

ANAIS

EICTI 2017

6° Encontro de
Iniciação Científica

2° Encontro de Iniciação
ao Desenvolvimento
Tecnológico e Inovação

4 a 6 de outubro de 2017

Universidade Federal da Integração Latino-Americana (UNILA)
Av. Tarquínio Joslin dos Santos, nº 1000
Foz do Iguaçu, Paraná – Brasil



Realização:



Apoio:



TRIAGEM ENZIMÁTICA E CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE FUNGOS FILAMENTOSOS ISOLADOS DE AMOSTRAS DE INDÚSTRIA TÊXTIL

JEAN-BAPTISTE James

Estudante do Curso de biotecnologia, voluntário IC - ILACVN – UNILA

E-mail: jj.jean-baptiste.2016@aluno.unila.edu.br

PASSARINI, Michel Rodrigo Zambrano

Docente do curso de Biotecnologia /ILACVN - UNILA

e-mail: michel.passarini@unila.edu.br

1. INTRODUÇÃO

A atividade industrial para a produção têxtil utiliza-se de etapas de operações unitárias geradoras de grandes cargas de efluentes com alto potencial poluidor. Apesar de tais efluentes receberem um tratamento que precede o lançamento em um corpo hídrico, muitas vezes o mesmo apresenta resultados insatisfatórios na remoção de determinados agentes poluentes, devido ao desconhecimento por parte dos operadores da natureza química dos produtos utilizados, bem como a infinidade de produtos utilizados durante cada etapa industrial. Desta forma, efluentes originários da produção de tecidos têm se apresentado como um causador de impactos ambientais diversos em corpos d'água e em suas áreas de entorno.

A partir de tal perspectiva, nota-se que a bioprospecção de micro-organismos é considerada um dos campos mais promissores dentro das novas tecnologias para a síntese de compostos de alto valor agregado, bem como alternativa sustentável para a degradação de produtos de alta toxicidade. O emprego de fungos filamentosos termofílicos tem se apresentado como alternativa sustentável para a aquisição das enzimas amilases e proteases.

2. METODOLOGIA

Foi realizado uma triagem enzimática inicial utilizando 20 fungos filamentosos preservados em método de ultracongelamento. Os isolados foram reativados em meio PDA (200g de batata fervida em água destilada em 2% de ágar). Após 7 dias de crescimento a 28 °C, os mesmos foram transferidos para frascos contendo o

mesmo meio de cultivo líquido originando assim os respectivos extratos enzimáticos. Os extratos foram submetidos aos seguintes ensaios.

A enzima amilase foi triada de acordo com o método proposto por Anduaem (2014). Os isolados foram inoculados no meio SPYA (1% de amido solúvel, 0.5% de peptona, 1.5% de extrato de levedura e 1.5% de ágar), sendo as placas incubadas a 28 °C por duas semanas. Após crescimento microbiano, a solução (1% de iodo em 2% de iodeto de potássio) foi adicionada na superfície dos meios de cultivo. As colônias que apresentaram a formação de um halo/zona clara (cerca de 10 mm de diâmetro), foram selecionadas como isolados produtores putativos de amilase. Os experimentos foram realizados em triplicata.

A enzima protease foi triada inoculando os isolados no meio LPDA (3% de leite desnatado, 1.0% de glicose, 1.5% de ágar em caldo de batata), sendo as placas incubadas a 28 °C por duas semanas. As colônias que apresentaram a formação de um halo/zona clara (cerca de 10 mm de diâmetro), foram selecionadas como isolados produtores putativos de protease. Os experimentos foram realizados em triplicata.

A caracterização morfológica dos isolados produtores das enzimas foi realizada cultivando as linhagens em meio de cultivo PDA (1.0% de glicose, 1.5% de ágar em caldo de batata), sendo incubadas a uma temperatura de 28 °C durante 7 dias. As cores das colônias e as taxas de crescimento foram avaliadas com o auxílio de um estereoscópio enquanto que a presença e tamanho de esclerótios, seriação de cabeça e morfologia de conídios foram determinados através da coloração em lâminas com uso do corante lactofenol azul de algodão com auxílio de um microscópio óptico.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Os fungos apresentam a capacidade de produzir e secretar enzimas para o meio ambiente, constituindo um grupo de micro-organismos com importante potencial biotecnológico, sendo responsáveis pela produção de várias enzimas usadas em processos industriais (Alves et al, 2002).

Proteases e amilases são enzimas que podem ser obtidas de linhagens de micro-organismos e que, do ponto de vista biotecnológica, podem ser utilizados em diversos setores industriais. As enzimas em questão pertencem à classe das hidrolases, apresentando atividade ótima em diferentes valores de pH.

