

FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
DO SUL

EVELYN DE ANDRADE SALOMÃO

**Purificação e caracterização bioquímica das amilases
produzidas por *Aspergillus* sp. e *Neurospora crassa* exo-1:
imobilização da enzima em alginato de sódio.**

Campo Grande – MS
2017

EVELYN DE ANDRADE SALOMÃO

Purificação e caracterização bioquímica das amilases produzidas por *Aspergillus* sp. e *Neurospora crassa* exo-1: imobilização da enzima em alginato de sódio.

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito final à obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Biologia Molecular.

Orientadora: Prof.^a Dra. Giovana Cristina Giannesi

Campo Grande – MS

2017

EVELYN DE ANDRADE SALOMÃO

Purificação e caracterização bioquímica das amilases produzidas por *Aspergillus* sp. e *Neurospora crassa* exo-1: imobilização da enzima em alginato de sódio.

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito final à obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Biologia Molecular.

Orientadora: Prof.^a Dra. Giovana Cristina Giannesi

Aprovada em: 10 de Março de 2017.

BANCA EXAMINADORA



Prof.^a Dra. Giovana Cristina Giannesi

UFMS



Prof.^a Dra. Fabiana Fonseca Zanoelo

UFMS



Prof. Dr. Jeandre Augusto dos Santos Jaques

UFMS

*Dedico este trabalho ao meu marido
e aos meus queridos pais,
exemplos de pessoas.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me abençoar com força e sabedoria para que nos momentos de desespero e lágrimas eu ultrapasse todas as barreiras que surgiram e surgirão em minha vida;

Ao meu marido que me apoiou em toda essa jornada, que esteve ao meu lado nos melhores e principalmente nos piores momentos, me erguendo nos momentos de tropeços e comemorando as conquistas;

Aos meus pais que me proporcionaram estudo de qualidade durante todo meu período escolar e que nunca deixaram que faltasse o necessário para minha formação como pessoa;

A meu irmão e cunhada, que entenderam os momentos de ausência nas reuniões de família quando precisei me aplicar no laboratório nos fins de semanas e férias.

Aos professores da Bioquímica, principalmente a minha orientadora Giovana, que me auxiliaram e orientaram com os estudos e experimentos;

A Clarice que cuidou dos fungos e sempre se lembrou de mim, prevendo necessidades mesmo quando ela estava de férias;

Aos técnicos, Angela, Valmir e Marcela que sempre me deram auxílio com os reagentes e equipamentos, e que ao logo dos meses se tornaram amigos;

Aos colegas de laboratório que estavam diariamente ajudando, discutindo resultados e também descontraído momentos de tensão quando algum experimento saiu do previsto;

As minhas amigas do curso de farmácia, Nathália e Vivien que me apoiaram em todos os momentos e nos estudos;

Enfim, meus sinceros agradecimentos a todos que contribuíram para meu crescimento profissional e para a concretização deste trabalho.

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades,
lembrai-vos de que as grandes coisas do homem
foram conquistadas do que parecia impossível.”

- Charles Chaplin -

RESUMO

O complexo amilolítico possui enzimas de grande importância industrial, como a α -amilase e a glucoamilase, que catalisam a hidrólise do amido. Fungos filamentosos são capazes de produzir enzimas amilolíticas e dentre eles estão os do gênero *Aspergillus*, que se destacam como excelentes produtores e o *Neurospora crassa* Mutante *exo-1* que é conhecido pela hiperexpressão da glucoamilase. O presente trabalho teve por objetivo purificar, imobilizar e caracterizar amilases produzidas pelos fungos *Aspergillus* sp. e *Neurospora crassa* Mutante *exo-1*. A α -amilase produzida pelo fungo *Aspergillus* sp. obteve purificação em coluna DEAE-Celulose de 7,59 vezes e 82,79 % de rendimento. A análise eletroforética em SDS-PAGE a 7 % revelou uma banda bem definida de peso molecular aproximado de 87 kDa. A imobilização foi realizada em alginato de sódio 3,5 % e cloreto de cálcio 0,5 M apresentando em torno de 40 % de atividade após o quarto e quinto ciclo de reuso. Os valores de pH e temperatura ótimos, para as enzimas livre e imobilizada, foram 4,5 e 65 °C e 4,5 e 60 °C, respectivamente. Os testes de estabilidade ao pH da enzima imobilizada mantiveram valores próximos a 100 %, enquanto que a livre apresentou queda de 50 % da atividade em todas as faixas de pH nos primeiros 10 minutos de incubação. Na estabilidade a temperatura a enzima imobilizada manteve 100 % de atividade em 40 °C, decaindo para 34 % quando elevada até 45 °C, 42 % a 50 °C e 69 % em 55 °C. A enzima livre apresentou 100 % de atividade em 40 e 55 °C, 70 % em 45 °C e 87 % em 50 °C. A glucoamilase produzida pelo *Neurospora crassa* Mutante *exo-1* apresentou purificação de 1,75 vezes com 31,27 % de rendimento em precipitação com sulfato de amônio e coluna DEAE-Celulose. A análise eletroforética SDS-PAGE a 7 % mostrou uma única banda bem definida. Para a imobilização foram utilizados os valores otimizados de 4 % de alginato e cloreto de cálcio 0,1 M mantendo 35 % da atividade do quarto ao sexto ciclo. Os valores de pH e temperaturas ótimos obtidos para a enzima livre e imobilizada foram de pH 5,0 e 65 °C e pH 5,5 e 55 °C, respectivamente. No teste de estabilidade ao pH a enzima livre demonstrou estabilidade em pH 4,0-8,0, a enzima imobilizada reteve menos de 20 % da atividade em 10 minutos de incubação em todos os pH. Na estabilidade a temperatura a enzima livre também apresentou melhores resultados quando comparado a enzima imobilizada, retendo aproximadamente 100 % de sua

atividade a 40 e 45 °C, enquanto que a imobilizada reteve menos de 15 % da atividade em todas as temperaturas após 60 minutos de incubação. Os resultados revelaram que a imobilização se mostrou promissora por ser de fácil processamento, baixo custo e pela possibilidade de recuperação e reutilização da enzima.

Palavras-chave: amilase, fungos filamentosos, alginato de sódio.

ABSTRACT

The amylolytic complex has enzymes of great industrial importance, such as α -amylase and glucoamylase that catalyze the hydrolysis of starch. Filamentous fungi are able to produce amylolytic enzymes, among them are *Aspergillus* sp., they stand out as excellent producers and *Neurospora crassa* Mutant *exo-1* which is known to overexpress glucoamylase. The present work has the purpose to purify, immobilize and characterize amylases produced by the fungi *Aspergillus* sp. and *Neurospora crassa* mutant *exo-1*. The α -amylase produced by the fungus *Aspergillus* sp. obtained purification on a DEAE-Cellulose column of 7.59 fold and 82,79 % yield. Electrophoretic analysis on 7% SDS-PAGE revealed a well-defined band of molecular weight approximate of 87 kDa. The immobilization was carried out in sodium alginate 3.5 % and calcium chloride 0.5 M with 40 % activity after the fourth and fifth reuse cycle. The optimum pH and temperature values, for free and immobilized enzymes, were 4.5 and 65 °C and 4.5 and 60 °C, respectively. The pH stability tests of the immobilized enzyme remained close to 100 % while the free form showed 50 % decrease in activity in all pH ranges in the first 10 minutes of incubation. In the temperature stability the immobilized enzyme maintained 100 % activity at 40 °C, decreasing to 34 % when raised to 45 °C, 42 % at 50 °C and 69 % at 55 °C. The free enzyme showed 100 % activity at 40 and 55 °C, 70 % at 45 °C and 87 % at 50 °C. Glucoamylase produced by *Neurospora crassa* mutant *exo-1* showed a purification of 1.75 fold and 31.27 % yield in ammonium sulfate precipitation and DEAE-Cellulose column. Electrophoretic analysis on 7% SDS-PAGE showed a single well-defined band. For the immobilization, the optimized values of 4 % of alginate and 0.1 M calcium chloride were used, maintaining 35 % of the activity from fourth to sixth cycle. The optimum pH and temperatures values obtained for the free and immobilized enzymes were pH 5.0 and 65 °C and pH 5.5 and 55 °C, respectively. In pH stability test the free enzyme demonstrated great stability at pH 4.0-8.0, the immobilized enzyme retained less than 20 % of activity in 10 minutes of incubation at all pH. In temperature stability the free enzyme also presented better results when compared with immobilized enzyme, retaining approximately 100 % of its activity at 40 and 45 °C, while immobilized retained less than 15 % of activity at all temperatures after 60 minutes of incubation. Results revealed that immobilization

showed itself promising because it was easy to process, low cost and possibility of recovery and reuse of the enzyme.

Key words: amylase, filamentous fungi, sodium alginate.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Representação dos polissacarídeos, amilose e amilopectina, constituintes do amido _____	19
Figura 2. Esquema representativo de técnicas de imobilização enzimática _____	23
Figura 3. Estrutura química do alginato de sódio _____	24
Figura 4. Perfil eletroforético da α -amilase do <i>Aspergillus</i> sp. _____	36
Figura 5. Efeito da concentração de alginato e cloreto de cálcio na imobilização da enzima _____	38
Figura 6. Número de ciclos de reuso da α -amilase imobilizada _____	39
Figura 7. Curva de pH das enzimas livre e imobilizada _____	41
Figura 8. Curva de temperatura das enzimas livre e imobilizada _____	41
Figura 9. Efeito do pH na estabilidade da enzima livre de <i>Aspergillus</i> sp. _____	42
Figura 10. Efeito do pH na estabilidade da enzima imobilizada de <i>Aspergillus</i> sp. _____	43
Figura 11. Efeito da temperatura na estabilidade da enzima livre de <i>Aspergillus</i> sp. _____	44
Figura 12. Efeito da temperatura na estabilidade da enzima imobilizada de <i>Aspergillus</i> sp. _____	44
Figura 13. Curva de crescimento para a produção da enzima pelo <i>N. crassa</i> _____	47
Figura 14. Perfil eletroforético da glucoamilase do <i>N. crassa</i> _____	49
Figura 15. Análise em TLC do produto de hidrólise da glucoamilase produzida por <i>Neurospora crassa</i> Mutante <i>exo-1</i> _____	50
Figura 16. Efeito da concentração de alginato e cloreto de cálcio na imobilização da enzima _____	52
Figura 17. Número de ciclos de reuso da glucoamilase imobilizada _____	53
Figura 18. Curva de pH das enzimas livre e imobilizada _____	54
Figura 19. Curva de temperatura das enzimas livre e imobilizada _____	55
Figura 20. Efeito do pH na estabilidade da enzima livre de <i>N. crassa</i> _____	56
Figura 21. Efeito do pH na atividade da enzima imobilizada de <i>N. crassa</i> _____	56
Figura 22. Efeito da temperatura na estabilidade da enzima livre de <i>N. crassa</i> _____	57
Figura 23. Efeito da temperatura na estabilidade da enzima imobilizada de <i>N. crassa</i> _____	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Enzimas comerciais obtidas a partir de fungos _____	17
Tabela 2. Atividade específica de dezoito fungos filamentosos produtores de Amilase _____	34
Tabela 3. Purificação da amilase de <i>Aspergillus</i> sp. em coluna de troca iônica DEAE-Celulose _____	35
Tabela 4. Efeito de íons sobre atividade residual da amilase _____	37
Tabela 5. Purificação parcial da glucoamilase _____	48
Tabela 6. Efeito de íons sobre atividade residual da glucoamilase _____	51
Tabela 7. Comparação entre as enzimas α -amilase e glucoamilase, livre e imobilizada _____	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLOS

Ba ²⁺	Bário
BDA	Batata-Dextrose-Ágar
BSA	Albumina Bovina Sérica (do inglês “ <i>bovine serum albumin</i> ”)
°C	Graus Celsius
Ca ²⁺	Cálcio
CM	Carboximetil
Cm	Centímetros
Co ²⁺	Cobalto
Cu ²⁺	Cobre
DEAE-Celulose	Dietilaminoetil-Celulose
DNS	Ácido 3,5-dinitrosalicílico
DP	Desvio padrão
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
Fe ²⁺	Ferro
FFCLRP-USP	Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
G	Força gravitacional
H ₂ O	Água
K ²⁺	Potássio
kDa	Quilo Dalton
KH ₂ PO ₄	Fosfato de potássio monobásico
M	Molar
Mg ²⁺	Magnésio
mg/mL	Miligramas por mililitros
MgSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de magnésio heptahidratado
mM	Milimolar
Mn ²⁺	Manganês
NH ₄ ⁺	Amônio

NH ₄ H ₂ PO ₄	Fosfato de Amônio Monobásico
nm	Nanômetro
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida (do inglês “ <i>polyacrilamide gel electrophoresis</i> ”)
pH	Potencial de hidrogênio
p/v	Peso/volume
q.s.p.	Quantidade suficiente para
Rpm	Rotações por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SmF	Fermentação submersa
SSF	Fermentação em meio semissólido ou estado sólido
TCA	Ácido tricloroacético
TLC	Cromatografia em camada delgada (do inglês “ <i>thin layer chromatography</i> ”)
U/mg	Unidades por miligramas
U/mL	Unidades por mililitros
V	Volts
v/v	Volume/volume
Zn ²⁺	Zinco
µg	Micrograma

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	16
1.1 Fungos produtores de enzimas	16
1.2 Amido	18
1.3 Complexo amilolítico	19
1.3.1 α -Amilase	20
1.3.2 Glucoamilase	20
1.4 Utilização industrial das enzimas	21
1.5 Purificação das enzimas extracelulares	22
1.6 Imobilização enzimática	22
1.6.1 Imobilização em alginato de sódio	24
OBJETIVO	26
2.1 Objetivos específicos	26
MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1 Manutenção dos microrganismos	27
3.2 Produção enzimática	27
3.3 Atividade enzimática	28
3.4 Quantificação de proteína	28
3.5 Purificação parcial da α -amilase	28
3.6 Eletroforese em condição desnaturante	29
3.7 Cromatografia em camada delgada (TLC)	29
3.8 Efeito de íons	30
3.9 Imobilização	30
3.9.1 Concentração de alginato de sódio	30
3.9.2 Concentração de cloreto de cálcio	31
3.9.3 Reuso	31
3.10 Caracterização bioquímica	31
3.10.1 Efeito do pH	31
3.10.2 Efeito da temperatura	32

