

Bioprospecção e caracterização da atividade amilolítica de fungos filamentosos

Bioprospection and characterization of the amyolytic activity of filamentous fungi

DOI:10.34117/bjdv8n5-047

Recebimento dos originais: 21/03/2022

Aceitação para publicação: 29/04/2022

Vanesa Bazzo

Bacharela em Biotecnologia

Instituição: Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso
Campus Avançado Lucas do Rio Verde (IFMT-CALRV)

Endereço: Avenida Universitária, n.º 1600-W, Parque das Emas, Lucas do Rio Verde
MT

E-mail: vanesa.bazzo@gmail.com

Sthefani Nicole Frosi Pardo

Bacharela em Biotecnologia

Instituição: FS Fueling Sustainability

Endereço: Avenida das Indústrias, s/nº, Lucas do Rio Verde, MT

Endereço: Avenida Universitária, n.º 1600-W, Parque das Emas, Lucas do Rio Verde
MT

E-mail: sthefanifrosip@gmail.com

Eder Carlos Hoffmann

Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos

Instituição: Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso
Campus Avançado Lucas do Rio Verde (IFMT-CALRV)

Endereço: Avenida Universitária, n.º 1600-W, Parque das Emas, Lucas do Rio Verde
MT

E-mail: eder.hoffmann@ifmt.edu.br

Geiziquele de Lima

Especialização em Gestão Ambiental e Práticas Pedagógicas

Instituição: Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso -
Campus Avançado Lucas do Rio Verde (IFMT-CALRV)

Endereço: Avenida Universitária, n.º 1600-W, Parque das Emas, Lucas do Rio Verde-
MT

E-mail: geiziquele.lima@lrv.ifmt.edu.br

Reginaldo Vicente Ribeiro

Doutor em Ciência da Saúde

Instituição: Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso
Campus Avançado Lucas do Rio Verde (IFMT-CALRV)

Endereço: Avenida Universitária, n.º 1600-W, Parque das Emas, Lucas do Rio Verde
MT

E-mail: reginaldo.ribeiro@ifmt.edu.br

RESUMO

As amilases fazem parte do grupo de enzimas mais utilizadas nas indústrias de alimento, farmácia, bioetanol, têxtil e outros. Esses biocatalisadores são produzidos por vegetais, animais e microrganismos, especialmente por fungos. O objetivo deste trabalho foi bioprospectar linhagens fúngicas produtoras de amilase e caracterizar suas atividades enzimáticas. Para isso, 10 linhagens isoladas de amostras de solo foram disponibilizadas pela micoteca do IFMT *Campus* Avançado Lucas do Rio Verde foram selecionadas e reativadas. Dessas, 09 apresentaram viabilidade e foram submetidas ao teste atividade amilolítica (meio BDA a 2% de amido), onde foi determinado o Índice Enzimático (IE), obtido pela relação entre o diâmetro do halo de hidrólise e o diâmetro da colônia. As linhagens com maior IE (A25, A12, S01 e D12) foram selecionadas para a avaliação das condições ideais de temperatura e pH dos extratos enzimáticos. As linhagens selecionadas pertencem ao gênero *Aspergillus* e os melhores resultados obtidos foram observados em temperatura de 50° C e com pH 5,0. Nessas condições, os extratos enzimáticos amilolíticos apresentaram maior desempenho de hidrólise do amido, sendo capazes de degradar o substrato em 42,3% (D12), 44,7% (A12), 47,8% (A25) e 60,1% (S01), enquanto amostras de alfa-amilase comercial promoveram atividade relativas de até 86%. Considerando os resultados observados, pode-se concluir que entre as linhagens estudadas, quatro apresentaram considerável potencial para produção de amilases (S01, A25, A12 e D12), com destaque para a linhagem S01, que apresentou maior capacidade em produzir enzimas amilolíticas com potencial para exploração biotecnológica.

Palavras-chave: atividade amilolítica, extrato enzimático, *aspergillus*, fungos filamentosos, biotecnologia.

ABSTRACT

Amylases are part of the group of enzymes most used in the food, pharmacy, bioethanol, textile and other industries. These biocatalysts are found in plants, animals and microorganisms, especially fungi. The objective of this work was to bioprospect amylase-producing fungal strains and characterize their enzymatic activities. For this, 10 strains detained in soil were made available by the library of the IFMT *Campus* Avançado Lucas do Rio Verde were selected and reactivated. Of these, 09 dissipated and were subjected to the amyolytic activity test (BDA medium at 2% starch), where the Enzyme Index (IE) was determined, related by the relationship between the diameter of the hydrolysis halo and the diameter of the colony. The strains with the highest EI (A25, A12, S01 and D12) were selected to evaluate the ideal temperature and pH conditions of the enzymatic extracts. The strains selected for the *Aspergillus* genus and the best results were observed at a temperature of 50° C and pH 5.0. Under these conditions, amyolytic enzyme extracts provide greater starch hydrolysis performance, being able to degrade the substrate by 42.3% (D12), 44.7% (A12), 47.8% (A25) and 60.1% (S01), the commercial alpha-amylase controller promoted relative activity of up to 86%. Considering the observed results, it can be concluded that among the strains studied, four showed considerable potential for the production of amylases (S01, A25, A12 and D12), with emphasis on the S01 strain, which showed greater capacity to produce amyolytic enzymes with potential for biotechnological exploration.

Keywords: amyolytic activity, enzymatic extract, *aspergillus*, filamentous fungi, biotechnology.

