

25 e 26 de setembro de 2007



em Passo Fundo, RS

## PRODUÇÃO DE ENZIMAS AMIOLÍTICAS POR *Aspergillus niger*

**Michele Zanotto Siben, André Brungera, Claudinéia Aparecida Pires, Daiana Bugança Galera, Luís Carlos Oliveira dos Santos Jr., Luis Fernando Wentz Brum, Marieli de Lima, Miriane Trentini, Rosiane Rizzatti, Luciane Maria Colla. \***

*Laboratório de Fermentações, Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade de Passo Fundo*

\*Email: [lmcolla@upf.br](mailto:lmcolla@upf.br)

### RESUMO

A produção de enzimas em escala industrial se faz predominantemente pela fermentação submersa, que é adequada para o cultivo de microrganismos recombinantes, que vêm sendo empregados para a produção de enzimas. A produção de enzimas inclui duas etapas principais: a fermentação, em que o microrganismo utiliza o substrato para gerar produtos de interesse, e a recuperação e purificação, em que se isola a enzima e leva-a ao grau de pureza desejado. As amilases estão entre as mais importantes enzimas industriais; podem ser usadas como aditivos em detergentes, na sacarificação do amido, entre outras. Objetivou-se avaliar a produção de enzimas amilolíticas via fermentação submersa por *Aspergillus niger* utilizando como fonte de carbono amido de batata e mandioca. O meio de cultivo foi preparado utilizando-se 100 g da fonte de amido, as quais foram submetidas à cocção e filtração. Adicionou-se solução de micronutrientes e completou-se o volume até 1L. Os meios foram esterilizados e submetidos a correção do pH até 5,7, sendo inoculados com 10 mL de uma suspensão de esporos e incubados em *shaker* a 30 °C por cinco dias. A cada 24 horas foram coletadas amostras para a determinação da atividade amilolítica, que foi realizada a 65 °C por 15 min, utilizando-se amido como substrato e medindo-se a atividade através da dosagem dos açúcares redutores liberados pelo método 3,5 DNS. As maiores atividades enzimáticas foram obtidas nos tempos de quatro e cinco dias de fermentação, utilizando amidos de mandioca e batata, respectivamente, de 0,4101 U e 0,1407 U.

Palavras-chave: amilase fúngica, produção de enzimas, amido.

### 1 INTRODUÇÃO

As amilases estão entre as mais importantes enzimas industriais e são de grande interesse na biotecnologia. Ocorrem amplamente em animais, plantas e microrganismos. Entretanto, devido às vantagens que oferecem, como menor tempo de produção, as amilases microbianas têm a preferência do mercado de enzimas (SPIER et al., 2006).

Vários são os parâmetros que estimulam a produção de amilases, dentre eles, as condições de crescimento microbiano e os substratos de carbono usados no meio de cultivo.

Fontes de carbono como dextrina, frutose, glicose, lactose, maltose, amido solúvel, além de outras, encarecem sua produção. No meio de cultivo, esses substratos podem ser substituídos por subprodutos agrícolas de baixo custo, o que torna o processo de produção dessas enzimas mais econômico. Com esse objetivo, farinhas e farelos de diferentes grãos e tubérculos como arroz, cevada, milho, trigo, mandioca e batata têm sido usados no meio de cultura para aumentar a produtividade de amilases de fungos e bactérias (CRUEGER; CRUEGER, 1993).

A fermentação submersa consiste naquela em que o microrganismo é introduzido em um meio líquido na forma de um inóculo, sendo o meio contido em fermentadores providos de agitação e aeração (microrganismos aeróbios) (REGULY, 2000) e outros controles, tais como: medidores de pH, temperatura, concentração de oxigênio dissolvido, entre outros. Os nutrientes encontram-se dissolvidos no meio líquido tornando-se facilmente acessíveis para utilização pelos microrganismos (SCHIMIDELL et al., 2001).

A espécie *Aspergillus niger* pode produzir cerca de quarenta tipos diferentes de enzimas, como, por exemplo, lipase, amiloglicosidase, pentosanase, protease,  $\alpha$ -amilase, fosfolipase, fitase, glicosidase, pectinase, celulase, catalase,  $\alpha$ -galactosidase, inulase etc. De todas as enzimas citadas, as amilases ( $\alpha$ -amilase,  $\beta$ -amilase e glucoamilase) estão entre as mais importantes enzimas extracelulares e são de grande significância na biotecnologia devido ao seu potencial de uso em vários processos industriais, tais como indústria alimentícia, fermentação, têxtil e indústria de celulose e papel. Os fungos filamentosos são geralmente os maiores produtores de enzimas extracelulares (GEOCITIES, 2007).

Objetivou-se, assim, avaliar a produção de enzimas amilolíticas via fermentação submersa por *Aspergillus niger* utilizando como fontes de carbono amido de mandioca e batata.