3.10.3 Estabilidade ao pH _____	32
3.10.4 Estabilidade à temperatura _____	32
CAPÍTULO 1 Aspergillus sp. _____	33
RESULTADOS E DISCUSSÃO _____	34
4.1 Purificação parcial da α -amilase _____	35
4.2 Perfil eletroforético da α -amilase parcialmente purificada _____	36
4.3 Efeito de íons sobre a atividade amilolítica _____	37
4.4 Imobilização _____	38
4.4.1 Concentrações de alginato e cloreto de cálcio _____	38
4.4.2 Reuso _____	39
4.5 Caracterização bioquímica da α -amilase _____	40
4.5.1 Efeito do pH e temperatura _____	40
4.5.2 Estabilidade ao pH _____	42
4.5.3 Estabilidade à temperatura _____	43
CAPÍTULO 2 _____	46
<i>Neurospora crassa</i> Mutante <i>exo-1</i> _____	46
RESULTADOS E DISCUSSÃO _____	47
5.1 Purificação parcial da glucoamilase _____	48
5.2 Eletroforese da glucoamilase parcialmente purificada _____	49
5.3 Cromatografia em camada delgada (TLC) _____	50
5.4 Efeito de íons sobre a atividade glucoamilolítica _____	51
5.5 Imobilização _____	52
5.5.1 Concentrações de alginato e cloreto de cálcio _____	52
5.5.2 Reuso _____	53
5.6 Caracterização bioquímica da glucoamilase _____	54
5.6.1 Efeito do pH e temperatura _____	54
5.6.2 Estabilidade ao pH _____	55
5.6.3 Estabilidade à temperatura _____	57
CONCLUSÃO _____	60
REFERÊNCIAS _____	61

INTRODUÇÃO

Enzimas são proteínas de estruturas moleculares complexas, que catalisam reações químicas, na velocidade de 10^{14} vezes maior do que uma reação sem catalisador (DALLA-VECCHIA et al, 2004), e são classificadas de acordo com essas reações em: oxidorreduções, transferases, isomerases, ligases, liases e hidrolases. Elas são específicas a seus substratos e, quando em condições favoráveis de temperatura, umidade e pH, aceleram as reações químicas, além do mais, podem ser produzidas por várias espécies de animais, plantas, fungos, bactérias, vírus e algas (CAMPESTRINI et al, 2005; FENGXIA et al, 2008; ORLANDELLI et al, 2012).

As enzimas, como toda proteína, possuem estruturas: primária, composta pela sequência de aminoácidos; secundária, correspondente a interação entre os aminoácidos adjacentes, formando arranjos do tipo α -hélice e folha- β ; terciária, que provoca dobramentos devido a interações entre aminoácidos não sequencialmente próximos, o que confere seu sítio ativo e atividade, e; quaternária, corresponde a interações entre cadeias polipeptídicas (ORLANDELLI et al, 2012).

Atualmente a tecnologia enzimática é uma área da Biotecnologia em expansão que movimenta bilhões de dólares anualmente e ocorre em diversos setores, porém seu início histórico está datado ao final do século XIX (LINKE & BERGER, 2011). Nas indústrias as enzimas vêm sendo cada vez mais utilizadas com ampla variedade de aplicação (MUSSATO et al, 2007).

1.1 Fungos produtores de enzimas

Inúmeras enzimas comerciais são produzidas a partir de fungos (**Tabela 1**) por ser um processo relativamente simples, fácil de controlar, energeticamente eficiente e requer investimento de baixo custo (ORLANDELLI et al, 2012).

Tabela 1. Enzimas comerciais obtidas a partir de fungos

Fungo produtor	Enzimas comerciais
<i>Aspergillus aculeatus</i>	β -glucanase, pectinase
<i>Aspergillus melleus</i>	protease
<i>Aspergillus niger</i>	aminopeptidase, α -amilase, α -galactosidase, catalase, celulase, fitase, β -glucanase, glucoamilase, hemicelulase, inulase, lipase, pectinase, protease, xilanase
<i>Aspergillus oryzae</i>	aminopeptidase, α -amilase, lactase, protease
<i>Aspergillus pulverulentus</i>	pectinase
<i>Chaetomium erraticum</i>	dextranase
<i>Chryphonectria parasitica</i>	protease aspártica
<i>Humicola insolens</i>	celulase, β -glucanase, xilanase
<i>Penicillium camembertii</i>	lipase
<i>Penicillium citrinum</i>	lrotease
<i>Penicillium funiculosum</i>	pectinase, xilanase
<i>Penicillium lilacinum</i>	dextranase
<i>Penicillium roqueforti</i>	lipase
<i>Rhizopus delemar</i>	glucoamilase
<i>Rhizopus niveus</i>	glucoamilase, protease
<i>Rhizopus oryzae</i>	aminopeptidase, glucoamilase, lipase
<i>Talaromyces emersonii</i>	β -glucanase
<i>Trichoderma reesei</i>	celulase, xilanase
<i>Trichoderma viride</i>	celulase

Fonte: (ORLANDELI et al, 2012).

Os fungos produzem elevados níveis de enzimas com alto potencial para aplicações industriais e secretam suas enzimas diretamente no meio de produção, sem que haja a ruptura celular. A facilidade de cultivo permite uma boa produção em larga escala, requerem pouco espaço e tempo de produção, o que facilita modificações e otimização do processo (BANO et al, 2011; CHIMATA et al, 2011; LEE et al, 2009; MACIEL, 2006; STROPARO et al, 2012; USTINOV et al, 2008).

Estudos indicam dois processos básicos referentes à produção das enzimas por fungos filamentosos, o de fermentação submersa (SmF) e o de fermentação em meio semissólido ou estado sólido (SSF) que tem por maior característica a quantidade de água livre, mimetizando as condições naturais de adaptação de cada microrganismo. Apesar das vantagens econômicas e biológicas (RAMACHANDRAN et al, 2004; RODRIGUES et al, 2017), o uso da SSF torna-se limitado devido a dificuldades encontradas pela baixa disponibilidade de água, como o controle da concentração de substrato (POLIZELI & RAI, 2013).

A SmF utiliza um meio fermentativo onde o microrganismo se desenvolve em condições controladas de pH e temperatura, com fontes de nutrientes solúveis (aminoácidos, levedura e íons), uma fonte de carbono indutora para produção da enzima específica e água livre superior a 95%, o que facilita a recuperação das

enzimas extracelulares. Esse método permite o crescimento em estado estacionário ou agitado, este aumenta a disponibilidade de oxigênio e ao substrato (ORLANDELI et al, 2012).

1.2 Amido

O amido é um carboidrato armazenado na forma de grânulos semicristalinos encontrado em sementes, raízes e fibras de plantas amplamente utilizadas na agroindústria, como o trigo, milho, arroz, cevada, mandioca e batata (DJABALI et al, 2009). É considerado a maior fonte de energia armazenada dos vegetais, contribuindo com 70 a 80% das calorias consumidas pelos humanos (NETO et al, 2015). Sua composição é representada por dois polissacarídeos (**Figura 1**), sendo um de cadeia linear com ligações glicosídicas α -1,4, conhecido por amilose, constituído por aproximadamente 6000 (seis mil) resíduos de glicose, e outro de cadeia ramificada, na hidroxila de C6, com ligações α -1,4 e α -1,6, conhecido por amilopectina, constituído por aproximadamente 45 (quarenta e cinco) resíduos de glicose em sua cadeia lateral (CHEN et al, 2017; FERNANDES et al, 2007; FERREIRA & ROCHA, 2009; NETO et al, 2015).

Apesar de ser constituído de amilose e amilopectina, o amido tem sua composição variável, diferenciando apenas na quantidade de cada um dos dois polissacarídeos, 20-30% de amilose e 70-80% de amilopectina. A composição do amido influencia suas características físico-químicas, por exemplo, um amido com maior quantidade de amilose possui maior resistência a gelatinização e hidrólise, sendo adequado para produção de materiais termoplásticos (CHEN et al, 2017; FERREIRA & ROCHA, 2009).

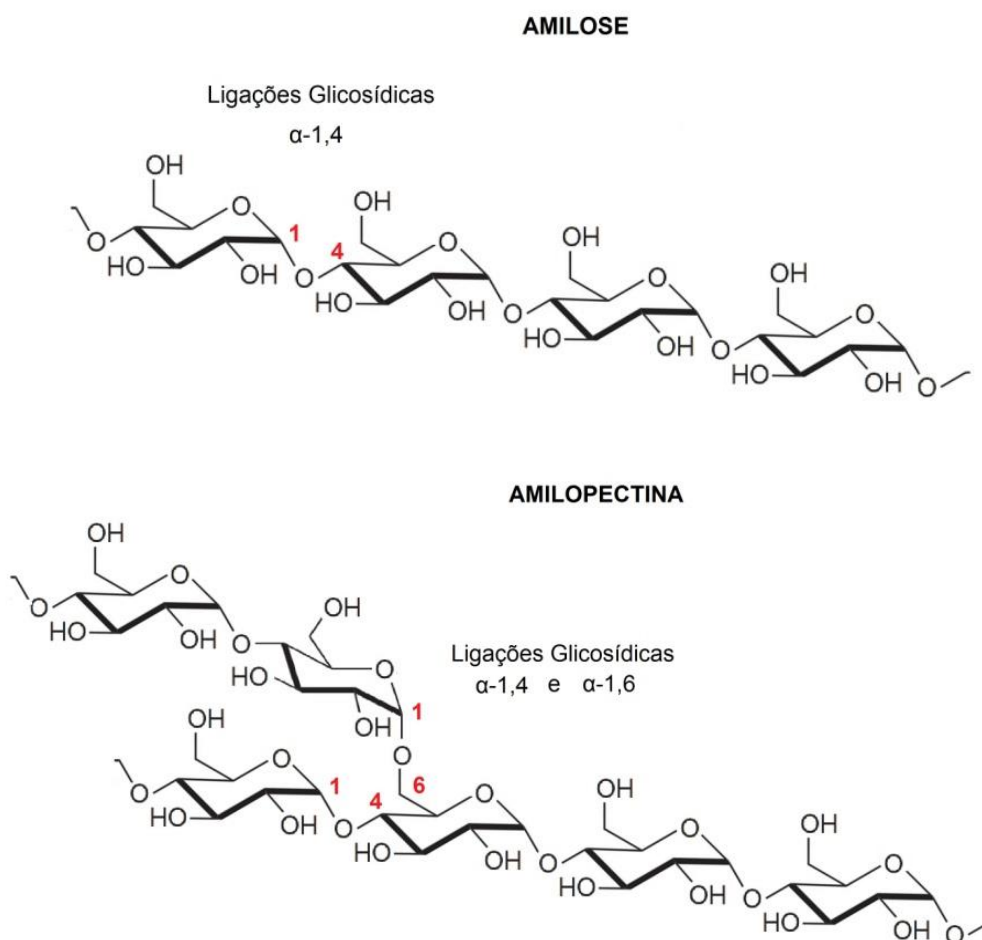


Figura 1. Representação dos polissacarídeos, Amilose e Amilopectina, constituintes do Amido. Em evidência encontram-se as ligações glicosídicas α -1,4 e α -1,6. (Modificada de FERREIRA & ROCHA, 2009)

1.3 Complexo amilolítico

As amilases são divididas em dois grupos, as endo e as exoamilases. As endoamilases hidrolisam no interior da molécula de amido de forma aleatória ligações do tipo α -1,4. Já as exoamilases, são específicas às ligações α -1,4 e α -1,6 (FERNANDES et al, 2007).

O complexo amilolítico compreende várias enzimas hidrolases degradadoras do amido, dentre as de maior importância industrial, encontram-se as α -amilases (endo-1, 4- α -D-glucan glucanohidrolase, EC 3.2.1.1) e as glucoamilases (exo-1, 4- α -D-glucan 4-glucohidrolase, EC 3.2.1.3), que catalisam a hidrólise das ligações

glicosídicas α -1,4 e das ligações α -1,4 e α -1,6 respectivamente (BANO et al, 2011; KHOO et al, 1994; TAVANO et al, 2008).

1.3.1 α -Amilase

A hidrólise catalisada pela α -amilase converte o amido em unidades de maltose, maltotriose e outros oligossacarídeos, uma vez que as ligações α -1,6 não são hidrolisadas (BALKAN & ERTAN, 2006; BANO et al, 2011; RAMACHANDRAN et al, 2004).

É uma das enzimas de maior importância industrial, pois possui uma imensa variedade de aplicações, sendo a produção de xarope de açúcares (glicose, maltose, maltotriose, dextrina, entre outros) a maior parte do processamento industrial do amido (BANO et al, 2011).

Uma das maiores limitações da utilização da α -amilase está no fato de serem facilmente inativadas por auto-degradação dependente da temperatura operacional e tempo de estocagem (CHIMATA et al, 2011).

1.3.2 Glucoamilase

A hidrólise referente à glucoamilase libera monômeros simples de glicose a partir das extremidades não redutoras do amido e maltose (KHOO et al, 1994; SPINELLI et al, 1996; STROPARO et al, 2012; TAVANO et al, 2008).

Vem sendo amplamente utilizada pela indústria alimentícia para formação de xarope de glicose e frutose, e também para a produção de bioetanol. Ganhou grande importância por ser eficiente, termoestável e devido a sua excelente característica que permite seu uso individual ou em associação com a α -amilase (AYODEJI et al, 2017).