1 INTRODUÇÃO

As enzimas são moléculas proteicas que atuam na catálise de reações químicas como a hidrólise e aceleração de processos biológicos, sendo imprescindíveis para a vida de qualquer organismo vivo. A função da enzima é reduzir a energia de ativação, acelerando a velocidade da reação química (LOPES, 2019). As enzimas possuem uma vantagem frente aos catalizadores químicos, pois são biodegradáveis e ecologicamente corretas (FERREIRA et al., 2009), muitas são oriundas de microrganismos que são a principal fonte geradora de catalizadores biológicos de interesse industrial (NIGAN, 2013; FERREIRA et al., 2009).

A grande abrangência se deve aos fatores positivos apresentados como a especificidade das moléculas, a possibilidade de cultivo em grande escala em tempo relativamente curto, ao uso de substratos de fácil acesso e baixo valor de mercado. O grande aumento na utilização das enzimas nos últimos anos, chamou a atenção de pesquisadores do mundo todo, que passaram a desenvolver pesquisas para descobrir novas moléculas, em especial as amilases que são amplamente utilizadas por diversos segmentos industriais (FERREIRA et al., 2009).

As pesquisas voltadas para a produção de amilases, tomaram impulso no início do século XX, quando a indústria passou a evidenciar o interesse em produzir glicose através da hidrólise de polímeros maiores (BASTOS-NETO et al., 2012; JOHN, 2017). As amilases podem ter origem de fontes diversas como plantas, animais e microrganismos diversos (OLIVEIRA et al., 2007). A busca por novas linhagens de microrganismos, em especial os fungos filamentosos é sustentada pela capacidade que estes possuem em adaptar-se a ambientes distintos (BELO, 2013). As amilases são usadas na indústria têxtil para determinar a distância entre as fibras têxteis e na indústria farmacêutica elas são usadas como um auxiliar na digestão (NIGAN, 2013). O amplo uso dessas moléculas tem transformado o mercado enzimático mundial.

Acredita-se que, em 2020 tenham sido movimentados no mercado global de enzimas, cerca de US\$ 5,4 bilhões, sendo as indústrias de detergentes as que mais consomem esta matéria-prima, na sequência, vem as indústrias de alimentos, bebidas, agroenergia, farmacêutica, rações, entre outras aplicações (EMBRAPA, 2018; FRANÇA E SILVA, 2021). Pesquisas indicam que até 2024 o mercado global de enzimas chegue a gerar US\$10,52 bilhões, o que implica em uma taxa de crescimento de 5,7% ao ano. Outras pesquisas apontam para um aumento no mercado enzimático de UR\$ de 7,10 até 2027, a partir de alimentos processados, clarificação de sucos, produção de cervejas,

fabricação de queijos, amaciamento de carne, bem como no processamento de papel e biocombustíveis (GRAND VIEW RESEARCH, 2020), sendo que este último está em ascensão especialmente no norte do Mato Grosso, abrangendo enzimas de diversas especificidades.

Sendo assim, as amilases, xilanases e invertases são consideradas algumas das principais enzimas comercializadas. Dentre as enzimas amilolíticas fúngicas, o maior interesse industrial está voltado para as α -amilase, β -amilase; amiloglicosidase e dextrinase limite, por serem responsáveis pela eliminação da turbidez, redução de viscosidade e transformação em dextrinas (SPIER, 2005).

A atividade enzimática é dependente do contato com o substrato com o qual ela deve hidrolisar, bem como, devem haver condições que favoreçam sua atividade, tais como pH e temperatura ideais. Em países que se encontram em desenvolvimento, os gêneros de *Aspergillus* e *Rhizopus* são os mais estudados em busca da produção de α -amilase, lipase, pectinase e proteases fúngicas, devido suas necessidades nutricionais menos exigentes. Para o cultivo de fungos filamentosos, resíduos vegetais são fontes alternativas baratas e de fácil acesso, e podem ser utilizados para fermentação e produção de enzimas de interesse comercial (SETHI et al., 2016).

Levando em conta as riquezas naturais da região do estado do Mato Grosso que é coberto por três biomas diferentes (Embrapa/IBGE, 2010), e a grande diversidade de resíduos da agroindústria, acredita-se que o solo local seja extremamente rico em biodiversidade, o que instiga o interesse em explorar e prospectar em busca de fungos filamentosos de interesse industrial.

Assim, este trabalho teve como objetivo principal prospectar fungos com capacidade de produzir enzimas amilolíticas, e caracterizar suas atividades enzimáticas, com potencial para serem aplicadas em bioprocessos.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

As atividades de pesquisa experimental foram realizadas nos laboratórios de Microbiologia, Biologia Molecular e Química de Produtos Naturais do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso, *Campus* Avançado Lucas do Rio Verde (IFMT-CALRV).

2.1 OBTENÇÃO DAS LINHAGENS DE FUNGOS FILAMENTOSOS

As linhagens de fungos filamentosos foram gentilmente cedidas pelos professores Dr. Reginaldo Vicente Ribeiro e Dr. William Pietro de Souza. Foram reativadas 10 (dez) linhagens que estavam preservadas na micoteca do laboratório de microbiologia do *Campus*, sendo que dessas, 04 (quatro) foram isoladas de amostras de solo do cerrado (A12, D12, A14, A25 e S01) e 06 (seis) foram isoladas da rizosfera de amostra de solo (R5A, R3A, T2E, T3E, T1D e T5L), pelos respectivos professores.

As linhagens (A12, D12, A14, A25 e S) foram inoculadas para reativação em tubos de ensaio em meio BDA inclinado e incubados na BOD a 28°C por 5 dias. As linhagens (R5A, R3A, T2E, T3E, T1D e T5L) foram inoculadas em triplicatas em placas de Petri contendo meio BDA e incubadas na BOD à 28° para reativação.

