

25 e 26 de setembro de 2007



em Passo Fundo, RS

PRODUÇÃO DE AMILOGLICOSIDASE VIA FERMENTAÇÃO SUBMERSA

Carine da Silva, Ariane Batista, Débora K. Machado, Márcio Roberto Lorini, Rafael Lemes da Silva, Rodrigo Garcia Calegari, Rubens Faedo, Raquel Aparecida Loss, Luciane Maria Colla*

Laboratório de Fermentações, Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade de Passo Fundo
**Email: lmcolla@upf.br*

RESUMO

A produção mundial de enzimas é de 1.500 toneladas por ano, sendo que as mais produzidas são as enzimas de origem microbiana, tais como a amiloglicosidase, α -amilase e glucosidase. A amiloglicosidase é uma enzima que atua na hidrólise de ligações tipo α -1,4, α -1,6 e α -1,3 do amido liberando açúcares redutores livres, sendo uma enzima de indução, ou seja, requer a presença de maltose ou amido no meio para que seja produzida, sendo os fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Rhizopus* os maiores produtores. Objetivou-se avaliar a utilização de farelo de trigo, amido de milho e amido de mandioca como indutores para a produção de amiloglicosidase por *Aspergillus niger* via fermentação submersa. O meio de cultivo foi composto de (g/L): 40 g de farelo de trigo, 10 mL solução salina e 10 g de nitrato de sódio. As fermentações foram conduzidas em agitador orbital a 30 °C durante sete dias. A cada 24 horas, coletaram-se amostras para determinação dos açúcares redutores pelo método 3,5 DNS. Os açúcares redutores foram liberados em um sistema de reação contendo o extrato enzimático, tampão e solução contendo solução de amido a 4% como substrato. O amido de mandioca foi o indutor que possibilitou as maiores produtividades de amiloglicosidase, de 0,730 U. As fermentações realizadas com meios contendo amido de milho e farelo de trigo apresentaram, respectivamente, 0,533 U e 0,201 U. Dos substratos amiláceos testados, a mandioca foi o que continha maior concentração de amido em sua composição (96%), fato este que contribuiu para a maior produção de enzima.

Palavras-chave: *Aspergillus niger*, amido, enzimas microbianas.

1 INTRODUÇÃO

Após os antibióticos, as enzimas são os produtos mais explorados na indústria biotecnológica. Reações catalisadas por enzimas utilizando-se células intactas de microrganismos vêm sendo utilizadas ao longo da história, principalmente na fabricação de

cervejas, vinhos e panificações. As enzimas isoladas têm sido utilizadas há mais de 50 anos no preparo de rações animais e outras aplicações industriais (SPIER, 2005).

A enzima amilglicosidase, utilizada pela indústria de alimentos para a fabricação de xaropes de glicose e frutose, produção de álcool, como melhorador em panificação e na indústria fabricante de cerveja, é uma das mais produzidas pelos microrganismos do gênero *Aspergillus*, os quais têm sido utilizados no setor industrial pelo fato de serem considerados um microrganismo seguro pela indústria alimentícia (LEMOS, 2003).

Durante o processamento de alimentos, muitos resíduos podem ser gerados. O tipo e quantidade de resíduos gerados dependem do tipo de matéria-prima e processos utilizados. Parte desses resíduos é descartada e parte tem sido aproveitada na fabricação de ração animal, adubo orgânico, substrato em processos fermentativos, e até mesmo noutros alimentos. Algumas propostas vêm sendo apresentadas pelos setores ambiental e agroindustrial visando minimizar o problema da alta produção de resíduos pelas indústrias processadoras de alimentos. Entre os resíduos passíveis de utilização, os farelos de milho, trigo, soja e arroz encontram-se entre os mais utilizados nos processos biotecnológicos de produção de enzimas. A produção de enzimas apresenta custos elevados, e a utilização destes resíduos como meio de cultivos tem sido apontada como uma das alternativas para a minimização dos custos (VICENZI, 2007).

A parte central de um processo fermentativo é o crescimento do microrganismo industrial em condições ambientais que estimulem a síntese do produto comercial que se pretende obter. Segundo Trevan et al. (1990), é necessário conhecer os microrganismos, controlar seu metabolismo e crescimento, bem como manejá-los em grande escala. O processo se realiza em um fermentador onde se mantém o microrganismo à temperatura, pH, concentração de oxigênio dissolvido e concentração de substratos desejados (LEMOS et al., 2003).

A fermentação submersa é um dos métodos de produção de substâncias e compostos de interesse mais utilizados na biotecnologia. Este método de fermentação é o mais desenvolvido e é utilizado por oferecer várias vantagens, como melhor controle do processo, pH, temperatura, aeração e crescimento microbiano, entre outras.

O uso do fungo *Aspergillus* apresenta algumas vantagens como facilidade de manipulação, sua habilidade de fermentar uma grande variedade de matérias-primas de baixo custo e produzir rendimentos elevados de bioprodutos. O *A. niger* pode produzir 19 tipos de enzimas tais como celulasas, xilanases, poligalacturonases, α -galactosidases, α -amilases, amilglicosidases, β -glicosidases e proteases ácidas. A enzima que será produzida depende do tipo de substrato da fermentação (SPIER, 2005).