1.4 Utilização industrial das enzimas

Na indústria de panificação a enzima α -amilase leva a produção de maltose que aumenta a maciez da massa, a xilanase promove estabilidade e as proteases alteram a elasticidade e textura do glúten, melhorando a cor e o sabor do pão. Nos laticínios a coagulação do leite para a produção de queijos é promovida pela quimosina e as lactases e lipases também estão presentes neste processo. As enzimas papaína, bromelina e ficina são utilizadas para o amaciamento de carnes. Para a produção de bebidas como o vinho e a cerveja são utilizadas: pectinase, glucoamilase, pentosanase, entre outras (CHIMATA et al, 2011; MUSSATO et al, 2007).

Na indústria de papel e celulose as xilanases e celulases são empregadas para branqueamento da pasta de papel. Proteases são adicionadas aos detergentes para melhorar o poder de limpeza, removendo manchas de compostos proteínicos. As enzimas estão presentes nas fases de fiação, tingimento e acabamento dos tecidos, um exemplo é o uso das celulases em substituição da pedra-pomes no efeito envelhecido de jeans. A indústria farmacêutica também utiliza enzimas para síntese, processamento ou como aditivo em seus produtos finais que vai de medicamentos a testes laboratoriais (MUSSATO et al, 2007; ORLANDELLI et al, 2012).

Na alimentação animal, as enzimas protease, xilanase, celulase e a amilase são utilizadas em associação com a intenção de aumentar a digestibilidade de rações, melhorando a absorção de nutrientes e assim, contribuir para a taxa de crescimento e para o ganho de peso animal (BARBOSA et al, 2014; BRITO et al, 2008; CARCIOFI et al, 2012).

No processo de degradação de resíduos agroindustriais as principais enzimas utilizadas são as α -amilases, xilanases, celulases e lipases, sendo as α -amilases as de maior utilização industrial, responsáveis por 25% da produção mundial (AYODEJI et al, 2017; CHIMATA et al, 2011; MURAKOSHI et al, 2012; STROPARO et al, 2012).

Dentre os fungos filamentosos com grande potencial para produção de enzimas amilases estão os dos gêneros *Aspergillus*, *Rhizopus* e *Trichoderma*. Os *Aspergillus* destacam-se como excelentes produtores de metabólitos secundários de

interesse industrial e ambiental, dentre as espécies estão *A. oryzae* (MAO et al, 2015), *A. flavus*, *A. niger* (SALEEM & EBRAHIM, 2014) e *A. nidulans* (MURAKOSHI et al, 2012). As espécies *R. oligosporus* e *T. reesei* também são citadas como produtoras de amilase (CAVKA & JONSSON, 2014; NASCIMENTO et al, 2014).

O fungo filamentoso *Neurospora crassa* Mutante *exo-1* possui propriedades promissoras atribuídas à modificação da sua parede celular e é conhecido pela hiperexpressão da enzima glucoamilase (SPINELLI et al, 1996).

Para serem utilizadas pela indústria as amilases necessitam de um elevado grau de pureza, muitas vezes acima de 99%. Para isso, técnicas de purificação são de extrema importância e podem ser utilizadas em associação (FARIA, 2013).

1.5 Purificação das enzimas extracelulares

Os métodos de purificação, como as colunas cromatográficas (DEAE-Celulose, Sephadex e Sephacryl), utilizam as características como o peso molecular, carga superficial, hidrofobicidade e afinidade por ligantes da enzima de interesse para distingui-las e separá-las de outras proteínas, células do microrganismo produtor, sais, substâncias tóxicas e metabólitos indesejáveis (FARIA, 2013; LINKE & BERGER, 2011; ORLANDELI et al, 2012).

O processo de purificação tem grande importância, pois promove a remoção desses contaminantes, que podem causar interferência na performance e na seletividade enzimática, influenciando os ensaios experimentais de atividade e caracterização bioquímica, necessários para a identificação da enzima específica (CAO, 2005; FARIA, 2013).

1.6 Imobilização enzimática

A técnica de imobilizar consiste em confinar a enzima em suportes de forma física (encapsulação) ou por reações químicas (ligações covalentes ou adsorção) tornando a enzima mais estável (**Figura 2**).

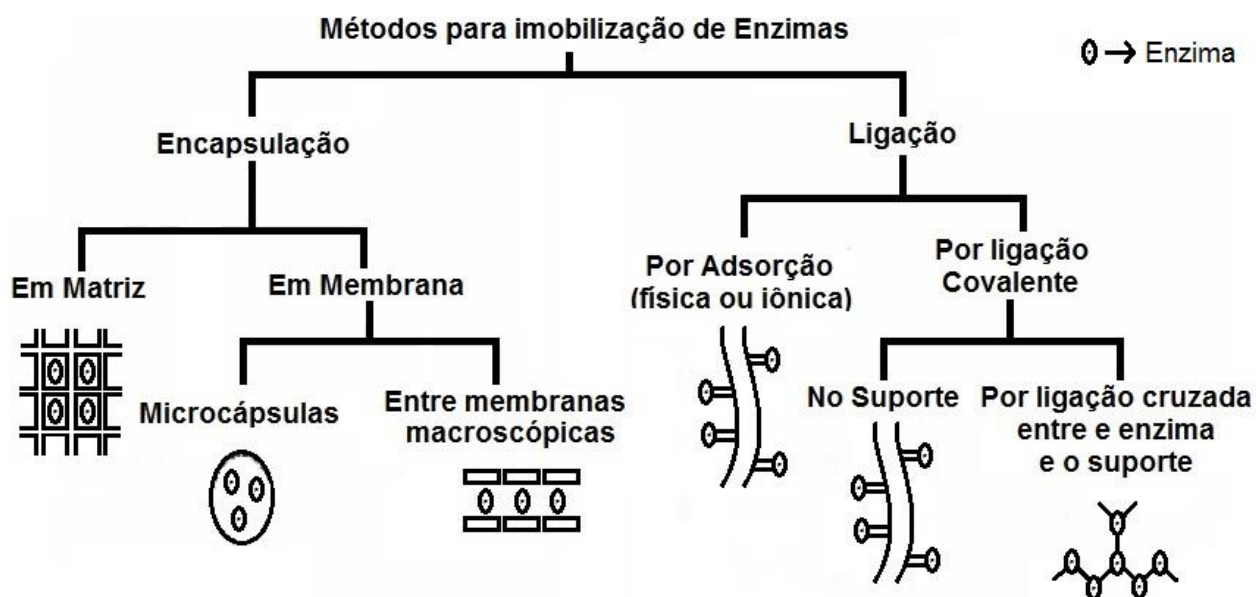


Figura 2. Esquema representativo de técnicas de imobilização enzimática. (Modificada de DALLA-VECCHIA et al, 2004)

Técnicas de imobilização são necessárias devido ao fato de as enzimas serem sensíveis a condições físico-químicas como pH, temperatura, solventes, fatores biológicos, tempo de uso e estocagem. Com a redução da inibição as características como especificidade, seletividade, estabilidade e atividade são mantidas e melhoradas. A imobilização também é empregada como forma de preservar a conformação nativa da enzima e facilita a separação da mesma dos produtos (MATEO et al, 2007; OLIVEIRA, 2006; ORLANDELI et al, 2012; PARIZA & COOK, 2010).

O uso da imobilização também é essencial para a redução de custos do processo industrial, pois além de diminuir os riscos de contaminação, também reduz a quantidade de enzimas utilizadas, uma vez que, após a reação, as enzimas não são consumidas, apenas liberam seus produtos e retornam à atividade, mantendo-se ativas após vários ciclos, ou seja, podem ser recuperadas e reutilizadas (CAMPESTRINI et al, 2005; CAO, 2005; KONSOLA & LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES, 2005; TAVANO, 2006; TAVANO, et al, 2013).

Vários suportes vêm sendo testados nos últimos trinta anos, dentre eles estão os polímeros (quitosana, agarose, poli-hidroxibutirato, entre outros), nanomateriais, microcápsulas, hidrogéis, silicatos e outros. Uma técnica de

imobilização ideal permite que a enzima seja mais eficiente, quando comparada com sua forma livre, e que não sofra modificação estrutural (DALLA-VECCHIA et al, 2004; DING et al, 2017).

Apesar dos inúmeros estudos referentes a essas técnicas, sua aplicação prática ainda é limitada devido ao elevado custo dos suportes (RAHIM et al, 2013) e à redução na atividade enzimática após o processo de imobilização. A perda da integridade conformacional pode ser um motivo que contribui para esse acontecimento. Outra hipótese está relacionada com a interação enzima suporte, que reduz a acessibilidade do substrato ao sítio catalítico da enzima (DING et al, 2017), pois, segundo Cao (2005), a expressão da atividade está intimamente relacionada com o tamanho dos poros, área de superfície e a acessibilidade do substrato a enzima encapsulada.

1.6.1 Imobilização em alginato de sódio

O alginato é um polissacarídeo aniônico presente na parede celular de algas pardas, formado por dois monômeros, um de β -D-Manuronila e um de α -L-Guluronila conectados por ligações glicosídicas. É comercializado na forma de sal de sódio (**Figura 3**) e quando em presença de alguns cátions bivalentes, como o Ca^{++} , sofrem o processo de gelificação. Por ser um produto de baixo custo, inerte, biocompatível, biodegradável e possuir bastante resistência mecânica, é bastante utilizado pela indústria alimentícia e farmacêutica (JADHAV & SINGHAL, 2014; KIM et al, 2017).

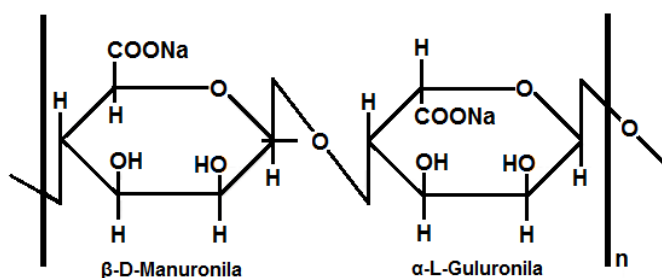


Figura 3. Estrutura química do Alginato de Sódio (modificado de SOUZA et al, 2009)

A imobilização em alginato consiste na formação de microcápsulas delimitadas por membranas que envolvem totalmente a enzima, que são moléculas grandes, e impedem seu extravasamento para o meio. Porém, moléculas pequenas, como o substrato conseguem se difundir através das membranas, o que permite o contato com o sítio ativo da enzima (DELLA-VECCHIA et al, 2004).

As pérolas são formadas através do gotejamento da solução de alginato com a enzima, com o auxílio de uma agulha ou pipeta, em solução de íons cálcio. O tamanho das pérolas depende do calibre da agulha e da concentração de alginato, que, segundo Gombotz e Wee (2012), torna-se difícil a preparação de concentrações superiores a 5%. Após o gotejamento do alginato sobre a solução de cálcio, em poucos minutos as pérolas se gelificam. Podem ser armazenadas em solução de íons cálcio para evitar degradação das pérolas.

Muitas vantagens são apresentadas no uso de imobilização em alginato, por ter propriedades únicas que permite que o trabalho seja realizado em temperatura ambiente, sem uso de solventes orgânicos e permitir o controle das características da cápsula mudando as condições de gelificação (GOMBOTZ & WEE, 2012; KONSOUOLA & LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES, 2005).

Porém, algumas desvantagens também são descritas segundo Jadhav e Singhal (2014) que afirmam haver uma perda significativa de enzima (aproximadamente 30%) na solução durante a formação das pérolas, o que ocasiona a diminuição do rendimento de imobilização tornando sua aplicação economicamente inadequada. A velocidade de difusão do substrato pela membrana também é um fator limitante segundo Della-Vecchia *et al* (2004).

OBJETIVO

Purificar, imobilizar e caracterizar bioquimicamente amilases produzidas pelos fungos *Aspergillus* sp. e *Neurospora crassa* mutante *exo-1*.

2.1 Objetivos específicos

- Testar a produção de amilase em 18 linhagens fúngicas (espécies de *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*);
- Purificar uma α -amilase selecionada a partir de 18 linhagens e uma glucoamilase a partir de *Neurospora crassa* Mutante *exo-1*;
- Imobilizar as enzimas purificadas em alginato de sódio e avaliar a eficiência do método;
- Caracterização bioquímica (pH e temperatura ótima, estabilidade ao pH e a temperatura) das enzimas livre e imobilizada.

MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Manutenção dos microrganismos

Foram utilizados dezoito (18) fungos isolados de: açafreão, endofíticos de *Vochysia divergens* (Cambará), *Croton grandivelus* e de rizoma de *Memora peregrina* e saprofítico de *Brachiaria brizanta*; sendo mantidos na Micoteca do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde/CCBS/UFMS. Dentre eles estão espécies dos gêneros de *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*. Todos foram mantidos em ágar BDA (Batata-Dextrose-Ágar) inclinado durante 10 dias a 30 °C. Após esse período foram mantidos sob refrigeração entre 4-8 °C por até trinta dias.

O fungo *Neurospora crassa* Mutante *exo-1*, foi gentilmente cedido pelo Prof. Dr. João Atilio Jorge, do Laboratório de Microbiologia da FFCLRP-USP, sendo mantido em ágar Vogel (1956) inclinado durante 10 dias a 30 °C. Após esse período o fungo foi mantido sob refrigeração de 4-8 °C, por até trinta dias.

3.2 Produção enzimática

Foram inoculados 1 mL de suspensão de esporos em Erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL de meio SR líquido (RIZZATTI et al, 2001) constituído de solução salina 0,05 % (v/v) -(NH₄H₂PO₄ - 1 %; KH₂PO₄ - 0,3 %; MgSO₄.7H₂O - 0,24 %)-, peptona 0,02 % (p/v), extrato de levedura 0,45 % (p/v), com 1 % de amido (p/v) como fonte de carbono, H₂O q.s.p. 100 mL. Os fungos produtores de α -amilase foram mantidos sob condição estacionária por 96 horas a 30 °C para obtenção das enzimas extracelulares. Já o fungo *N. crassa* foi mantido sob condição agitada por 120 horas a 30 °C, valores determinados pela curva de crescimento.