2.2 AUTENTICAÇÃO MORFOLÓGICA DAS LINHAGENS FÚNGICAS

A confirmação das características macro e micro morfológicas das linhagens foram realizadas em placas contendo meio BDA (Ágar Batata + dextrose). Os cultivos foram mantidos a 28 °C, durante cinco dias. Na macro morfologia foram analisadas as características como, cor da colônia, textura do micélio, cor do reverso, presença ou ausência de pigmentação, relevo, bordas, conforme Klich & Pitt (1988).

Na micromorfologia foram analisadas a microestrutura das hifas para visualização de fungos filamentosos e formas de reprodução. Após o preparo das lâminas utilizando corante azul de algodão foram observadas características como estrutura das hifas, forma e textura dos conídios e conidióforos (KLICK; PITT, 1988; FAIA, 2011).

2.3 BIOPROSPECÇÃO PARA IDENTIFICAR FUNGOS COM ATIVIDADE AMIOLÍTICA

Para selecionar os fungos com maior atividade amilolítica, foram realizados recortes circulares de 5 mm nas bordas das colônias e inoculadas com o auxílio de uma alça tipo agulha em placas de Petri contendo o meio composto por Ágar Nutriente e amido solúvel 2%. As linhagens foram incubadas em triplicata na BOD à 28°C, durante 5 dias. Após esse período, as placas foram tratadas com vapor de iodo (solução de iodo/iodeto 1% iodo em etanol absoluto, 10% iodeto de potássio e água destilada na proporção de 1v:1v:3v). Os halos de hidrólise do amido e das colônias foram mensurados com paquímetro digital e a atividade enzimática foi expressa como índice enzimático (IE), que é dado pela relação entre o diâmetro médio dos halos de hidrólise e o diâmetro médio das

colônias (HANKIN; ANAGNOSTAKIS, 1975). As linhagens que apresentaram maiores valores de IE foram submetidas aos testes para produção de amilase em fermentação submersa.

2.4 PRODUÇÃO DE AMILASE EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA

A fermentação submersa foi realizada com meio Kahanna modificado. Para isso, primeiramente foram preparados os Sais de Khanna (20X) contendo 2 g de NH_4NO_3 /1,3 g de KH_2PO_4 /0,362g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ /0,098g de KCl /0,007g de $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ /0,0138g de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ /0,0066g de $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ /0,0062g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ e 100 mL de Água destilada (CAVALCANTI, 2017). Os sais foram pesados e diluídos. Para preparo do meio foram adicionados 37 mL de solução de sais Khanna (20X), 0,75g de Extrato de levedura, 75g de Amido solúvel e 750 mL de água destilada (CAVALCANTI, 2017). O meio foi autoclavado em elenmeyers contendo 25 mL cada um. As linhagens selecionadas na triagem enzimática foram inoculadas nos frascos de erlenmeyers contendo o meio Kahanna e incubadas em Shaker, sob agitação de 300 RPM em temperatura de 30°C (± 1), por 72 horas.

Após esse período, a obtenção do Extrato Enzimático bruto foi obtida através da filtração utilizando bomba de vácuo Primatec Modelo 131, com papel filtro da Química Moderna de 0,19mm 80g/m².

2.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE AMIOLÍTICA DOS EXTRATOS ENZIMÁTICOS

A atividade enzimática dos extratos brutos foi avaliada frente à variação de pH e temperatura. Cada extrato foi adicionado em tubo de ensaio de 10 mL, onde adicionou-se 30 μL de extrato enzimático, 50 μL de solução de amido a 2% e 50 μL de solução tampão Fosfato de Potássio, repetidos para os valores de pH 5, 6 e 7. Os preparados foram incubados por 10 minutos em banho-maria nas temperaturas 30° , 40° e 50°C . Para inativar a enzima, foram acrescentados 100 μL de ácido acético ($1,0 \text{ mol. L}^{-1}$) e para leitura de absorbância foram utilizados 50 μL de reagente FUWA (solução de iodo/iodeto 1% em etanol absoluto, 10% iodeto de potássio e água destilada na proporção de 1v:1v:3v), adicionado 4,5 mL de água destilada (BRITO, 2017). A leitura foi realizada a 650 nm.

2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram tratados estatisticamente através da Análise de Variância (ANOVA) e da aplicação do teste de Tukey entre as médias da atividade enzimática em condições de pH e temperatura com uma probabilidade de 5% com o auxílio do programa computacional Graphpad Prisma 8.

3 RESULTADOS

As linhagens fúngicas prospectadas no presente estudo, apresentaram bom desenvolvimento ao serem reativadas, exceto a linhagem denominada T3E, que não demonstrou viabilidade e por isso, foi eliminada do estudo. Em seguida, os exemplares foram reativados e submetidos a análises macroscópicas e microscópicas para autenticação morfológica das linhagens fúngicas, como pode ser observado na Tabela 01.

Tabela 1: Descrição macroscópica das estruturas vegetativas dos fungos reativados e identificação de gêneros.

