valores calculados da produção realizada em duplicata biológica, bem como o desvio padrão, estão demonstrados na Tabela 2 e Figura 4.

Tabela2: Produção obtida a partir de diferentes linhagens fúngicas isoladas de lodo ativado residual.

Fungos	Concentração de Proteínas (mg/mL)	Atividade de Amilase (U/min/mL)	Atividade Específica (U/mg)
Linhagem 1	0,005±0,007	1,19±0,7	238 ±0,7
Linhagem 2	0,010±0,008	10,08±0,8	1.008±0,8
Linhagem 3	0,018±0,007	5,86±0,7	325,5±0,7
Linhagem 4	0,003±0,009	4,76±0,9	1.586±0,9
Linhagem 5	0,048±0,008	55±0,8	1.145±0,8

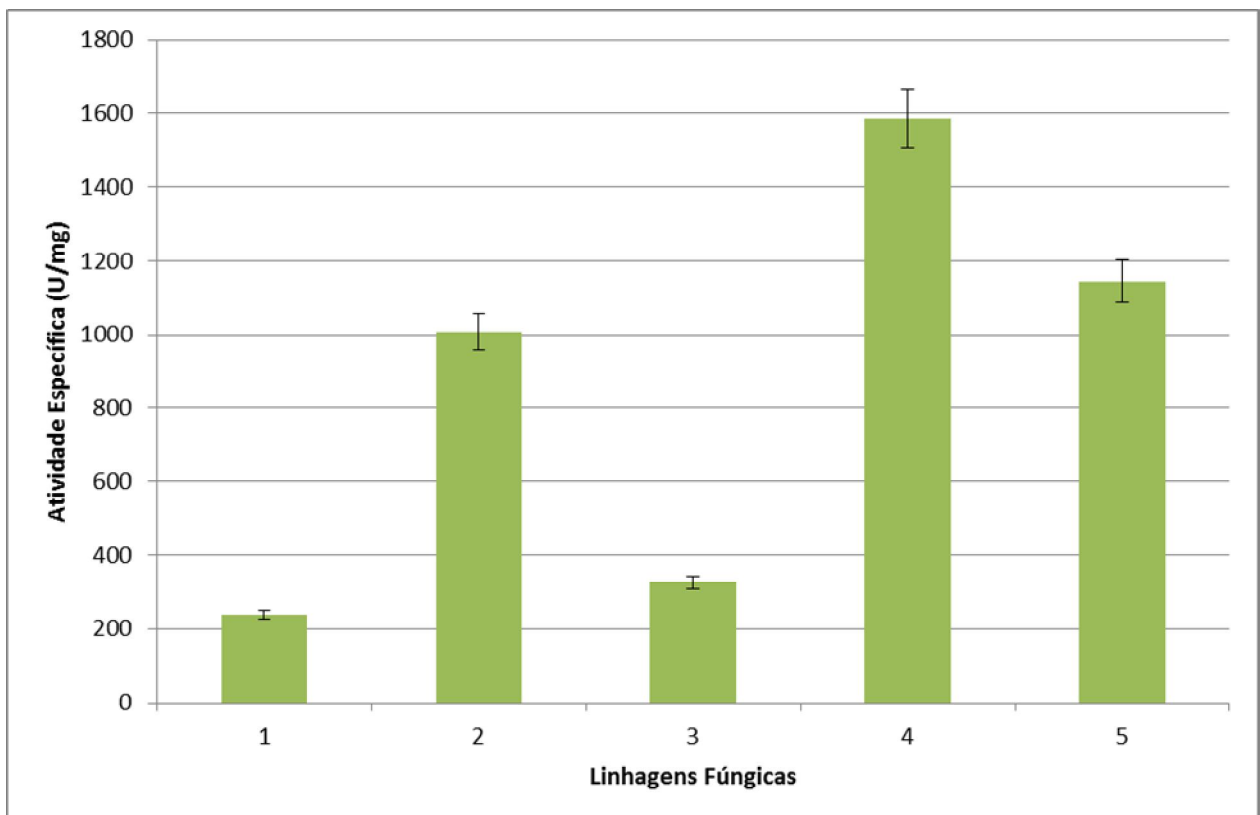


Figura 4: Atividade específica de amilase produzida pelas 5 linhagens fúngicas isoladas do lodo ativado residual.

Amilases fúngicas são empregadas em inúmeros setores industriais. Entre as linhagens fúngicas obtidas do lodo ativado residual, neste estudo, em relação à concentração de proteínas, a linhagem 5 foi a maior produtora, seguida pela linhagem 3. Em relação à atividade de amilase, a linhagem 5 também apresentou maior atividade, seguida pela linhagem 3, porém, a linhagem 4 foi a que mostrou maior atividade específica, sendo 1586 U/mg, apesar de não existir consenso científico a respeito da atividade específica ideal obtida de uma enzima em estado bruto. A linhagem 4 apresentou atividade específica promissora. A enzima produzida mais eficientemente nessa pesquisa apresenta valor considerável, podendo este ser mantido ou aperfeiçoado após as etapas de purificação (SOUZA et al., 2010). As diferenças dos valores de atividade, observados neste estudo, podem estar relacionadas a características particulares das células microbianas. Os micro-organismos podem expressar quantidades de proteínas diferentes, dependendo ainda de seu metabolismo, pH, temperatura da reação, além do meio nutricional que influenciam na produção enzimática (DELABONA, 2011).