Após o crescimento dos fungos, o meio contendo a enzima de interesse foi filtrado com o auxílio de funil de Büchner e bomba a vácuo. O filtrado foi mantido em refrigeração de 4-8 °C até o momento do uso.

3.3 Atividade enzimática

Para a determinação da atividade enzimática as amostras foram incubadas em tampão acetato de sódio 100 mM inicialmente com pH 5,5 contendo 1 % de amido como substrato, em temperatura inicial de 50 °C. Em seguida a reação com ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) descrito por Miller (1959) foi utilizada para determinar o valor de açúcar redutor em unidades por mililitros (U/mL), alíquotas foram retiradas nos tempos 5 e 10 minutos de reação. Foi utilizado glicose como padrão.

3.4 Quantificação de proteína

Para a dosagem de proteína, foi utilizado o método segundo Lowry et al (1951) com albumina bovina sérica (BSA) como padrão. O resultado foi expresso em miligramas por mililitros (mg/mL)

A atividade específica foi expressa em U/mg de proteína.

3.5 Purificação parcial da α -amilase

A purificação parcial da enzima α -amilase produzida foi realizada em coluna de troca iônica DEAE (5,5 cm x 2 cm). 240 mL o extrato bruto da amostra foi equilibrado em tampão fosfato de sódio 500 mM com pH 7,5, para a concentração final de 50 mM, previamente a aplicação na coluna. A coluna foi equilibrada utilizando tampão fosfato de sódio 50 mM de pH 7,5. Após a passagem da amostra pela coluna cromatográfica, foi utilizado novamente o tampão fosfato de sódio 50 mM para retirar qualquer resquício de proteína não aderida, esse processo foi acompanhado por espectrofotometria a 280 nm (Thermo Scientific Espectrofotômetro UV-Vis GENESYS 10S). Para o gradiente foi utilizado cloreto de

sódio 0-1 M. A amostra obtida por esse processo foi posteriormente dialisada em água destilada totalizando um volume final de 260 mL.

A purificação parcial da glucoamilase foi realizada em precipitação do extrato bruto (287 mL) com sulfato de amônio 80 %, em constante agitação e sob refrigeração. Após duas horas, a amostra foi centrifugada a 10.000 G durante 20 minutos em centrífuga refrigerada a 4 °C (Hermle LaborTechnik Z326K), o precipitado foi ressuspensão em 50 mL de água destilada e dialisado em tampão fosfato de sódio 50 mM com pH 7,5 para equilibrar a amostra e, posteriormente aplicado na coluna de troca iônica DEAE (6 cm x 2 cm). Esse processo foi acompanhado por espectrofotometria a 280 nm.

Todas as etapas do procedimento de purificação foram realizadas em temperatura controlada de 4-8 °C.

3.6 Eletroforese em condição desnaturante

A eletroforese em condição desnaturante foi realizada utilizando amostra concentrada por evaporação a vácuo (Eppendorf Vacufuge™ Concentrator) até concentração final de 25 µg de enzima, aplicada em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), segundo Laemmli (1970), preparado a 7 %. Após a corrida da amostra (Bio Rad PowerPac™), o gel foi fixado em solução de metanol 50% e ácido acético 10% durante 30 minutos e corado com Azul de Coomassie *overnight* para a visualização da banda.

3.7 Cromatografia em camada delgada (TLC)

Para a realização da cromatografia em camada delgada a enzima parcialmente purificada do fungo *N. crassa* foi utilizada para a determinação do produto de sua hidrólise. Após a reação conforme descrito no item 3.3, foi adicionado ácido tricloroacético (TCA) 100 % nas amostras nos tempos de 0 e 30 minutos, fervidas, centrifugadas durante 5 minutos a 10.000 G e aplicadas à sílica.

Como eluente foi utilizado Butanol/Etanol/Água (5:3:2) sendo realizado duas eluições. A revelação da placa foi realizada com ácido sulfúrico e metanol (1:9) e orcinol 0,5 % o material foi incubado em estufa a 100 °C até a evidenciação das bandas.

3.8 Efeito de íons

Para verificar o efeito dos íons sobre a ação enzimática foram utilizados os íons Co^{2+} , Ba^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , NH_4^+ , Cu^{2+} , Ca^{2+} , K^+ e Mg^{2+} e o ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) em concentrações de 1; 5; e 10 mM adicionados ao tampão acetato de sódio 100 mM de pH 4,5 e incubados a 65 °C. Posteriormente os resultados foram apresentados em atividade residual (%) utilizando a amostra sem íon como controle. Todos os testes foram realizados em duplicata.

3.9 Imobilização

Para a imobilização da enzima utilizou-se a concentração de 1:1 alginato de sódio/enzima. Foi gotejado 1 mL dessa solução, utilizando agulha 22G, em 1 mL de solução de cloreto de cálcio. O procedimento foi realizado sob agitação, com bastão magnético e agitador magnético, onde permaneceu por 1 h e 30 minutos. As pérolas já formadas foram filtradas, com o auxílio de bomba a vácuo, e lavadas em tampão acetato de sódio 50 mM em pH 4,5. Permaneceram durante 10 minutos em temperatura ambiente para secagem.

3.9.1 Concentração de alginato de sódio

Para determinar a concentração de alginato que otimizou a imobilização enzimática o pó de alginato foi reconstituído em tampão acetato de sódio 50 mM nas

concentrações de 0,5-5 % (incremento de 0,5). Para esse teste foi utilizado solução de cloreto de cálcio 0,1 M. O resultado final foi demonstrado em atividade relativa (%). Todos os testes foram realizados em duplicata.

3.9.2 Concentração de cloreto de cálcio

Para determinar a melhor concentração de cloreto de cálcio para a formação das pérolas e otimização da imobilização, foram utilizadas concentrações de 0,1-3 M. Para esse teste foi utilizada a concentração otimizada de Alginato de 3,5 %. O resultado foi demonstrado em atividade relativa (%). Todos os testes foram realizados em duplicata.

3.9.3 Reuso

Os testes para determinação de ciclos de uso da enzima imobilizada foram realizados conforme descrito no item 3.3 com 10 minutos de reação, onde as pérolas foram filtradas e posteriormente adicionadas a um novo tampão de reação iniciando, assim, um novo ciclo. O resultado foi apresentado em atividade relativa (%). Todos os testes foram realizados em duplicata.

3.10 Caracterização bioquímica

3.10.1 Efeito do pH

Os testes para determinação do pH ótimo foram realizados com a adição das enzimas livre e imobilizada em tampão McIlvaine pH 3,0-8,0 (incremento de 0,5) determinando a atividade enzimática conforme descrito no item 3.3. O resultado foi

demonstrado em atividade relativa (%). Todos os testes foram realizados em duplicata.

3.10.2 Efeito da temperatura

Os testes para determinar a temperatura ótima de atividade enzimática foram realizados com as enzimas livre e imobilizada incubadas na faixa de temperatura variando de 35-70 °C (incremento de 5 °C) determinando o resultado conforme descrito no item 3.3. O resultado foi demonstrado em atividade relativa (%). Todos os testes foram realizados em duplicata.

3.10.3 Estabilidade ao pH

As enzimas (livre e imobilizada) foram incubadas em tampão McIlvaine de pH 3,0-8,0 (incremento de 1,0) e deixadas em refrigeração de 4-8 °C até o momento do uso. As dosagens foram realizadas como descritas no item 3.3 sendo retiradas alíquotas nos tempos 10, 30, 40 e 60 minutos. O resultado foi apresentado em atividade relativa (%) utilizando o valor da enzima não incubada como 100 %. Todos os testes foram realizados em duplicata.

3.10.4 Estabilidade à temperatura

As enzimas (livre e imobilizada) foram incubadas em tampão McIlvaine, no pH ótimo de cada uma e temperaturas de 40-55 °C (incremento de 5 °C) a determinação da atividade enzimática foi realizada conforme item 3.3, onde alíquotas foram retiradas nos tempos 10, 20, 30 e 60 minutos. O resultado foi apresentado em atividade relativa (%). Todos os testes foram realizados em duplicata.

CAPÍTULO 1

***Aspergillus* sp.**



RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram utilizados 18 fungos pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*. Após o crescimento e quantificação de atividade enzimática, o melhor produtor de amilase foi selecionado para os experimentos (**Tabela 2**).

Tabela 2. Atividade específica de dezoito fungos filamentosos produtores de Amilase

Fungo	AE	Fungo	AE
<i>Aspergillus sp. 1</i>	3,31	<i>P. funiculosum</i>	0,69
<i>Aspergillus sp. 2</i>	2,96	<i>Aspergillus sp. 6</i>	0,67
<i>A. fumigatus</i>	2,47	<i>A. oryzae</i>	0,67
<i>A. niger</i>	2,41	<i>A. japonicus</i>	0,66
<i>A. flavus</i>	1,71	<i>Aspergillus sp. 7</i>	0,45
<i>Aspergillus sp. 3</i>	1,38	<i>Aspergillus sp. 8</i>	0,44
<i>Penicillium sp.</i>	1,35	<i>Fusarium sp.</i>	0,30
<i>Aspergillus sp. 4</i>	1,33	<i>A. terreus</i>	0,20
<i>Aspergillus sp. 5</i>	1,21	<i>Aspergillus sp. 9</i>	0,14

Após crescimento sob condição estacionária durante 96h a 30 °C, os produtos das fermentações submersas dos fungos foram incubados durante 30 minutos conforme item 3.3; AE: Atividade Específica U/mg.

O *Aspergillus sp. 1* mostrou ter maior atividade específica (3,31 U/mg), seguido pelo *Aspergillus sp. 2* (2,96 U/mg), *A. fumigatus* (2,47 U/mg) e *A. niger* (2,41 U/mg). Apesar de pertencerem ao mesmo gênero, os fungos *Aspergillus sp.* possuem diferenças nos hábitos, origem e morfologia. Segundo Murakoshi et al (2012) espécies de *Aspergillus* podem induzir a produção de enzimas como a α -amilase, a glucoamilase e a α -glucosidase quando cultivadas em meio contendo amido como fonte de carbono.

Guimarães et al (2006) obtiveram elevados níveis de enzima amilase a partir dos fungos *Paecilomyces variotii* e *Aspergillus phoenicis*. Gupta et al (2003) relata o uso de *Aspergillus oryzae*, *A. nidulans* e *A. fumigatus* na produção de α -amilase. Mao et al (2015) complementa que a espécie *A. oryzae* é um dos principais fungos utilizados pela indústria como produtor dessas enzimas. As espécies de *A. oryzae* e

A. nidulans também são descritas como produtores de α -amilase (MURAKOSHI et al, 2012).

4.1 Purificação parcial da α -amilase

Após determinar o melhor fungo produtor de amilase, fez-se novo crescimento sob condições já padronizadas no laboratório. A enzima, produzida pela espécie de *Aspergillus* sp. 1 selecionada anteriormente, foi semi-purificada em coluna de troca iônica (DEAE), obtendo uma purificação de 7,59 vezes e 83 % de rendimento (**Tabela 3**). A purificação por precipitação, com sulfato de amônio, acetona e etanol, também foi testada sem resultado satisfatório (dados não apresentados).

Tabela 3. Purificação da Amilase de *Aspergillus* sp. em coluna de troca iônica DEAE-Celulose

	Volume (mL)	Unidade Total	Proteína Total (mg)	AE	P	%
Bruta	240	4951,35	204,21	24,25	1	100
DEAE- Celulose	260	4099,10	22,27	184,10	7,59	82,79

AE: atividade específica; P: índice de purificação; (%): rendimento.

Alguns estudos demonstram a precipitação com sulfato de amônio como uma boa opção para purificar amilase (GUPTA et al, 2003; RAMACHANDRAN et al, 2004), em associação com coluna cromatográfica de troca iônica DEAE-Sephadex A50, Khoo et al (1994) obtiveram rendimento final de 70 % e purificação de aproximadamente 14 vezes. Uma α -amilase produzida por *Aspergillus oryzae* apresentou purificação de 7,1 vezes e rendimento de 40 % após várias etapas, incluindo precipitação com acetona e cromatografia em Sephadex G-100 e DEAE (DEY & BENERJEE, 2015). No estudo de uma α -amilase produzida pelo *Bacillus subtilis*, foi obtida purificação de 96,3 vezes, porém, o rendimento foi de 5,6 %, utilizando técnicas de ultrafiltração, precipitação e cromatografia (BANO et al, 2011).

4.2 Eletroforese da α -amilase parcialmente purificada

Após a purificação parcial da enzima, o gel de eletroforese SDS-PAGE realizado a 7 % evidenciou uma banda bem definida de peso molecular aproximado em 87kDa, mais contaminantes de menor peso (**Figura 4**).

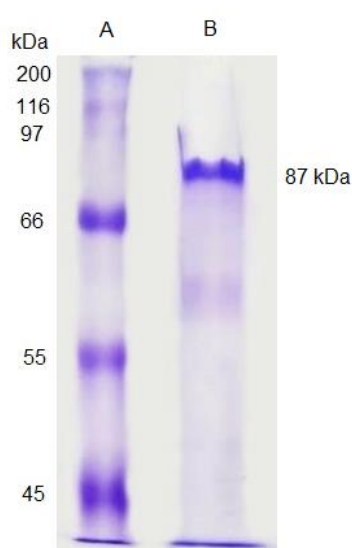


Figura 4. Perfil eletroforético da α -amilase do *Aspergillus* sp. SDS-PAGE (7 %); (A) marcador de peso molecular SigmaMarker™ High Range 36,000-200,000 Da; (B) amostra da enzima semi-purificada 25 μ g; foi utilizada a coloração com Coomassie-Blue.