Linhagem	Gênero	Frente	Textura	Cor	Relevo	Bordas	Verso
A12	Aspergillus	Filamentoso	Algodonosa	Branco	Crateriforme	Irregulares	Fendas/ Pigmentos
A25	Aspergillus	Filamentoso	Algodonosa	Marfim	Rugosa	Regulares	Fendas
S01	Aspergillus	Filamentoso	Camurça	Cinza/ Verde	Plano	Irregular	Pigmentos
D12	Aspergillus	Filamentoso	Algodonosa	Branco / Cinza	Apiculado	Irregulares	Pigmentos
T2E	Fusarium	Filamentoso	Algodonosa	Branco / Rosa	Crateriforme	Liso	Pigmentos
A14	Inconclusivo	Filamentoso	Algodonosa	Marrom	Crateriforme	Irregulares	Sem pigmentos
R3A	Inconclusivo	Filamentoso	Algodonosa	Branca	Crateriforme	Irregulares	Sem pigmento
T5L	Inconclusivo	Filamentoso	Aveludada	Branca/ Cinza	Apiculado	Regulares	Pigmentos
R5A	Inconclusivo	Filamentoso	Algodonosa	Branca	Crateriforme	Irregulares	Pigmentos

T1D Inconclusiv
o Filamentoso Aveludada Branca/
Rosa Crateriforme Irregulares Pigmentos

*As linhagens que apresentaram viabilidade na reativação foram submetidas à bioprospecção para identificar fungos com maior potencial para hidrólise de amido em meio sólido. Neste teste os melhores resultados de Índice Enzimático (IE) foram obtidos pelas linhagens A25, S01, D12 e A12, sendo por isso, selecionadas para os testes de avaliação da atividade amilolítica de seus extratos enzimáticos. (Tabela 02).

$$IE = \frac{\text{DIÂMETRO MÉDIO DO HALO DE DEGRADAÇÃO}}{\text{DIÂMETRO MÉDIO DO CRESCIMENTO MICROBIANO}}$$

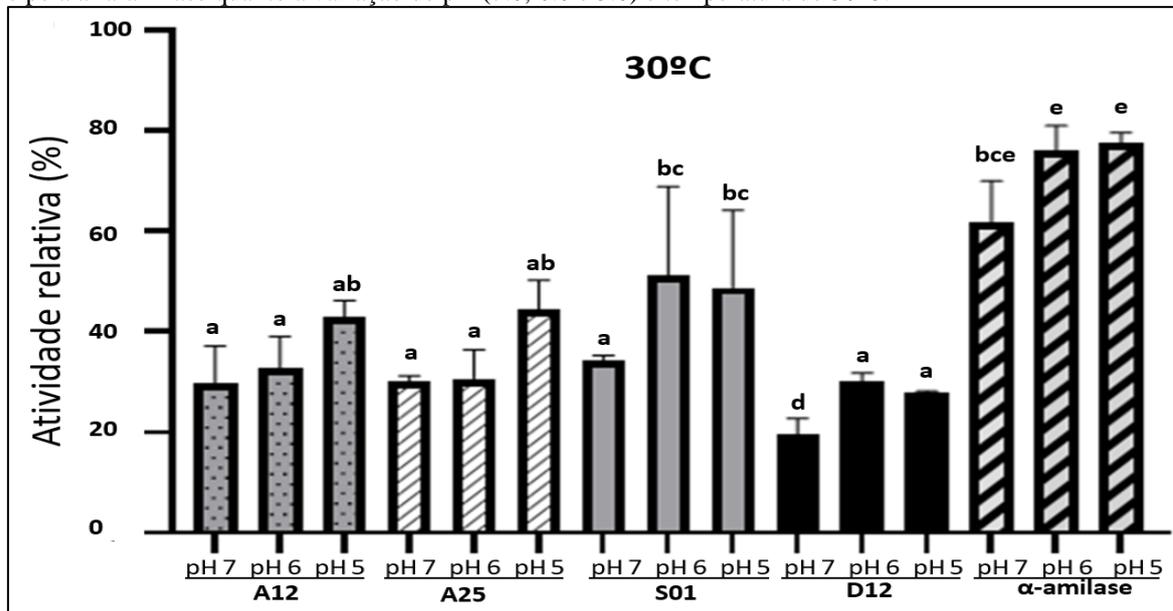
Tabela 2: Diâmetros médios e valores obtidos para os Índices Enzimáticos (IE) da amilase para os fungos isolados.

Linhagem	Halo de crescimento da colônia (mm)	Halo de hidrólise do amido (mm)	IE
A12	20,6	22,5	1,1
A25	25,1	32,1	1,3
S01	55	68	1,2
D12	17,6	21	1,2
T5L	38,5	37,5	1,0
T2E	39,8	30,5	0,8
R5A	42,7	26	0,6
R3A	40,1	25,5	0,6
T1D	14	11	0,8

Na Figura 01 mostra-se os resultados obtidos na avaliação da atividade amilolítica dos extratos enzimáticos. Em temperatura constante de 30 °C o melhor desempenho foi alcançado pelo extrato da linhagem S01 em pH 6,0, atingindo uma média de degradação do amido de 51,3%. O resultado obtido pela linhagem S01 é próximo do resultado da α -amilase comercial, enzima usada como controle, que degradou em média 75,9% do amido presente, nas mesmas condições. Outros extratos que apresentaram bons resultados foram

produzidos pelas linhagens A25 que degradou em média 44,4% do amido em pH 5.0 e A12 que atingiu 42,9% de degradação também em pH 5.0.