A produção de amilase como as condições de fermentação, pH, temperatura e substratos, quantidade de nutrientes foram os mesmo para todos, por isso essas condições podem não ser as mais adequadas para as linhagens que se demonstraram menos eficientes (DELABONA, 2011).

Micro-organismos de maneira geral, especialmente fungos, são reconhecidamente importantes produtores de uma variedade de compostos de interesse biotecnológico como proteínas, enzimas, polímeros, entre outros. As principais vantagens do uso desses micro-organismos como produtores de compostos de importância biotecnológica estão relacionadas ao baixo custo de produção e à facilidade de se controlar as condições de crescimento e produção, cuja eficiência pode ser observada pelo rendimento de biomassa no processo de fermentação e quantificação do produto de interesse (SAID; PIETRO, 2004; PELIZER et al., 2007). Dessa forma no presente estudo, foi realizada bioprospecção de fungos em lodo ativado residual, no intuito de encontrar micro-organismos com potencial de produção de amilase, contribuindo com práticas sustentáveis (LOPES et al., 2005).

A capacidade de produção de amilase por essas linhagens fúngicas foi analisada empregando-se o cálculo de atividade enzimática, sendo que este é um dos parâmetros quantitativos mais usados para se avaliar a capacidade de produção de enzimas pelos micro-organismos. A maior parte das amilases fúngicas descritas são produzidas por organismos mesofílicos, cujas temperaturas de crescimento variam de 25 a 37°C, sendo que os fungos do gênero *Aspergillus* são grandes produtores e mais comumente empregados, especialmente o *A. oryzae* e *A. niger* (GUPTA et al., 2003; SAID; PIETRO, 2004; SOUZA et al., 2010).

Segundo Chimata et al. (2011), Ichinose et al. (2013) e Sapna (2014) a produção de amilase por *A. oryzae* e *A. niger* mostraram boa eficiência, com produção elevada, porém esclarecem que a otimização das condições de cultivo é prática indispensável para um desenvolvimento de bioprocessos para que se possa encontrar maiores valores nas produções fúngicas.

É certo que a partir deste estudo, outros futuros, poderão ser desenvolvidos como para realizar a identificação destes fungos, a caracterização da amilase e até mesmo ensaios de aplicações destas.

6 CONCLUSÃO

A bioprospecção evidenciou a presença de fungos capazes de produzirem amilases, com considerável atividade específica, em lodo ativado residual obtido de uma indústria de celulose do Estado de São Paulo. No entanto, estudos complementares são necessários para a realização da identificação destes fungos, além de estudos futuros de caracterização das amilases obtidas e aplicações.

REFERÊNCIAS

BARREDO, J. L. Microbial enzymes and biotransformations. Humana Press Totowa. In: SABU, A.; NAMPOOTHIRI, K.M.; PANDEY, A. **L- Glutaminase as a therapeutic enzyme of microbial origin**, New Jersey. 2005.

BEWICK, M. W. M. **Handbook of organic waste conversion**. New York: Litton Education Publishing, 1980.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1, p. 248-254, 1976.

BRASIL. CETESB (Companhia Ambiental do Estado de São Paulo). **Manual técnico da microbiologia para sistemas de lodos ativados operando com esgotos domésticos. Norma técnica L1.025.** Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/servicos/normas---cetesb/43-normas-tecnicas---cetesb>. Acesso: 07 de outubro de 2014.

CARLSEN, M.; NIELSEN, J. Influence of carbon source on alfa-amylase production by *Aspergillus oryzae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 57, p. 346–349, 2001.

CHIMATA. M. K; CHETTY. C. S; SURESH.C. Fermentative Production and Thermostability Characterization of α Amylase from *Aspergillus* Species and Its Application Potential Evaluation in Desizing of Cotton Cloth. **Biotechnology Research International**, p. 1-8, 2011.

DELABONA. P. S; **Bioprospecção de fungos produtores de celulases da região amazônica para a produção de etanol celulósico**. 2011. 121p. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Carlos. São Paulo, 2011.

DEMIAN, A. L.; ADRIO, J. L. Contributions of microorganisms to industrial biology. **Molecular Biotechnology**, v. 38, n. 1, p. 41–55, 2008.

FERRER, M. et al. Metagenomics forming new genetic resources of microbial communities. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 16, n. 1-2, p. 109–123, 2009.

FEOFILOVA, E. The kingdom fungi: Heterogeneity of Physiological and Biochemical Properties and Relationships with Plants, Animals, and Prokaryotes. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 37 2001

GAVA, A. J; SILVA, C. A. B; FRIAS, J. R. G. **Tecnologia de alimentos: princípios e aplicações**. Nobel. p. 301. São Paulo. 2008

GOGATE, P. R.; KABADI, A. M. A review of applications of cavitation in biochemical. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, n. 1, p. 60–72, 2009.