## **2 DESENVOLVIMENTO**

### **2.1 Material e métodos**

O preparo do inóculo foi realizado através de estriamento do fungo *Aspergillus niger* em placas de Petri contendo o meio PDA, as quais foram incubadas por cinco dias a 30 °C. O meio de cultivo foi preparado utilizando-se 100 g de batata ou mandioca como fontes de amido, as quais foram submetidas à cocção e filtração. Adicionou-se solução de micronutrientes e completou-se o volume até 1L. Os meios foram esterilizados e submetidos à correção do pH até 5,7, sendo inoculados com 10 mL de uma suspensão de esporos de *Aspergillus niger* e incubados em agitador orbital à temperatura de 30 °C por cinco dias. Diariamente foram coletadas amostras para a determinação da atividade amilolítica, que foi realizada a 65°C por 15 min, utilizando-se amido como substrato e medindo-se a atividade através da dosagem dos açúcares redutores liberados, os quais foram quantificados pelo método espectrofotométrico 3,5 DNS. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que libera 1mgAR/mL.min.

### **2.2 Resultados e discussão**

A Tabela 1 apresenta a concentração de açúcares redutores liberados, as unidades de atividade enzimática (UAE) para cada tempo de fermentação e as produtividades (U/d) para cada tempo de fermentação, utilizando mandioca como fonte de amido. A Tabela 2 apresenta a concentração de açúcares redutores liberados, as unidades de atividade enzimática (UAE) para cada tempo de fermentação e as produtividades (U/d) para cada tempo de fermentação, utilizando batata como fonte de amido.

**Tabela 1** - Concentração de glicose, atividade enzimática e produtividade para amido de mandioca

Tempo (d)	[ ] glic (mg/mL)	UAE (mg/mL.min)	U/d
0	7,070	0,0000	0,0000
1	10,059	0,1992	0,1992
2	9,619	0,1699	0,0849
3	11,026	0,2636	0,0879
4	13,223	0,4101	0,1025
5	12,256	0,3457	0,0691

**Tabela 2** - Concentração de glicose, atividade enzimática e produtividade para amido de batata

Tempo (d)	[ ] glic (mg/mL)	UAE (mg/mL.min)	U/d
0	7,158	0,0000	0,0000
1	7,598	0,0293	0,0293
2	7,949	0,0528	0,0264
3	8,389	0,0821	0,0274
4	8,653	0,0996	0,0249
5	9,268	0,1407	0,0282

As maiores atividades enzimáticas foram obtidas nos tempos de 4 e 5 dias de fermentação, utilizando amidos de mandioca e batata, respectivamente, de 0,4101 U e 0,1407 U. A produtividade em enzimas amilolíticas para o amido de mandioca em U/dia foram de 0,1992; 0,08495; 0,0879; 0,1025 e 0,06914, para as amostras nos tempos de 1, 2, 3, 4 e 5 dias, respectivamente, verificando-se que a maior produtividade foi obtida no primeiro dia de fermentação. As produtividades enzimáticas (U/d) obtidas com o amido de batata foram de 0,0293; 0,0264; 0,0274; 0,0249 e 0,0282 U/d nos tempos de 1, 2, 3, 4 e 5 dias, respectivamente. As maiores produtividades enzimáticas foram obtidas utilizando-se amido de mandioca como substrato, o que pode ser atribuído às maiores concentrações de amido presentes na mandioca em comparação com a batata em base seca, de 90,1% e 76,0%, respectivamente.

### 3 CONCLUSÃO

O microrganismo *Aspergillus niger* proporciona produtividade de unidades de enzimas amilolíticas tendo como substrato mandioca e batata, sendo que a mandioca favorece uma maior produção.

### 4 REFERÊNCIAS

CRUEGER, W.; CRUEGER, A. **Biotecnologia** – Manual de Microbiologia Industrial. Zaragoza - Espanha: Editorial Acribia S/A, 1993.

GEOCITIES FUNGOS. O inexplorado potencial enzimático da biodiversidade amazônica. Disponível em: <<http://www.geocities.com/biodiversidade2002/fungos.htm>>. Acesso em: 2 jul. 2007.

REGULY, J. C. **Biotecnologia dos processos fermentativos**: fundamentos, matérias-primas agrícolas, produtos e processos. Pelotas: Universitária, 1996. v. 3.

SCHMIDELL, W. et al. **Biotecnologia industrial**: engenharia bioquímica. São Paulo: Edgard Blucher, 2001. v. 2.

SPIER, M. R. et al. Production and Characterization of Amylases by *Aspergillus niger* under Solid State Fermentation Using Agro Industrials Products. **International Journal of Food Engineering**, v. 2, 2006.