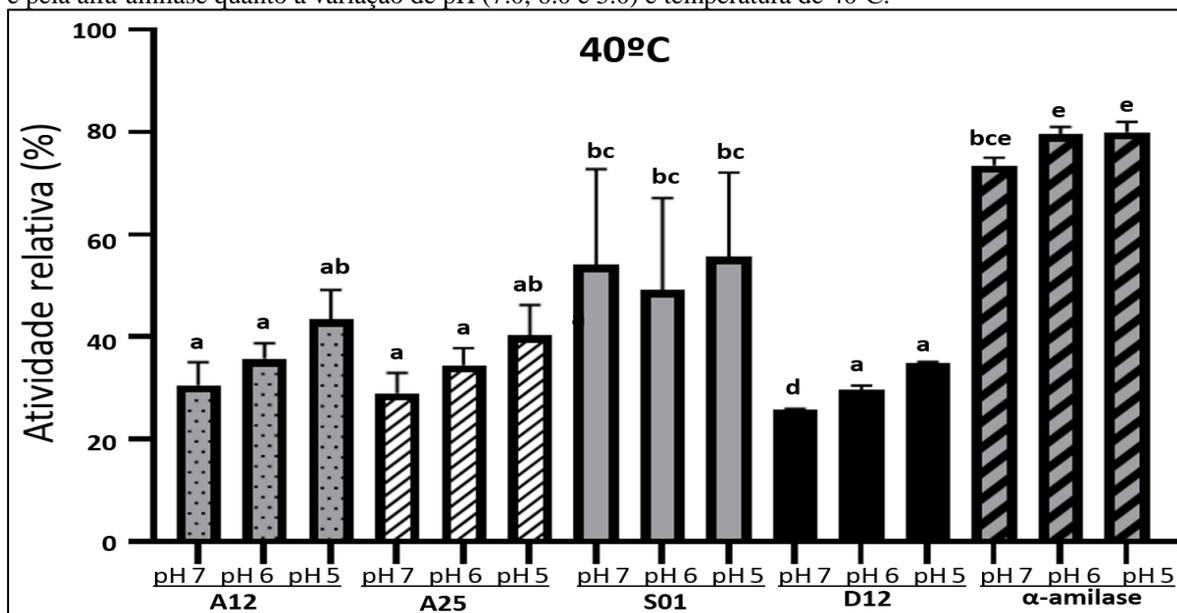
Figura 01. Atividade relativa (%) de degradação de amido por extratos enzimáticos de linhagens fúngicas e pela alfa-amilase quanto a variação de pH (7.0, 6.0 e 5.0) e temperatura de 30°C.



Legenda: Barras representam médias e desvio padrão com um intervalo de confiança de 95%. Letras diferentes acima das barras indicam as diferenças significativas entre as médias pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

No segundo teste de avaliação da atividade amilolítica, observa-se que todos os extratos enzimáticos produzidos pelas linhagens fúngicas, bem como o controle positivo demonstraram que em temperatura de 40°C o melhor desempenho na hidrólise de amido foi com o pH 5.0 (Figura 05). Nessas condições, o extrato enzimático da linhagem S01 atingiu uma média de atividade relativa de 55,6%, enquanto a alfa-amilase chegou a degradar 80% do amido presente no meio. Também é possível evidenciar que a linhagem A12 melhorou sua performance, atingiu 43,6%, mostrando melhor resultado com 40°C e pH 5.0.

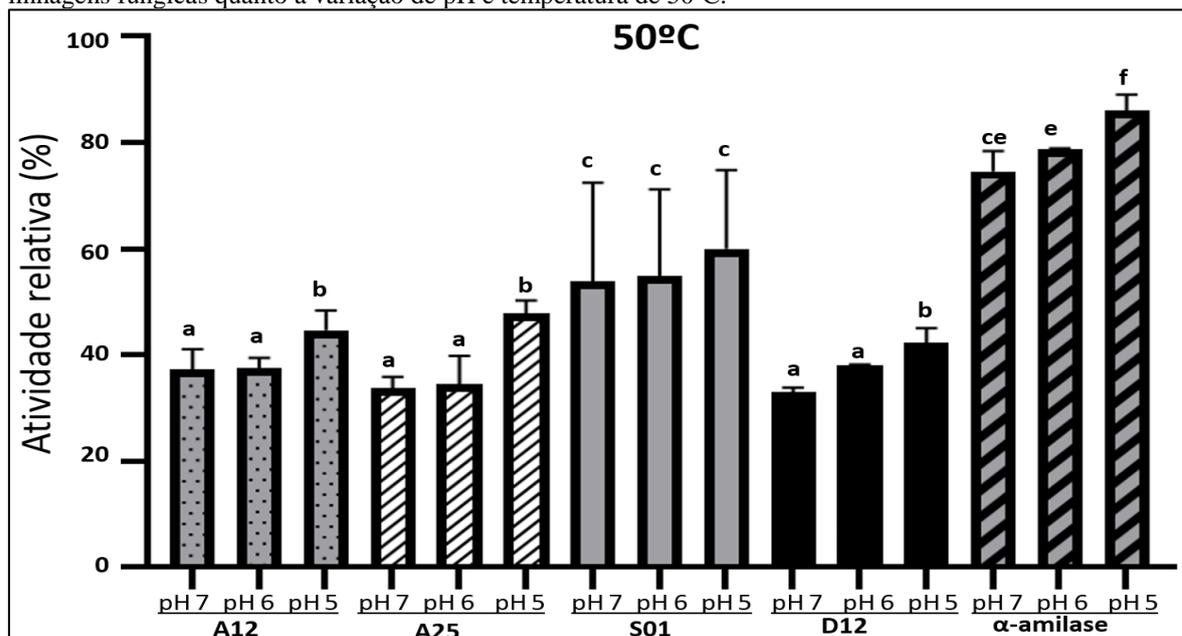
Figura 02. Atividade relativa (%) de degradação de amido por extratos enzimáticos de linhagens fúngicas e pela alfa-amilase quanto a variação de pH (7.0, 6.0 e 5.0) e temperatura de 40°C.