GUIMARÃES, L. H. S. et al., Screening of filamentous fungi for production of enzymes of biotechnological interest. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p.474-480, 2006.

GUPTA, R. et al., Microbial alpha-amylases: a biotechnological perspective. **Process Biochem**, v. 38, p. 1599-1616, 2003.

ICHINOSE. S.; TANAKA. M.; SHINTANI. T.; GOMI. K. Improved α -amylase production by *Aspergillus oryzae* after a double deletion of genes involved in carbon catabolite repression; **Applied Microbiology and Biotechnology**, p. 1-9, 2013.

KAMMOUN, R.; NAILI, B.; BEJAR, S. Application of a statistical design to the optimization of parameters and culture medium for alfa-amylase production by *Aspergillus oryzae* CBS 819.72 grown on gruel (wheat grinding by-product). **Bioresource Technology**, v. 99, n. 13, p. 5602–5609, 2008.

KOBLITZ, M.G. **Bioquímica de Alimentos: Teoria e Aplicações Práticas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 242 p. 2008.

LOPES, M. A.; NASS, L. L.; MELO, I. S. Biotecnologia aplicada a prospecção e uso de serviços e funções da biodiversidade. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**. n. 34, p. 29-35, 2005.

MACIEL, V. F. A.; PACHECO, T. F.; GONÇALVES, S.B. Padronização do uso do corante rodamina B para avaliação de atividade lipolítica em estirpes fúngicas. **Comunicado Técnico Embrapa**. v.1. p.1 - 3, 2010.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. São Paulo: Pearson Education., v.1, p.466-467. 2004.

MITCHELL, D.A.; BEROVIC, M.; KRIEGER, N. Biochemical Engineering Aspects of Solid State Bioprocessing. **Advances in Biochemical Engineering Biotecnology**, v.68, p. 61-138, 2000.

OLIVEIRA, A.N.; FLOR, N.S.; OLIVEIRA, L.A. Influência do pH e temperatura sobre a atividade amilolítica de rizóbios isolados de solos da Amazônia. **Acta Amazônica**. 40(2) 2010: 401 – 404, 2010.

PANDEY, A; WEBB, C; SOCCOL, C. R; LARROCHE, C. **Enzyme technology**. New Delhi: Asiatech Publishers, 2005.

PELIZER, L.H.; PONTIERI, M.H.; MORAES, I.O. Utilização de resíduos agroindustriais em processos biotecnológicos como perspectiva de redução do impacto ambiental. **Journal of Technoogy & Management Innovation**, v. 2, n. 1, p. 118-127, 2007.

RAJAGOPALAN, G.; KRISHNAN, C. Alpha-amylase production from catabolite derepressed *Bacillus subtilis* KCC103 utilizing sugarcane bagasse hydrolysate. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 8, p. 3044-3050, 2008.

SACCARO JUNIOR, N. L. **Desafios da bioprospecção no Brasil**, Brasília: IPEA, 38p, 2011.

SAID, S.; PIETRO R.C.L.R. **Enzimas como Agentes Biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004. 412 p.

SILVA, C. H. D. **Fungos associados a invertebrados marinhos: isolamento, seleção e avaliação da produção de enzimas celulolíticas**. 2010. 69p. Dissertação de Mestrado. Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2010.

SILVA, T. M, **Produção e determinação das propriedades funcionais das amilases de *Aspergillus niveus***. 2009. Tese de Doutorado. Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto. São Paulo, 2009

SOARES, I. A., FLORES, A. C., ZANETTIN, L., PIN, H. K., MENDONÇA, M. M., BARCELOS, R. P., TREVISOL, L. R.; CARVALHO, R.D.; SCHAUREM, D.; ROCHA, C.L.M.S.C; BARONI, S. Identificação do potencial amilolítico de linhagens mutantes do fungo filamentosso *Aspergillus nidulans*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 30, 700-705. 2010.

SOUZA, R. L. A.; OLIVEIRA, L. S. C.; SILVA, F. L. H.; AMORIM, B. C. Caracterização da poligalacturonase produzida por fermentação semi-sólida utilizando-se resíduo do maracujá como substrato. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental** v.14, n.9, p.987–992, 2010.

TREICHEL, H. et al. A Review on Microbial Lipases Production. **Food Bioprocess Technology**, v. 3, n. 2, p. 182–196, 2010.

Torres, L.M; Leonel, M; Mischan M. M. **Concentração de enzimas amilolíticas na hidrólise do amido de gengibre**, Ciência Rural, 2012

SACCARO JUNIOR, N. L. **Desafios da bioprospecção no Brasil**. Brasília: IPEA, 2011. 38p

SAPNA, B. S. Phytase Production by *Aspergillus oryzae* in Solid-State Fermentation and its Applicability in Dephytinization of Wheat Bran. **Applied Biochemical and Biotechnology**, p. 1-11, 2014.