Objetivou-se avaliar a utilização de farelo de trigo, amido de milho e amido de mandioca como indutores para a produção da enzima amilglicosidase por *Aspergillus niger* via fermentação submersa.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Material e métodos

2.1.1 Preparo do inóculo

O preparo do inóculo foi realizado através da inoculação do fungo *Aspergillus niger* em placas de Petri contendo 30 mL de meio ágar-batata-dextrose (PDA) solidificado e incubação a 30 °C por cinco dias. Após o crescimento preparou-se uma suspensão de esporos através da adição de 20 mL de uma solução de Tween 80 0,2%.

2.1.2 Preparo do meio de cultivo

Utilizaram-se três diferentes fontes de amido como indutores para avaliar a produção de amilglicosidasas via fermentação submersa: farelo de trigo, amido de milho e amido de mandioca. Para a produção do meio de cultivo, utilizaram-se 40 g de farelo de trigo, 400 mL de água destilada, realizou-se a cocção desta mistura. Após, filtraram-se, adicionaram-se 10 mL solução de micronutrientes, 1% de nitrato de sódio e completou-se o volume até 1 L com água destilada. A mistura foi autoclavada e o pH do meio foi ajustado para 5,0. Repetiu-se o mesmo procedimento para o preparo dos meios contendo amido de milho e amido de mandioca. Os experimentos foram realizados em duplicata em Erlenmeyers de 125 mL, com 100 mL de meio inicial, sendo incubados durante sete dias a 30 °C, em agitador orbital com agitação. Inocularam-se 5 mL de suspensão de esporos em cada erlenmeyer. As amostras foram coletadas no tempo zero de fermentação e a cada 24 horas até completar sete dias de fermentação, para a determinação da atividade enzimática.

2.1.3 Determinações analíticas

A determinação da atividade enzimática da amiloglicosidase foi realizada em banho termostatizado a 60 °C por 60 min, com agitação de 230 rpm em um sistema reação contendo 5 mL de solução de amido 4%, 1 mL de extrato enzimático (amostra filtrada retirada do meio fermentado) e 2 mL de tampão citrato pH 4,6. A reação foi inativada com 1 mL de NaOH 1mol/L, e os açúcares redutores liberados no meio reacional foram quantificados pelo método espectrofotométrico 3,5 DNS, utilizando-se uma relação preestabelecida entre a concentração de AR e a absorbância. Uma unidade de amiloglicosidase (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1mg_{AR}/mL_{extrato}.min).

2.2 Resultados e discussão

A Tabela 1 apresenta a atividade enzimática obtida em 60 minutos de reação, utilizando três diferentes indutores.

Tabela 1 - Produção de amiloglicosidase com três diferentes indutores

Tempo (d)	Produção de AMG (U)		
	Milho	Farelo de trigo	Mandioca
0	0,000 ±0,0071	0,000 ±0,0028	0,000 ±0,0028
1	0,156 ±0,0325	0,000 ±0,0110	0,084 ±0,0049
2	0,227 ±0,0346	0,073 ±0,0110	0,183 ±0,0190
3	0,284 ±0,0099	0,100 ±0,0090	0,386±0,0040
4	0,304 ±0,0049	0,128 ±0,0028	0,535 ±0,0130
5	0,456 ±0,0800	0,168 ±0,0130	0,548 ±0,0300
7	0,533 ±0,0380	0,201 ±0,0350	0,730 ±0,0030

Analisando-se a Tabela 1, pode-se observar que a fermentação em que se utilizou o amido de mandioca como substrato foi a que apresentou a maior produção de AMG. De todos os substratos amiláceos testados como indutores para a produção de amiloglicosidase, a mandioca era a que continha a maior porcentagem de amido em sua composição, cerca de 96%, fato este que contribui para a maior produção de AMG no meio contendo amido de mandioca como indutor.

3 CONCLUSÃO

Através do estudo verificou-se que é possível a produção de amiloglicosidase através da utilização de amido de milho, mandioca e farelo de trigo como indutores, sendo que as maiores produtividades foram obtidas com o amido de mandioca. O fungo *Aspergillus niger* é um produtor de amiloglicosidase.

4 REFERÊNCIAS

LEMOS, C. M. Y. et al. Glucoamilase: estrutura e termoestabilização. **Revista Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Edição 31, jul./dez. 2003.

SPIER, M. R. **Produção de enzimas amilolíticas fúngicas α -amilase e amiloglicosidase por fermentação no estado sólido**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

TREVAN, M. D. et al. (Ed.). **Biotecnología: principios biológicos**. Zaragoza: Acribia, 1990.

VICENZI, R. **Apostila da disciplina Tópicos Especiais em Alimentos II**, curso de Química Industrial de Alimentos, Universidade Regional do Noroeste do Estado do RS-Unijuí, Ijuí, 2007.