Legenda: Barras representam médias e desvio padrão com um intervalo de confiança de 95%. Letras diferentes acima das barras indicam as diferenças significativas entre as médias pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Na figura 3, pode-se observar que em temperatura de 50°C e pH 5.0. propiciaram as melhores condições de atividade amilolítica para os extratos enzimáticos testados. Em tais condições, as amilases obtidas da linhagem S01 chegou a degradar em média 60,1% do amido, enquanto os extratos brutos da linhagem A12 alcançou uma média de 44,7%, A25 47,8% e D12 hidrolisou cerca de 42,3% do amido presente nas amostras. A enzima comercial alfa-amilase também demonstrou aumento de sua atividade catalítica em temperatura de 50°C e pH 5.0, alcançando atividade relativa de degradação do amido de 86%.

Figura 03. Atividade relativa (%) das amilases extracelulares de extratos enzimáticos produzidos pelas linhagens fúngicas quanto a variação de pH e temperatura de 50°C.



Legenda: arras representam médias e desvio padrão com um intervalo de confiança de 95%. Letras diferentes acima das barras indicam as diferenças significativas entre as médias pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

4 DISCUSSÃO

Os isolados utilizados neste trabalho estavam conservados em meio LB em geladeira à 4° C (+-2). As linhagens foram reativadas utilizando meio BDA, onde tiveram excelente desenvolvimento, exceto a linhagem denominada T3E que não apresentou células viáveis para seu desenvolvimento. Isolados conservados por longos períodos necessitam de repiques periódicos, para manter a viabilidade celular, a técnica é simples e os custos são baixos, porém há alguns riscos ao serem executadas por muito tempo como a variabilidade genética, perda de características, entre outros. Por isso, é imprescindível verificar periodicamente as características dos isolados e se possível, adotar métodos mais eficazes (DELLARETTI, 2014).

Dentre as linhagens selecionadas, foram identificadas quatro delas sendo de *Aspergillus*: A25, S01, A12 e D12. Esta linhagem se destacou nas etapas de avaliação de pH e temperatura, apresentando variações em cada uma delas, porém a atividade foi mais intensa em temperatura de 50° C e pH 5.0. Pelo menos duas espécies de *Aspergillus* (*A. niger* e *A. awamori*) são utilizadas para produção de enzimas amilolíticas de uso comercial (CRABB; MITCHISON, 1997).

A escolha pelos fungos filamentosos para serem testados quanto à produção de amilases correspondeu ao fato destes estarem diretamente ligados com a decomposição

de matéria orgânica, pois geralmente, secretam uma diversidade de enzimas extracelulares, como resultado de incentivos ambientais, que ocasionam a expressão de genes relacionados. Essa peculiaridade permite aos fungos habitar um imenso espaço de tecidos vivos, seja em plantas, animais, insetos, madeira, papel ou solos, desde que haja material em decomposição (COLEN, 2006).

Após o primeiro cultivo para reativação, os fungos foram repicados em placas contendo meio BDA modificado com amido 2% para verificação da atividade enzimática, e revelado com solução de Iodo. As amilases podem ser reveladas nas placas de cultivo com ágar-amido utilizando uma solução de iodo 1 N, tintura de iodo ou vapor de cristais de iodo. Quando o iodo entra em contato com as cadeias lineares de amilose presente no amido, forma um complexo de cor azul escuro, enquanto a área degradada pelas amilases apresenta halos translúcidos (SOUZA et al, 2008).

Conforme se observa nos resultados de bioprospecção por análise de IE, pode-se notar que todas as linhagens fúngicas testadas foram capazes de produzir algum halo de degradação do amido, com destaque para as linhagens A25, S01, D12 e A12, indicando que são microrganismos produtores de amilases extracelulares. No entanto, nenhuma das linhagens testadas apresentaram $IE \geq 2,0$, valor que é considerado por Lealem & Gashe (1994) como um bom indicador para considerar um microrganismo como produtor potencial de enzimas amilolíticas em meio sólido.

Por se tratar de fungos filamentosos isolados do solo, as condições de cultivo em placas de petri com meio Agar Nutriente e amido podem não ter sido as ideais, considerando que fungos isolados do solo em camadas mais superficiais, podem sofrer influências, devido variações climáticas (PINOTTI et al., 2011), porém a identificação das condições ótimas para cada microrganismo possibilita melhorar o desempenho da produção enzimática e conseqüentemente, aumentar a área de degradação. Baseando-se nessa premissa, Pereira (2015), conseguiu otimizar o processo de produção de amilase por *Aspergillus* a partir da identificação das condições ótimas, aumentando 4,62 vezes a produção.

Assim, o presente trabalho também buscou identificar as melhores condições de crescimento do fungo, bem como de pH e temperatura para a atividade catalítica das amilases produzidas pelas linhagens que apresentaram melhores resultados de IE.

Para isso, a fermentação submersa foi utilizada, pois apresenta várias vantagens para o desenvolvimento de microrganismos, tais como a agilidade de crescimento por ser realizada em meio rico em nutrientes líquidos e solúveis, com disponibilidade de água

livre e sob condições controladas de pH e temperatura, (ANBU, 2008; SILVA et al., 2017).

Quando as enzimas se encontram em um meio onde o pH é o ideal, a catálise é impulsionada. Se o pH é aumentado ou reduzido fugindo do padrão ideal para ela, a atividade enzimática é afetada. As variações podem ocasionar desnaturação ou rupturas nas estruturas das enzimas, inativando-as (BAILEY; OLLIS, 1977).