Em comparação, uma α -amilase parcialmente purificada, produzida pelo fungo *Aspergillus oryzae*, apresentou peso molecular de aproximadamente 68 kDa em SDS-PAGE 12 % (RAMACHANDRAN et al, 2004), e 51,3 kDa em gel a 10 % (DEY & BENERJEE, 2015), outra amilase produzida pelo *Aspergillus flavus* obteve 52,5 \pm 2,5 kDa (KHOO et al, 1994). Na revisão apresentada por Sharma e Satyanarayana (2013) as α -amilases produzidas por várias espécies de *Aspergillus* apresentaram peso molecular médio de 54 kDa.

4.3 Efeito de íons sobre a atividade amilolítica

A atividade enzimática pode ser alterada na presença de alguns íons, que podem ativar ainda mais a hidrólise do substrato, ou reduzirem sua atividade, sendo de grande importância a determinação da influência desses íons (**Tabela 4**) para a utilização industrial da enzima (MORAES & SANTOS, 2013).

Tabela 4. Efeito de íons sobre atividade residual da amilase

Atividade Residual (%) ± DP			
Controle	100 ± 0,54		
Íon	1mM	5mM	10mM
EDTA	96,88 ± 0,79	103,31 ± 0,06	98,6 ± 0,32
Mn²⁺	126,04 ± 1,23	166,6 ± 1,5	188,78 ± 2,23
Fe²⁺	137,35 ± 1,23	121,69 ± 0,9	113,27 ± 1,56
NH₄⁺	110,19 ± 1,18	121,78 ± 0,95	128,93 ± 0,45
K⁺	108,56 ± 0,62	126,49 ± 0,15	120,51 ± 0,73
Ba²⁺	108,74 ± 1,76	123,86 ± 0,88	117,43 ± 0,26
Ca²⁺	117,16 ± 0,18	113,9 ± 1,32	117,25 ± 1,13
Co²⁺	102,4 ± 1,04	118,61 ± 0,41	109,83 ± 0,26
Mg²⁺	98,33 ± 0,36	116,8 ± 0,11	114,54 ± 0,23
Zn²⁺	112,91 ± 0,05	107,02 ± 1,73	105,03 ± 1,78
Cu²⁺	89,18 ± 0,28	67,73 ± 0,79	16,66 ± 0,18

A atividade residual (%) foi determinada pelas U/mL obtida pelo método do DNS; DP: desvio padrão.

O manganês foi o íon que proporcionou aumento da atividade enzimática em aproximadamente 26 %, 66 % e 88 % quando aumentada a concentração em 1, 5 e 10 mM, respectivamente. Em oposição, o aumento gradual da concentração do íon cobre inibiu a atividade da enzima em 11 %, 32 % e 83 %. Os outros íons mantiveram a enzima ativada em 15 % em média. Dey e Banerjee (2015) também descreveram inibição acentuada da atividade em adição ao íon cobre. Ramachandran et al (2004) obtiveram aumento da atividade enzimática quando

adicionado o íon manganês, porém a atividade diminuiu na presença dos íons cálcio, potássio e principalmente sódio.

4.4 Imobilização

4.4.1 Concentrações de alginato e cloreto de cálcio

As concentrações de alginato de sódio e do agente gelificante vêm sendo reportadas como de grande importância para que se obtenha o melhor resultado na imobilização enzimática. O cloreto de cálcio reage com o sódio do alginato e provoca a gelificação das pérolas, mantendo a enzima aprisionada, ou seja, imobilizada.

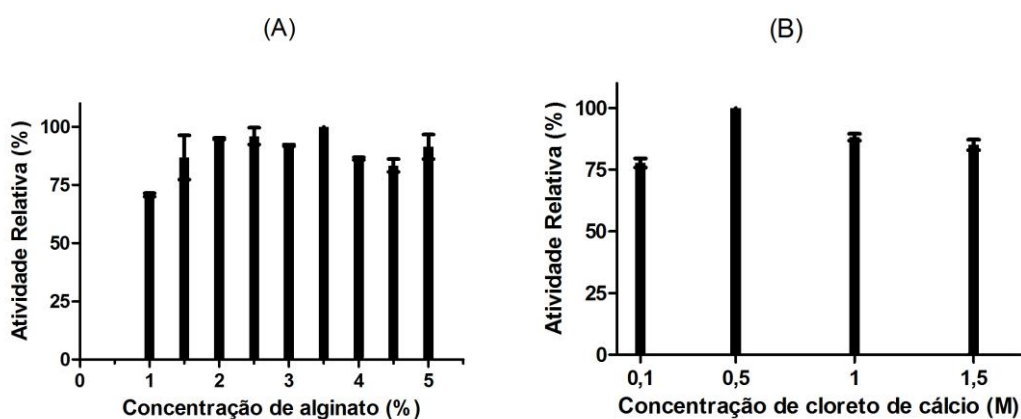


Figura 5. Efeito da concentração de alginato e cloreto de cálcio na imobilização da enzima. Gráficos demonstrando a diferença das concentrações de alginato (A) e cloreto de cálcio (B) na formação das pérolas para imobilização enzimática; os testes foram realizados em duplicata com a atividade expressa em atividade relativa (%) \pm DP.

Como demonstrado na **Figura 5** as melhores concentrações obtidas foram de 3,5 % de alginato de sódio (A) e 0,5 M de cloreto de cálcio (B). Em alginato na concentração de 0,5 % não formaram pérolas e nas concentrações acima de 1,5 M de cloreto de cálcio a solução de reação com DNS apresentou-se turva, inviabilizando a leitura colorimétrica da amostra.

Testes similares envolvendo amilases utilizaram 3 % e 1 M (TALEKAR & CHAVARE, 2012), 2 % e 2 % (JADHAV & SINGHAL, 2014) para concentrações de alginato e cloreto de cálcio, respectivamente. Raghu e Rajeshwara (2015) utilizaram 2 % de alginato para imobilizar uma α -amilase, enquanto que Kim et al (2017) imobilizou lipase utilizando concentrações de 3 % de alginato e 0,2 M de cloreto de bário.

4.4.2 Reuso

A determinação da quantidade de ciclos de reuso de uma enzima imobilizada tem grande importância econômica para as indústrias, pois podem reduzir significativamente a quantidade de enzima utilizada.

O reuso foi investigado realizando testes de atividade enzimática a cada ciclo de reação conforme item 3.3. O Primeiro ciclo foi considerado como 100% (Figura 6).

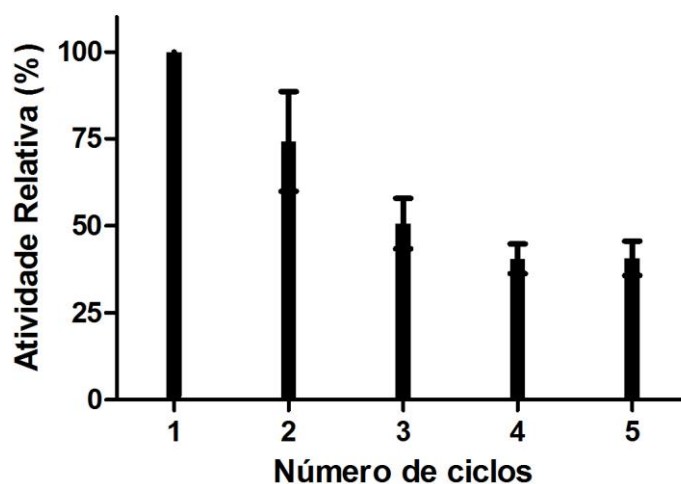


Figura 6. Número de ciclos de reuso da α -amilase imobilizada; os resultados foram realizados em duplicata e apresentados como atividade relativa (%) \pm DP de acordo com a quantidade de ciclos obtidos com o reuso da enzima imobilizada.

No presente estudo, após três ciclos de reação a enzima apresentava quase 60% de sua atividade, mantendo 40 % de atividade no quarto e quinto ciclos. Em estudos semelhantes com imobilização em alginato também foram descritas atividades de 60 % após o quinto ciclo de reuso de α -amilase de *Bacillus licheniformes* (JADHAV & SINGAL, 2014), 50 % após o oitavo ciclo (TALEKAR & CHAVARE, 2012), e nenhuma perda significativa, da atividade, no quinto ciclo de reuso foi descrito por Raghu e Rajeshwara (2015) em estudo com enzimas comerciais.

4.5 Caracterização bioquímica da α -amilase

4.5.1 Efeito do pH e temperatura

Os testes de efeito do pH (3,0-8,0) e da temperatura (35-70 °C) foram realizados com as enzimas livre e imobilizada, observando-se um aumento gradual na atividade até pH 4,5 e temperatura de 65 °C com queda acentuada após esses níveis na enzima livre. Com a enzima imobilizada o aumento foi gradual até pH 4,5 (**Figura 7**) e na temperatura foi obtido pico de atividade em 60°C seguido de queda significativa da atividade (**Figura 8**).

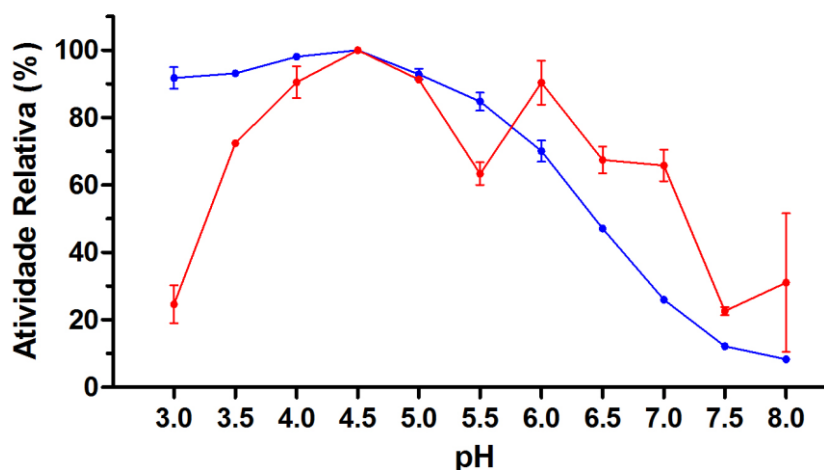


Figura 7. Curva de pH das enzimas livre — e imobilizada — ; a atividade foi definida conforme item 3.3 em duplicata e o resultado foi apresentado em atividade relativa (%) \pm DP com relação a variação do pH 3,0-8,0.

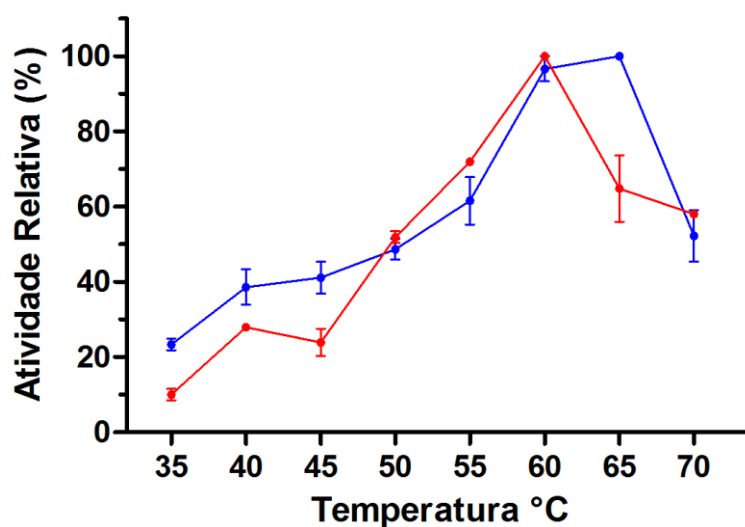


Figura 8. Curva de temperatura das enzimas livre — e imobilizada — ; a atividade foi definida conforme item 3.3 em duplicata e o resultado foi apresentado em atividade relativa (%) \pm DP com relação ao aumento de temperatura de 35-70 °C.

A faixa de pH ótimo das enzimas α -amilases produzidas por fungos fica entre valores ácidos a neutro, podendo ir de 2-12 (GUPTA et al, 2003; SHARMA & SATIANARAYANA, 2013). As α -amilases produzidas por várias espécies de

Aspergillus apresentam valores de pH e temperatura ótimos em torno de 4,0-5,0 e 40-65 °C, respectivamente (SHARMA & SATIANARAYANA, 2013). Em estudo de uma α -amilase produzida por *A. oryzae* foi obtida uma temperatura ótima de 50 °C para enzima livre (RAMACHANDRAN et al, 2004). Segundo Jadhav e Singhal (2014) o valor de pH ótimo foi de 5 para ambas as α -amilases, livre e imobilizada de *Bacillus licheniformis*, já os valores de temperatura ótima foram de 50 e 60 °C, respectivamente. Os valores de pH 7 e 50 °C para a enzima livre e pH 5,5 e 60 °C para a enzima imobilizada foram descritos por Talekar e Chavare (2012) em estudo de imobilização de α -amilase comercial em alginato.

4.5.2 Estabilidade ao pH

Os testes de estabilidade ao pH foram realizados sob as mesmas condições para as enzimas livre (**Figura 9**) e imobilizada (**Figura 10**). O Grupo controle 100 % foi obtido pela reação das enzimas (livre e imobilizada) em seus respectivos pHs ótimos.

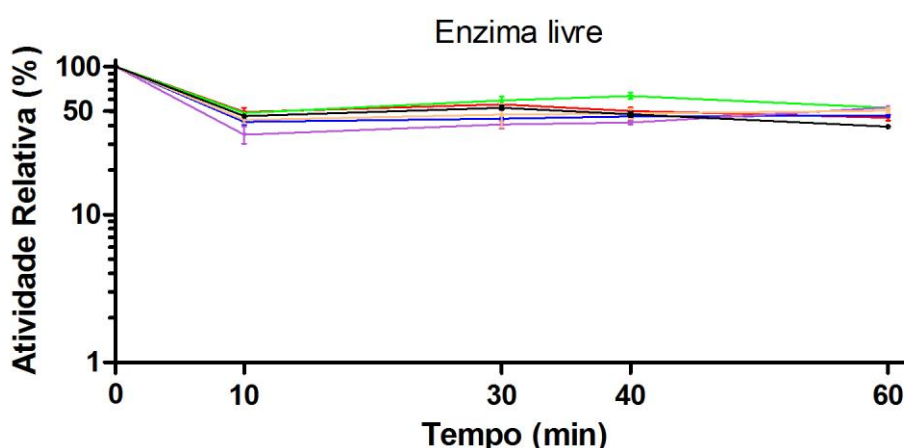


Figura 9. Efeito do pH na estabilidade da enzima livre de *Aspergillus* sp.; a atividade foi definida conforme item 3.3 em duplicata e o resultado foi apresentado em atividade relativa (%) \pm DP com relação ao tempo de incubação (10; 30; 40 e 60 minutos) nos diferentes pH 3,0 \rightarrow ; 4,0 \rightarrow ; 5,0 \rightarrow ; 6,0 \rightarrow ; 7,0 \rightarrow ; 8,0 \rightarrow da enzima livre.