Especificamente, as proteases conhecidas como alcalinas são as que possuem maior atividade enzimática em valores de pH acima de 8,0. As amilases, por sua vez, enzimas responsáveis por catalisar a hidrólise de carboidratos, atua em pH neutro. Tais enzimas são preferencialmente aplicadas nas indústrias de couros e de detergentes, nas indústrias farmacêutica, de cosméticos, de química fina e de alimentos, bem como atuam em processos fisiológicos e biotecnológicos.

Entre as amilases, destacam-se as α -amilases, responsáveis pelo rompimento das ligações no interior do substrato (endoamilases), as β -amilases, que hidrolisam unidades das extremidades não redutoras do substrato (exoamilase); e as glucoamilases (amiloglucosidas) que liberem unidades de glicose do terminal não redutor das moléculas do substrato. As amilases desempenham importantes papéis na área da biotecnologia com aplicações cada vez mais variadas: a indústria alimentícia, para obtenção de glicose a partir da liquefação do amido em produtos como pão, cerveja e outros tipos de bebidas alcoólicas e na ração animal, outrossim, na indústria no papel, na indústria têxtil, indústria de detergentes e produtos de limpeza, indústria farmacêutica e química, na produção de vitaminas e antibióticos (Spier, 2005).

As enzimas proteolíticas (proteases) constituem, devido às suas propriedades únicas de causar modificações seletivas e específicas, um dos mais importantes grupos de enzimas produzidas comercialmente. De fato, as proteases são enzimas capazes de clivar ligações peptídicas. Nos últimos anos, o uso de proteases tem sido bastante difundido devido a suas amplas finalidades: uso na indústria de detergentes, na indústria alimentícia, na elucidação estrutural de proteínas bem como em processos de biorremediação.

4. RESULTADOS

A seleção resultou em 20 isolados, dos quais 5 foram produtores de amilases (25%), produziram exclusivamente proteases (15%). Três isolados foram produtores tanto de amilase quanto de protease (15%) e 9 não produziram nenhuma das enzimas citadas (45%). Embora o número de isolados fúngicos analisados no presente trabalho tenha sido de pequena quantidade, os resultados observados foram comparativamente semelhantes aos observados na literatura. De acordo com a pesquisa desenvolvida por Saleem e Ebrahim (2014), 23,9% dos fungos obtidos apresentavam atividade amilolítica, especialmente pertencentes ao gênero

Aspergillus. Griebeler et al (2015), por sua vez, identificou em seu trabalho a ocorrência de 17,2% de fungos produtores de proteases.

Os diâmetros dos halos dos isolados que apresentaram atividade amilolítica variaram entre 1.5 a 2.0 cm cada. Dentre tais organismos, foram considerados com maior potencial de atividade amilolítica os isolados I34 e I35, ambos pertencentes ao gênero *Penicillium*. Dentre os micro-organismos selecionados com atividade proteolítica, os isolados I20, I21B, I22, I27 e I28 e I29 apresentaram diâmetro de halo variando entre 1.0 a 2.5 cm entre todos os produtores. Dos organismos em questão, pertencentes aos gêneros *Aspergillus* (I20, I21B, I22 e I27) e *Trichoderma* (I28 e I29), também apresentaram capacidade amilolítica.

Os gêneros identificados foram: *Aspergillus* (n=10), *Penicillium* (n=6) e *Trichoderma* (n= 2). Dois isolados não foram identificados morfológicamente, devido a não formação de estruturas morfológicas características de espécies fúngicas

5. CONCLUSÕES

Dentre os isolados analisados, observa-se que três linhagens (I21B, I22 e I27), apresentaram atividade para amilases e proteases, indicando um potencial para a aplicação biotecnológica para ambas as enzimas. Deste modo, trabalhos futuros podem ser realizados, encorajam o desenvolvimento de métodos otimizados na obtenção dessas duas potenciais enzimas de aplicação industrial.

6. PRINCIPAIS REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alves, M. H.; Campos-Takaki, G. M.; Porto, A. L. F.; Milanez, A. I. Screening of *Mucor* spp. for the production of amylase, lipase, polygalacturonase and protease. Brazilian Journal of Microbiology, v. 33, n. 4, p. 225-230, 2002.

Anduaem, B. Isolation and screening of amylase producing thermophilic spore forming Bacilli from starch rich soil and characterization of their amylase activities using submerged fermentation. International Food Research Journal 21, 831-837, 2014

Griebeler, Nara Elisandre, et al. Seleção de fungos filamentosos produtores de amilases, proteases, celulasas e pectinases" Revista Acadêmica: Ciência Animal 13 (2017).

Saleem, A., and Mohsen KH Ebrahim. Production of amylase by fungi isolated from legume seeds collected in Almadinah Almunawwarah, Saudi Arabia. Journal of Taibah University for Science 8.2 (2014): 90-97.

Spier, M. R., A. L. Woiciechowski, and C. R. Soccol. Produção de α -Amilase por *Aspergillus* em Fermentação no Estado Sólido de Amido de Mandioca e Bagaço de Cana-de-Açúcar. VI Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática. Anais Enzitec (2004): 116-116.