Para determinação da temperatura ótima, foram testadas as temperaturas de 30°, 40° e 50° C. A determinação do pH ótimo foi realizada utilizando tampões com pH de 5,0 / 0,6 e 7,0. A concentração de amido testada foi de 2% e a maior atividade foi registrada em pH 5.0 sendo este considerado o pH ótimo para o extrato enzimático de maior eficiência produzido pelo fungo S. As enzimas de S01 se mostraram bastante estáveis nas temperaturas de 30 e 40°C, e a temperatura ótima registrada para a catálise enzimática foi de 50°C.

Figueira et al. (2000) já havia identificado o pH ótimo de 5.5 para amilases de *Asperillus flavus*, resultado este, bastante próximo do encontrado no atual trabalho, Guimarães et al., (2006) também relataram boa atividade das amilases em pH 5.0 por culturas de *Aspergillus phoenicis*, enquanto Esam et al., (2017) também observaram melhor resultado em pH 5.5 em trabalho desenvolvido com *Aspergillus*.

De acordo com Gonçalves (2006), as α -amilases são divididas da seguinte forma: as α -amilases sacarificantes, que hidrolisam 50 a 60% do substrato e as liqueficientes, que realizam a quebra de cerca de 30 a 40% do amido. As α -amilases são mais fáceis de serem encontradas em extratos fúngicos, porém nos extratos do gênero *Aspergillus* é comum encontrar glucoamilases atuando. Sendo que, as glucoamilases produzidas por *Aspergillus* atuam em uma faixa de pH em torno de 4,5 e temperatura entre 50 e 55 °C, enquanto outras linhagens produzem α -amilases atuantes em uma faixa de pH entre 4,5 e 6,0 (GONÇALVES, 2006), muito próximo dos resultados encontrados neste trabalho, assim como a diferença entre os resultados entre S01 e α -amilase foi relativamente baixa, visto que, a enzima é purificada e o extrato utilizado era bruto, de acordo com Barbosa (2011) a purificação da enzima aumenta consideravelmente seu rendimento. Recentemente, foi identificado uma linhagem de *Aspergillus carbonarius* coletado em iscas de batata na Mata Atlântica, o qual apresentou a maior produtividade de enzimas amilolíticas em temperatura de 30 °C e pH 6.0, conforme descrito por Pasin et al., (2019).

As enzimas produzidas pelo fungo A25 apresentaram degradação do amido em 30°C e pH 5.0 A literatura relata diversos trabalhos de pesquisa de amilases com as mais

variadas espécies, porém o fungo *Aspergillus* da espécie *A. flavus* aparece como um forte potencial produtor de amilases (BRITO, 2017).

5 CONCLUSÃO

Entre as linhagens fúngicas estudadas, quatro apresentaram considerável potencial para produção de amilases (A25, S01 e A12 e D12), com destaque para a linhagem S01 (*Aspergillus* sp.). que é capaz de sintetizar enzimas com elevada atividade amilolítica em pH 5.0 e temperatura de 50 °C. No entanto, estudos adicionais ainda devem ser realizados, buscando identificar por biologia molecular as linhagens avaliadas, bem como otimizar a produção desses biocatalisadores em escala de bancada, piloto e industrial.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Mato Grosso de Mato Grosso - Campus Avançado Lucas do Rio Verde pelo apoio financeiro aportado na forma de taxa de bancada (Edital Interno n.º 03/2020 IFMT/CALRV).

REFERÊNCIAS

- ANBU P, ANNADURAY G, LEE J-F, HUR B-K. **Optimization of alkaline protease production from *Shewanella oneidensis***. J. Chem. Technol. Biotechnol 84:54-62, 2009.
- BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F. **Biochemical engineering fundamentals**. New York: McGraw-Hill. 753 p., 1977.
- BASTOS, N. B. S.; RECAREY, H.; ESPÍRITO, S. A.: Isolamento e caracterização de microrganismos amilolíticos presentes na rizosfera de tuberosas amiláceas. **Diálogos & Ciência**, 153-158, 2012.
- BELO, S. C. B.: **Produção De Amilase e Lipase Por Fungos Filamentosos Isolados de Diferentes Tipos de Solo de Floresta e Savana de Roraima**. Boa Vista, 103 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Naturais). Universidade Federal de Roraima, BOA VISTA-RR, 2013.
- BRITO, RICARDO GOMES. **Produção de amilase por *Aspergillus flavus* isolado a partir da mandioca (*Manihot esculenta*)**. Universidade Federal Do Amazonas, Pró-Reitoria De Pesquisa E Pós-Graduação Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia. Amazonas, 2017.
- BUENO, C. J.; FICHER, I. H. F.; ROSA, D. D. : Produção De Enzimas Extracelulares Por *Fusarium Solani* De Maracujazeiro Amarelo. **Trop. Plant Pathol.** Vol.34 No.5 Brasília Sept./Oct. 2009
- CAVALCANTI, RAYZA MORGANNA FARIAS.: **Bioprospecção de tanases produzidas por fungos endofíticos isolados de espécies vegetais da Caatinga**. Dissertação, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” Departamento de Química. SP, 2017.
- CRABB, W. D.; MITCHINSON, C. Enzyme involved in the processing of starch to sugars. **Trends in Biotechnology**, v. 2, p. 252-256, 1997.
- COLEN, G. **Isolamento e seleção de fungos filamentosos produtores de lipases**. Belo Horizonte. Faculdade de Farmácia da UFMG, 2006. 206p. (Tese, Doutorado em Ciências de alimentos), 2006.
- DELLARETTI, ÉRICA MACIEL. **Preservação de fungos em baixas temperaturas**. Universidade Federal de São João Del-Rei, Minas Gerais, 2014.
- FAIA, ANA MARGARIDA. **Isolamento E Identificação de Fungos Filamentosos e Leveduras em Alguns Pontos de uma Rede de Distribuição de Água**. Universidade De Lisboa. Mestrado Em Biologia Celular E Biotecnologia. Lisboa-Portugal, 2011.
- FERNANDES, ANA PAULA. **Avaliação de Potencial enzimático de fungos filamentosos isoados de diferentes fontes**. Dissertação do Programa de Mestrado em Ciências de Alimentos. Minas Gerais, 2009.