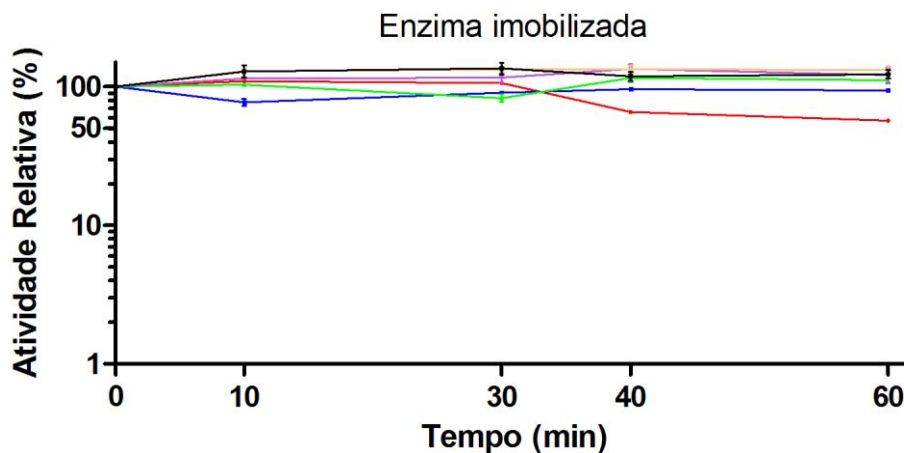


Figura 10. Efeito do pH na estabilidade da enzima imobilizada de *Aspergillus* sp.; a atividade foi definida conforme item 3.3 em duplicata e o resultado foi apresentado em atividade relativa (%) \pm DP com relação ao tempo de incubação (10; 30; 40 e 60 minutos) nos diferentes pH 3,0 — ; 4,0 — ; 5,0 — ; 6,0 — ; 7,0 — ; 8,0 — da enzima imobilizada.

As figuras indicaram que a enzima imobilizada foi mais estável, em comparação com os resultados obtidos com a enzima livre. A enzima imobilizada manteve os valores próximos a 100 % nos pH 4,0-8,0 em 60 minutos de incubação, no pH 3,0 a enzima foi estável até 30 minutos de incubação, caindo atividade para 65 % e 57 % em 40 e 60 minutos de incubação, respectivamente. A enzima livre apresentou queda de 50 % na atividade já nos primeiros dez minutos de incubação, mantendo 40-50 % de atividade para todas as faixas de pH em 60 minutos de incubação. Estudos mostram grande variação de estabilidade nas diferentes faixas de pH, segundo Gupta et al (2003) as α -amilases são estáveis entre pH 4,0-11,0.

4.5.3 Estabilidade à temperatura

Os testes de estabilidade à temperatura foram realizados entre 40 e 55 °C com a enzima livre (**Figura 11**) e a enzima imobilizada (**Figura 12**).

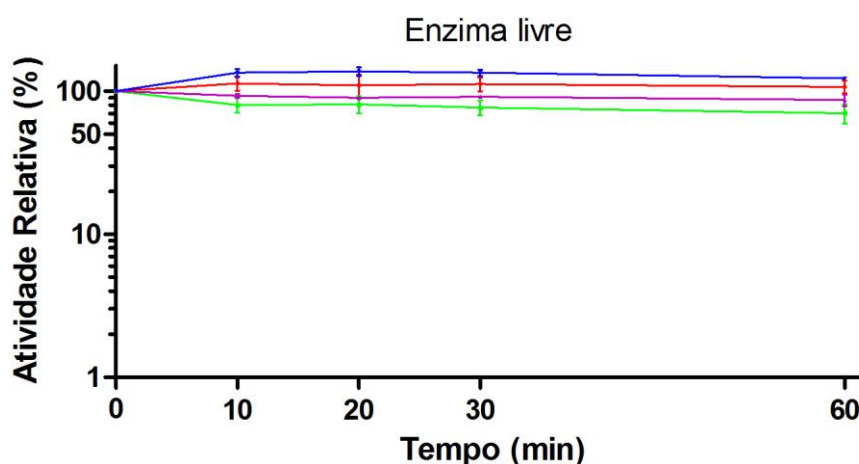


Figura 11. Efeito da temperatura na estabilidade da enzima livre de *Aspergillus* sp.; a atividade foi definida conforme item 3.3 em duplicata e o resultado foi apresentado em atividade relativa (%) \pm DP com relação ao tempo de incubação (10, 20, 30 e 60 minutos) da enzima livre nas temperaturas de 40°C — ; 45°C — ; 50°C — ; 55°C — .

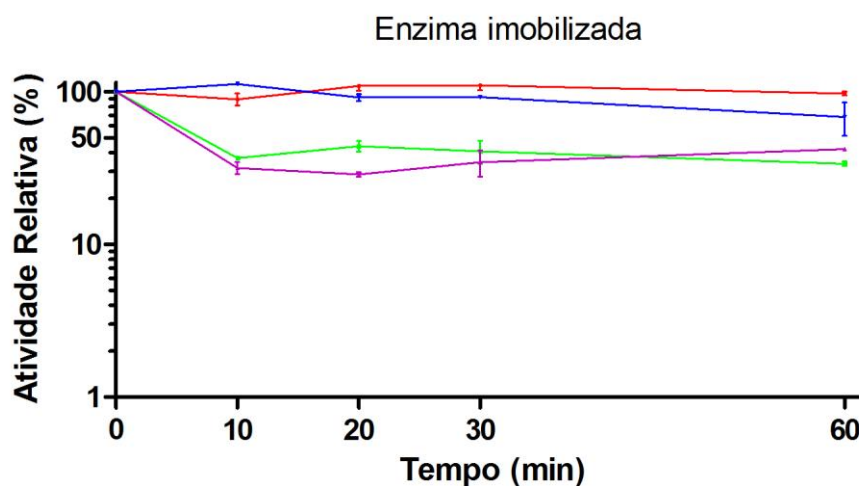


Figura 12. Efeito da temperatura na estabilidade da enzima imobilizada de *Aspergillus* sp.; a atividade foi definida conforme item 3.3 em duplicata e o resultado foi apresentado em atividade relativa (%) \pm DP com relação ao tempo de incubação (10, 20, 30 e 60 minutos) da enzima imobilizada nas temperaturas de 40°C — ; 45°C — ; 50°C — ; 55°C — .

Os resultados demonstram que a enzima livre foi mais estável a variação de temperatura quando comparada com a enzima imobilizada. A enzima livre apresentou 100 % de atividade em 60 minutos de incubação nas temperaturas de 40 e 55 °C, caindo para 87 % e 70 % de atividade nas temperaturas de 50 e 45 °C, respectivamente, em 60 minutos de incubação. A enzima imobilizada apresentou valor próximo a 100 % de atividade a 40 °C e 69 % a 55 °C com 60 minutos de incubação, porém a 45 e 50 °C a atividade chegou a 34 e 42 % de atividade respectivamente em 60 minutos de incubação. Dey e Banerjee (2015) obtiveram queda na atividade enzimática de 50 % em 30 minutos e 85 % em 20 minutos de incubação a 50 e a 60 °C respectivamente.

CAPÍTULO 2***Neurospora crassa* Mutante *exo-1***

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para determinar o tempo de cultivo e a melhor condição para produção de amilase foi realizada a curva de crescimento com a linhagem de *Neurospora crassa* mutante *exo-1*, utilizando meio SR enriquecido com 1 % de amido. O cultivo foi realizado por até 168 horas a 30 °C, sob condição estacionária e agitada. Alíquotas foram coletadas a cada 24 horas durante todo período. Os resultados demonstraram maior pico de atividade com 120 h de crescimento estacionário e agitado, mas obteve melhor produção enzimática sob condição agitada a 110 rpm (**Figura 13**).

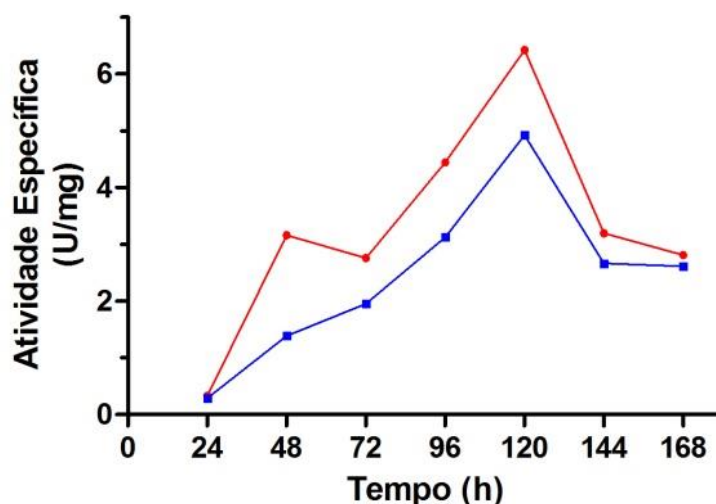


Figura 13. Curva de crescimento para a produção da enzima pelo *N. crassa*. O crescimento foi observado em período variando de 24 a 168 horas sob condição agitada— e estacionária—.

Segundo Tavano et al (2008) o meio de cultura de Vogel foi descrito como melhor opção para crescimento do fungo *N. crassa* e produção de enzimas. Porém, a produção da enzima pelo *Neurospora crassa* em meio SR sob as mesmas condições apresentou valores mais elevados do que com meio Vogel (resultados não apresentados).

5.1 Purificação parcial da glucoamilase

Para a semi-purificação da enzima, foram utilizadas as técnicas de precipitação e coluna cromatográfica de troca iônica DEAE.

A precipitação por sulfato de amônio (80 %) aumentou 22 % na atividade específica da enzima resultando numa purificação de 1,22 vezes com rendimento de 19,04 %. Após aplicação da amostra em coluna de DEAE-celulose, a enzima apresentou uma purificação de 1,75 vezes com 31,27 % de rendimento (**Tabela 5**), mesmo não se aderindo à coluna (a enzima de interesse foi eluída no tampão). Também foi testada a purificação com a coluna CM, porém o resultado não foi satisfatório (dados não apresentados).

Tabela 5. Purificação parcial da glucoamilase

	Volume (mL)	Unidade Total	Proteína Total (mg)	AE	P	%
Bruta	287	2820,94	200,44	14,07	1	100
Sulfato de Amônio (80%)	51	537,03	31,26	17,18	1,22	19,04
DEAE- Celulose	81	882	35,84	24,61	1,75	31,27

AE: atividade específica; P: índice de purificação; (%): rendimento.

Em estudo semelhante com a enzima glucoamilase produzida pela linhagem de *Neurospora crassa* Mutante *exo-1* foram utilizadas técnicas de precipitação com sulfato de amônio (60 %), colunas Sephadex G-100 e Sephacryl S-200, obtendo purificação de 2,2 vezes (SPINELLI et al, 1996). Ayodeji et al (2017) purificou uma glucoamilase produzida pela espécie *Aspergillus flavus* utilizando a coluna de troca iônica CM e a de filtração Sephadex G-100, atingindo um rendimento de 8,96 % e

purificação de 24 vezes. Com uma glucoamilase de *A. niger* foram utilizados ultrafiltração, precipitação e DEAE-Sephacel atingindo purificação de 12,2 vezes com rendimento de 54 % (BAGHERI et al, 2014).

5.2 Eletroforese da glucoamilase parcialmente purificada

Após a purificação parcial, a amostra foi aplicada em gel de poliacrilamida para eletroforese em condição desnaturante, resultando em uma banda única e bem definida (**Figura 14**). O peso molecular da enzima glucoamilase produzida pela linhagem de *N. crassa* Mutante *exo-1* já tem sido descrito na literatura como sendo de 82 kDa (SPINELLI et al, 1996).



Figura 14. Perfil eletroforético da glucoamilase do *N. crassa*. SDS-PAGE (7 %); amostra da enzima semi-purificada 25µg; foi utilizada a coloração com Coomassie-Blue.

As enzimas glucoamilases possuem peso molecular que variam entre 25 e 112 kDa, dependendo de suas origens. Uma glucoamilase proveniente do fungo *Aspergillus flavus* apresentou peso molecular de 65 kDa (AYODEJI et al, 2017), outra proveniente do *Aspergillus niger* apresentou 62 kDa (BAGHERI et al, 2014).

5.3 Cromatografia em camada delgada (TLC)

O TLC é um teste de análise qualitativa do produto da hidrólise enzimática, sendo de grande importância na determinação da enzima em estudo. Esse teste foi realizado com a enzima parcialmente purificada e demonstrou a formação de uma única banda na mesma altura da banda representada pelo padrão de Glicose (**Figura 15**).



Figura 15. Análise em TLC do produto de hidrólise da glucoamilase produzida por *Neurospora crassa* Mutante *exo-1*. Padrão: glicose 5mg/mL (1). A enzima foi incubada em tampão com amido 1%. Após o tempo de reação alíquotas foram retiradas e analisadas em placa de sílica. Tempo zero de reação (2) e 30 minutos de reação (3).

Esse resultado sugere que a enzima semi-purificada se trata de uma glucoamilase, pois esta promoveu a degradação do amido em glicose como produto após 30 minutos de reação. Em estudo similar Bagheri et al (2014) apresentaram um teste de TLC com uma única banda de glicose, determinando que a enzima purificada também era uma glucoamilase.

5.4 Efeito de íons sobre a atividade glucoamilolítica

A presença de alguns íons juntamente com a enzima pode alterar sua atividade, reduzindo ou ativando a hidrólise dos substratos. A determinação da influência desses íons sobre a atividade enzimática é de grande valor para a utilização industrial dessas enzimas (MORAES & SANTOS, 2013).

Tabela 6. Efeito de íons sobre atividade residual da glucoamilase

Atividade Residual (%) \pm DP			
Controle	100 \pm 0,04		
Íon	1 mM	5 mM	10 mM
EDTA	97,97 \pm 21,98	87,23 \pm 12,77	97,31 \pm 17,39
Mn ²⁺	167,77 \pm 4,67	189,86 \pm 22,15	264,54 \pm 5,8
Fe ²⁺	138,21 \pm 16,38	144,22 \pm 13	145,7 \pm 9,68
K ⁺	122,42 \pm 24,82	145,92 \pm 28,89	155,64 \pm 24,41
Mg ²⁺	117,22 \pm 22,68	138,69 \pm 11,18	145,54 \pm 19,55
Ba ²⁺	120,84 \pm 12,76	130 \pm 16,46	127,86 \pm 24,37
Zn ²⁺	122,44 \pm 17,2	128,31 \pm 8,44	108,71 \pm 19,63
NH ₄ ⁺	108 \pm 22,19	119,04 \pm 6,16	110,25 \pm 6,54
Co ²⁺	104,62 \pm 12,70	103,71 \pm 20,96	106,74 \pm 5,86
Ca ²⁺	75,92 \pm 6,49	106,29 \pm 16,55	99,84 \pm 15,12
Cu ²⁺	125,95 \pm 8,7	80,62 \pm 9,66	24,02 \pm 3,28

A atividade residual (%) foi determinada pelas U/mL obtida pelo método do DNS; DP: desvio padrão.

Os resultados apresentados na **Tabela 6** demonstram que a enzima glucoamilase foi ativada pelo íon cobre em 26 % quando adicionado 1 mM do íon, porém quando aumentado em 5 e 10 mM ocasionou a inativação em 19 % e 76 %, respectivamente. O íon cálcio inativou a enzima em 6 % em média. Já o íon manganês aumentou a atividade enzimática em aproximadamente 68, 90 e 165 % quando aumentada as concentrações do íon. Os outros íons apresentaram um ganho de atividade em 26 % em média. Na literatura a atividade da enzima glucoamilase *exo-1* apresentou aumento de 50-60 % na presença de 10 mM de íon

manganês (SPINELLI et al, 1996). Houve um resultado inibitório de 25, 60, 70 e 72 % na presença dos íons cobre, ferro, alumínio e mercúrio, respectivamente, já outros íons estudados não apresentaram variação na atividade em uma glucoamilase produzida por *A. niger* (BAGHERI et al, 2014).

5.5 Imobilização

5.5.1 Concentrações de alginato e cloreto de cálcio

Para realizar a imobilização enzimática é utilizado o cloreto de cálcio que reage com o sódio do alginato e provoca a gelificação das pérolas, mantendo a enzima aprisionada. Por esse motivo, as concentrações de alginato de sódio e do agente gelificante são de grande importância para garantir melhores resultados na imobilização enzimática, como demonstrado na **Figura 16**.

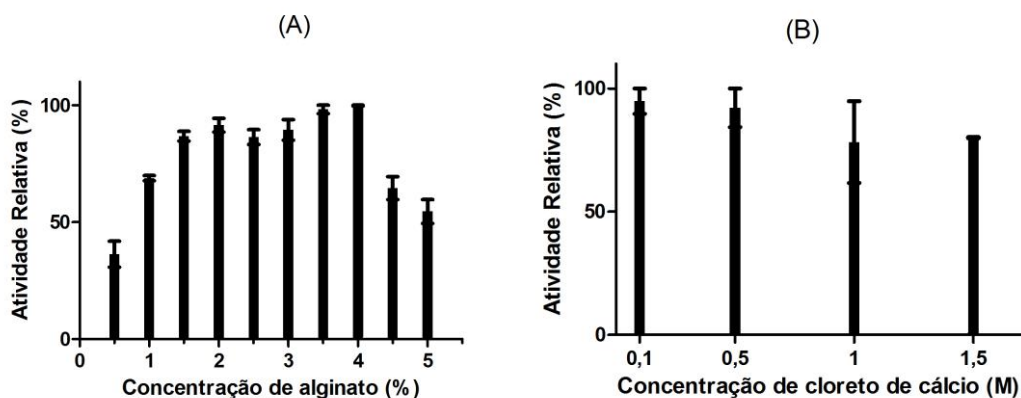


Figura 16. Efeito da concentração de alginato e cloreto de cálcio na imobilização da enzima. Gráficos demonstrando a diferença das concentrações de Alginato (A) e Cloreto de Cálcio (B) na formação das pérolas de imobilização enzimática com relação a atividade relativa (%); os testes foram realizados em duplicata com desvio padrão.

As melhores concentrações foram de 4 % e 0,1 M de alginato e cloreto de cálcio, respectivamente. Estudos utilizando a imobilização em matriz de alginato mostraram valores variáveis dessas concentrações de acordo com a enzima, 3 % de alginato e 0,2 M de cloreto de bário para imobilizar uma lipase de *Candida rugosa* (KIM et al, 2017) e 3 % de alginato e 1 M de cloreto de cálcio para imobilizar uma α -amilase comercial (TALEKAR & CHAVARE, 2012).

5.5.2 Reuso

A imobilização enzimática tem como um de seus objetivos a garantia de poder reutilizar a enzima. Por esse motivo, os testes de ciclos de uso enzimático têm grande importância econômica para as indústrias, pois, implica na redução significativa da quantidade e permite a reutilização da enzima.

O reuso foi investigado realizando testes de atividade enzimática a cada ciclo de reação de 10 minutos conforme item 3.3. O Primeiro ciclo foi considerado 100 %.

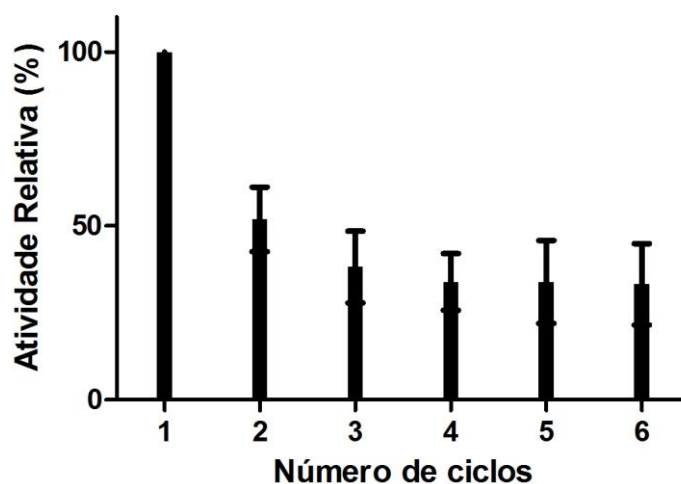


Figura 17. Número de ciclos de reuso da glucoamilase imobilizada; Figura demonstrando a atividade relativa (%) de acordo com a quantidade de ciclos obtidos com o reuso da enzima imobilizada; os testes foram realizados em duplicata com desvio padrão.

Como demonstrado na **Figura 17**, a enzima apresentou retenção de 52 % de atividade no segundo ciclo e 38 % no terceiro ciclo. Após o terceiro ciclo de reuso a enzima reteve 35 % de sua atividade até o sexto ciclo de reuso. Syed et al (2016) apresentou resultado de 49 % de atividade após o oitavo ciclo de reuso de uma enzima glucoamilase proveniente de *Neurospora sitophila* imobilizada em nanopartículas de prata.

5.6 Caracterização bioquímica da glucoamilase

5.6.1 Efeito do pH e temperatura

Os testes para verificar efeito do pH (variando de pH 3,0-8,0) e da temperatura (variando de 35-70 °C) foram realizados nas enzimas livre e imobilizada. Os resultados demonstram um pico de atividade no pH 4,5 para a enzima livre e pH 5,5 para a enzima imobilizada (**Figura 18**) e os picos da temperatura foram em 65 e 55°C para a enzima livre e imobilizada, respectivamente (**Figura 19**).

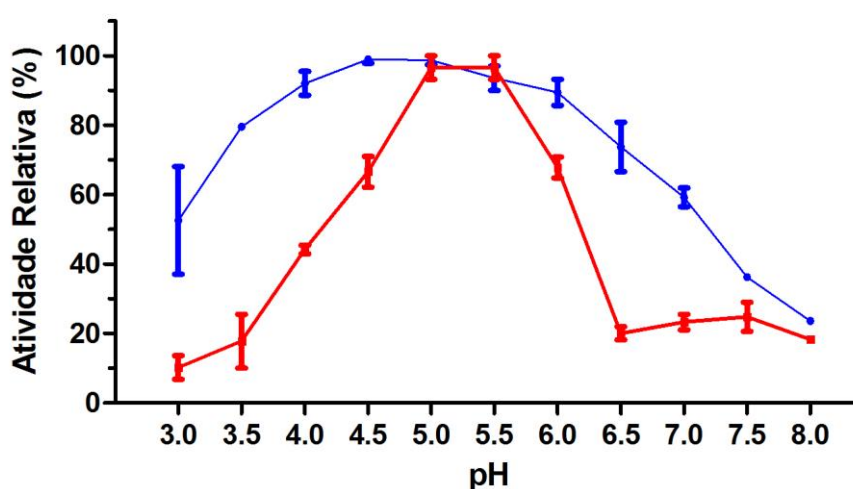


Figura 18. Curva de pH das enzimas livre — e imobilizada — ; a atividade foi definida conforme item 3.3 em duplicata e o resultado foi apresentado em atividade relativa (%) \pm DP com relação a variação do pH 3,0-8,0.

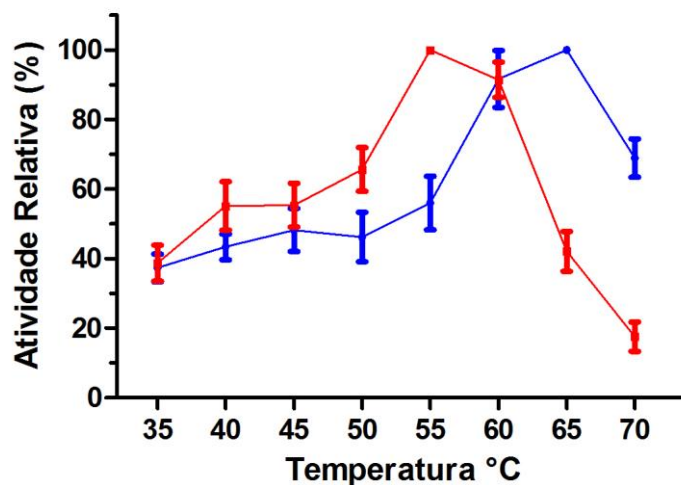


Figura 19. Curva de temperatura das enzimas livre — e imobilizada — ; a atividade foi definida conforme item 3.3 em duplicata e o resultado foi apresentado em atividade relativa (%) \pm DP com relação ao aumento de temperatura de 35-70 °C.

Para a glucoamilase de *N. crassa* *exo-1* livre foi determinado pH 5,4 e 60 °C como valores ótimos de atividade (SPINELLI et al, 1996). Em estudos com glucoamilase os resultados otimizados foram de pH 5,5 e temperatura de 50 °C para a enzima livre (AYODEJI et al, 2017) e, quando imobilizada em matriz de glutaraldeído, os resultados de pH e temperaturas ótimos foram de pH 4 e 65 °C para a glucoamilase de *A. niger* (TANRISEVEN & ÖLÇER, 2007).

5.6.2 Estabilidade ao pH

Os testes de estabilidade ao pH foram realizados com as enzimas livre (**Figura 20**) e imobilizada (**Figura 21**) utilizando as mesmas condições.

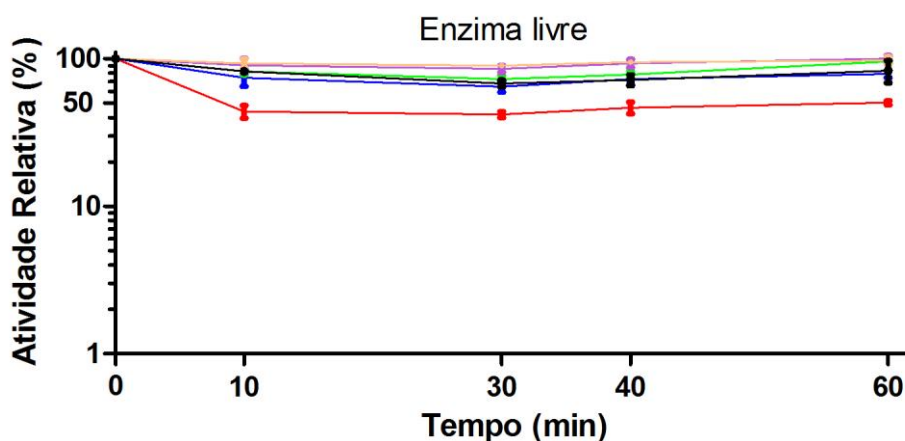


Figura 20. Efeito do pH na estabilidade da enzima livre de *N. crassa*; a atividade foi definida conforme item 3.3 em duplicata e o resultado foi apresentado em atividade relativa (%) \pm DP com relação ao tempo de incubação (10; 30; 40 e 60 minutos) nos diferentes pH 3,0 \rightarrow ; 4,0 \rightarrow ; 5,0 \rightarrow ; 6,0 \rightarrow ; 7,0 \rightarrow ; 8,0 \rightarrow da enzima livre.