FERREIRA, P. A. et al.: Aplicações Industriais da Biotecnologia Enzimática: Após os antibióticos, enzimas são os produtos microbianos mais explorados na indústria biotecnológica. Rev. **Processos Químicos**, ano 3 n° 5, Jan-Jun, 2009.

FIGUEIRA, E. L. Z.; SÁ, M. C.; IDA, E. I. & HIROOKA, E. Y. Produção e caracterização de amilase de *Fusarium moniliforme* e *Aspergillus flavus*. Revista **CEPPA**, 43: 461-467, 2000.

FRANÇA, Í. B.; SILVA, C. A. A. S. Utilização de resíduos agroindustriais na produção de amilase por *Aspergillus niger* UCP 1095 através de fermentação submersa. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v.7, n.5, p. 51331-51345, 2021.

FUWA, H. **A new method for microdetermination of amylase activity by the use of amylose as the substrate**. The journal of Biochemistry. v. 41, p. 583-603, 1954.

Geografia. Embrapa e IBGE. Disponível em <<http://www.mt.gov.br/geografia>> Acesso em 11 de Março de 2021.

GUIMARÃES, et al.: Screeninh of Filamentous Fungi for Production of Enzymes of Biotechnological Interest. **Braz. J. Microbiol.** vol.37 no.4 São Paulo out./Dez. 2006.

GONÇALVES, ALINE ZORZETTO LOPES. **Produção de α -amilase e glucoamilase termoestável pelo fungo termofílico *Thermomyces lanuginosus* TO-03 por fermentação submersa e em estado sólido e caracterização das enzimas**. Dissertação de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. São Paulo, 2006.

HANKIN, L. & ANAGNOSTAKIS, S.L. **The use of solid media for detection of enzyme production by fungi**. Mycologia 67:597-607. 1975.

JHON, JINU. Amylases-Bioprocess and Potential Applications: A Review. **International Journal of Bioinformatics and Biological Science**. January 2017.

KLICH, MA, PITT JI. A Laboratory guide to common. *Aspergillus* species and their teleomorphs. Australia: **Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization**, 115pp, 1988.

LEALEM, F.; GASHE, B.A. **Amylase production by a gram-positive bacterium isolated from fermenting tef. (*Eraglostis tef.*)**. Journal of Applied Bacteriology, v. 77, p. 348-352, 1994.

LOPES, DALLECYO CERQUEIRA. **Otimização Das Condições De Cultivo E Caracterização Parcial Da Lipase Produzida Por *Yarrowia Divulgata***. Dissertação - Programa De Pós-Graduação Em Agroenergia – Tocantins, 2019.

NIGAM, POONAM SINGH.: Microbial Enzymes with Special Characteristics for Biotechnological Applications. Rev. **Biomolecules** 2013, 3, 597-611. Biomedical Science Research Institute, University of Ulster. Irlanda, 2013.

Novo microrganismo produz enzima de interesse industrial com mais sustentabilidade. Mercado em crescimento. Embrapa, 2018. Disponível em: <https://www.canalbioenergia.com.br/microrganismo-produz-enzima-de-interesse-industrial/> Acesso em 18 de Abril de 2020.

OLIVEIRA, A. N. et al.: **Produção de amilase por rizóbios, usando farinha de pupunha como substrato.** SP, 2007.

PASIN, T. M. et al.: **Novo fungo produtor de amilase que hidrolisa trigo e resíduos de cerveja, *Aspergillus carbonarius*, descoberto em remanescentes de floresta tropical.** *Folia Microbiologica* vol. 65, Páginas 173 - 184 (2020).

Tamanho do mercado de enzimas, relatório de análise de participação e tendências por aplicação (enzimas industriais, enzimas especiais), por produto (carbohidrase, proteases, lipases), por fonte, por região e previsões de segmento, 2020-2027. Disponível em: <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/enzymes-industry> Acesso em 03 de Fevereiro de 2021.

SETHI, B. K. S. et al.: **Produção de α -amilase por *Aspergillus terreus* NCFT 4269.10 usando milho e sua caracterização estrutural.** Instituto de Pesquisa de Biotecnologia e Ciência Médica Convergente, Dongguk University, Goyang, Coreia do Sul, 2016.

SILVA, L. A. DE F. et al.: **Produção de amilase por fungo filamentosso endofítico em fermentação submersa.** *Cad. Ciênc. Agrá.*, v. 9, n. 3, supl. 1, p. 49–53, 2017. Bahia, 2017.

SOUZA, Queiroz de. et al.: **Seleção de Basidiomycetes da Amazônia para produção de enzimas de interesse biotecnológico.** *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, 28(Supl.): 116-124, dez. 2008.

SPIER, Michele Rigon.: **Produção de Enzimas amilolíticas fúngicas α -amilase e amiloglucosidase por fermentação em estado sólido.** Curitiba, 2005.