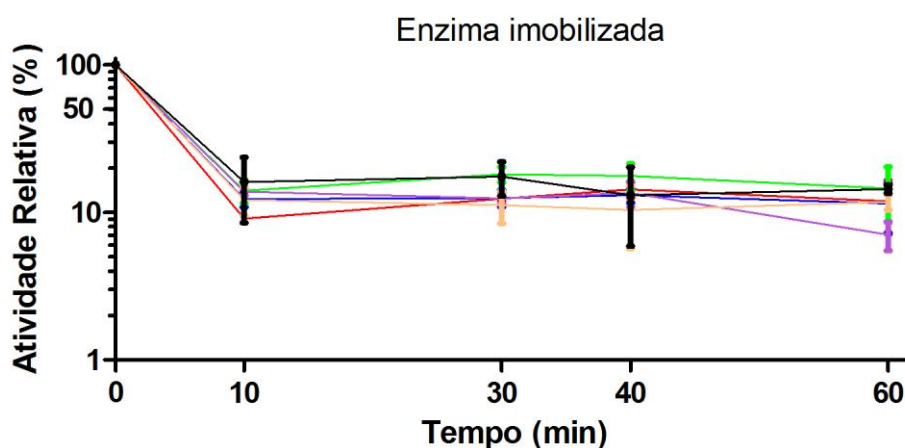


Figura 21. Efeito do pH na estabilidade da enzima imobilizada de *N. crassa*; a atividade foi definida conforme item 3.3 em duplicata e o resultado foi apresentado em atividade relativa (%) \pm DP com relação ao tempo de incubação (10; 30; 40 e 60 minutos) nos diferentes pH 3,0 \rightarrow ; 4,0 \rightarrow ; 5,0 \rightarrow ; 6,0 \rightarrow ; 7,0 \rightarrow ; 8,0 \rightarrow da enzima imobilizada.

A enzima livre mostrou ser estável nos pH 4,0-8,0 apresentando atividade de 100-80 % em 60 minutos de incubação, resultados semelhantes foram obtidos por Ayodeji et al (2017) com glucoamilase de *A. flavus*. Em pH 3,0 a enzima apresentou 50 % de atividade entre 10-60 minutos de incubação. Nos tempos superiores a 40 minutos em pH 2,0-8,0 foi demonstrada grande estabilidade para glucoamilase *exo-1* (SPINELLI et al, 1996).

Já a enzima imobilizada apresentou menos de 20 % de atividade em todos os valores de pH desde o primeiro tempo de incubação (10 minutos). Reteve 15 % de atividade nos pH 5,0 e 8,0, 12 % nos pH 3,0, 4,0 e 7,0 e, 7 % de atividade em pH 6 após 60 minutos de incubação. Em pH 7,0 houve queda de 60 e 85 % da atividade da enzima imobilizada e livre, respectivamente (TANRISEVEN & ÖLÇER, 2007).

5.6.3 Estabilidade à temperatura

Os testes de estabilidade à temperatura foram realizados entre 40 e 55 °C com a enzima livre (**Figura 22**) e a enzima imobilizada (**Figura 23**).

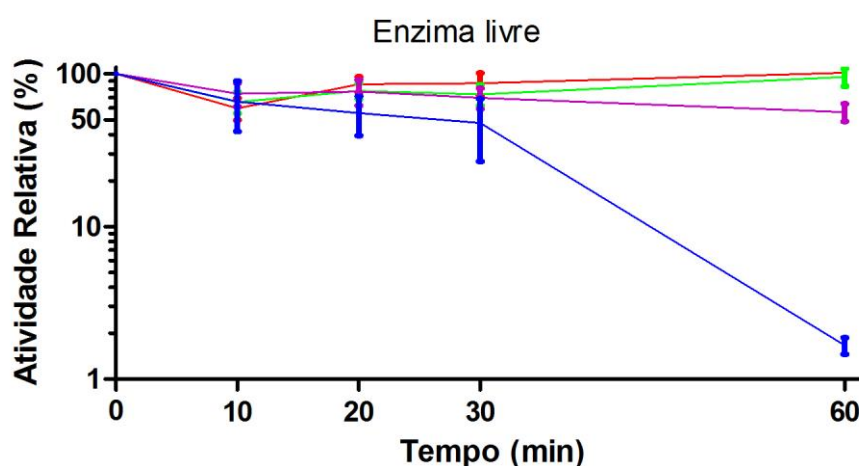


Figura 22. Efeito da temperatura na estabilidade da enzima livre de *N. crassa*; a atividade foi definida conforme item 3.3 em duplicata e o resultado foi apresentado em atividade relativa (%) \pm DP com relação ao tempo de incubação (10, 20, 30 e 60 minutos) da enzima livre nas temperaturas de 40°C — ; 45°C — ; 50°C — ; 55°C — .

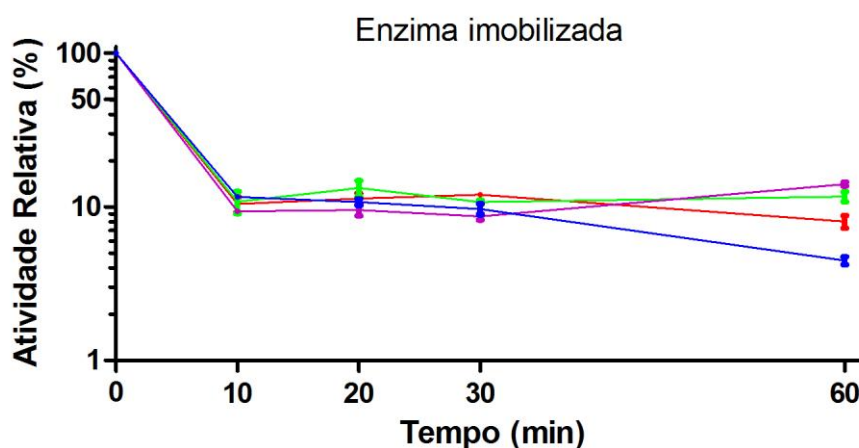


Figura 23. Efeito da temperatura na estabilidade da enzima imobilizada de *N. crassa*; a atividade foi definida conforme item 3.3 em duplicata e o resultado foi apresentado em atividade relativa (%) \pm DP com relação ao tempo de incubação (10, 20, 30 e 60 minutos) da enzima imobilizada nas temperaturas de 40°C —; 45°C —; 50°C —; 55°C —.

A enzima livre apresentou boa estabilidade às temperaturas de 40-45 °C após 60 minutos de incubação, mantendo 100 e 95 % da atividade, respectivamente. Reteve 56 % de sua atividade a 50 °C após 60 minutos de incubação e 48 % a 55 °C em 30 minutos, perdendo 98 % de atividade após 60 minutos. Já a enzima imobilizada apresentou queda na atividade a partir dos 10 minutos de incubação em todas as temperaturas testadas, mantendo 15, 12, 8 e 4,5 % de sua atividade a 50, 45, 40 e 55 °C, respectivamente após 60 minutos de incubação.

No estudo da glucoamilase de *Aspergillus flavus* os resultados da estabilidade à temperatura da enzima livre foram decrescentes nas temperaturas superiores a 50 °C. Em 30 e 40 °C a enzima apresentou grande estabilidade até 140 minutos de incubação (AYODEJI et al, 2017). Tarriseven e Ölçer (2007) também apresentaram resultados inferiores de estabilidade quando comparado a enzima de *A. niger* imobilizada com a livre, obtendo 20 e 60% de atividade, respectivamente, na temperatura de 80 °C.

Os valores reduzidos de atividade nos testes de estabilidade para a enzima imobilizada podem ser explicados pelo fato de haver o extravasamento da enzima durante o processo de fabricação das pérolas de alginato. Jadhav e Singhal (2014) aprimoraram seus resultados utilizando um polímero de carboidrato, o pululano,

complexado à enzima previamente a imobilização, aumentando os valores de estabilidade de 38 para 62 % de atividade em pH 3,0 e de 45 para 67 % em pH 10,0, quando comparados as pérolas simples com as pérolas complexadas.

Rahim et al (2013) aprimorou seus ciclos de reuso após a adição de Caulinita, um argilo-mineral composto por alumínio hidratado, no momento da produção das pérolas, o que permitiu o aprisionamento mais eficaz da enzima aumentando a atividade de 30 para 50 % após o sétimo ciclo de reuso, quando comparado as pérolas simples com as pérolas complexadas.

CONCLUSÃO

A enzima α -amilase produzida pelo *Aspergillus* sp. foi semi-purificada com apenas um método cromatográfico seguido de imobilização em matriz de alginato de sódio. Essa mostrou-se ser mais estável às variações de pH quando livre e demonstrou estabilidade à temperatura nas formas livre e imobilizada (Tabela 7). A técnica de imobilização também se mostrou eficaz quanto ao reuso, permitindo a recuperação da enzima com 40% de sua atividade no quinto ciclo. A enzima glucoamilase do fungo *N. crassa* Mutante *exo-1* foi semi-purificada utilizando duas técnicas. Foi imobilizada em matriz de alginato e garantiu a recuperação com retenção de 35 % de sua atividade no quinto ciclo de reuso. As facilidades de obtenção e disponibilidade das enzimas, imobilização em matriz de baixo custo e a possibilidade de recuperação e reutilização obtidas neste trabalho faz com que a enzima α -amilase produzida pelo fungo *Aspergillus* sp. seja adequada para uso posterior em aplicações industriais.

Tabela 7. Comparação entre as enzimas α -amilase e glucoamilase, livre e imobilizada

	α -amilase <i>Aspergillus</i> sp.		Glucoamilase <i>Neurospora crassa</i>	
	Livre	Imobilizada	Livre	Imobilizada
pH ótimo	4,5	4,5	4,5	5,5
Temperatura ótima	65 °C	60 °C	65 °C	55 °C
Estabilidade ao pH	100 % pH 4,0 – 8,0	50 % pH 4,0 – 8,0	100 % pH 6,0	< 20 % pH 6,0
Estabilidade a temperatura	100 % 55 °C	70 % 65 °C	56 % 50 °C	15 % 50 °C
Reuso	###	40 % 5º ciclo	###	35 % 5º ciclo

REFERÊNCIAS

- AYODEJI, A.O.; BAMIDELE, O.S.; KOLAWOLE, A.O.; AJELE, J.O. Physicochemical and Kinetic Properties of a High Salt Tolerant *Aspergillus flavus* Glucoamylase. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**. v. 9, p. 35-40, 2017.
- BAGHERI, A.; KHODARAHMI, R.; MOSTAFAIE, A. Purification and Biochemical Characterization of Glucoamilase from a Newly Isolated *Aspergillus niger*: relation to starch processing. **Food Chemistry**. v. 161, p. 270-278, 2014.
- BALKAN, B.; ERTAN, F. Production of α -Amylase from *Penicillium chrysogenum* Under Solid-State Fermentation by Using Some Agricultural By-Products. **Food Technology and Biotechnology**. v. 45, n. 4, p. 439-442, 2007.
- BANO, S.; QUADER, S.A.U.; AMAN, A.; SYED, M.N.; AZHAR, A. Purification and Characterization of Novel α -Amylase from *Bacillus subtilis* KIBGE HAS. **PharmSciTech**. v. 12, n. 1, March 2011.
- BARBOSA, N.A.A.; BONATO, M.A.; SAKOMURA, N.K.; DOURADO, L.R.B.; FERNANDES, J.B.K.; KAWAUCHI, I.M. Digestibilidade Ileal de Frangos de Corte Alimentados com Dietas Suplementadas com Enzimas Exógenas. **Comunicata Scientiae**. v. 5, n. 4, p. 361-369, 2014.
- BRITO, M.S.; OLIVEIRA, C.F.S.; SILVA, T.R.G.; LIMA, R.B.; MORAIS, S.N.; SILVA, J.H.V. Polissacarídeos Não Amiláceos na Nutrição de Monogástricos – Revisão. **Acta Veterinaria Brasilica**. v. 2, n. 4, p. 111-117, 2008.
- CAMPESTRINI, E.; SILVA, V.T.M.; APPELT, M.D. Utilização de Enzimas na Alimentação Animal. **Revista Eletrônica Nutritime**. v. 2, n. 6, p. 259-272, nov./dez. 2005.
- CAO, L. Immobilised enzymes: science or art? **Current Opinion in Chemical Biology**. v. 9, p. 217–226, 2005.

CARCIOFI, A.C.; PALAGIANO, C.; SÁ, F.C.; MARTINS, M.S.; GONÇALVES, K.N.V.; BAZOLLI, R.S.; SOUZA, D.F.; VASCONCELLOS, R.S. Amylase utilization for the extrusion of dog diets. **Animal Feed Science and Technology**. v. 177, p. 211-217, 2012.

CAVKA, A.; JÖNSSON, L.J. Comparison of the Growth of Filamentous Fungi and Yeasts in Lignocellulose-derived Media. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**. v. 3, p. 197-204, 2014.

CHEN, X.; DU, X.; CHEN, P.; GUO, L.; XU, Y.; ZHOU, X. Morphologies and Gelatinization Behaviours of High-amylose Maize Starches During Heat Treatment. **Carbohydrate Polymers**. v. 157, p. 637-642, 2017.

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**. Volume 2011, p. 1-8, 2011.

DALLA-VECHIA, R.; NASCIMENTO, M.G.; SOLDI, V. Aplicações Sintéticas de Lipases Imobilizadas em Polímeros. **Química Nova**. v. 27, n. 4, p. 623-630, 2004.

DEY, T.B.; BANERJEE, R. Purification, Biochemical Characterization and Application of α -Amylase Produced by *Aspergillus oryzae* IFO-30103. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**. v. 4, p. 83-90, 2015.

DING, C.; SUN, H.; REN, J.; QU, X. Immobilization of Enzyme on Chiral Polyelectrolyte Surface. **Analytica Chimica Acta**. v. 952, p. 88-95, 2017.

DJABALI, D.; BELHANECHÉ, N.; NADJEMI, B.; DULONG, V.; PICTON, L. Relationship Between Potato Starch Isolation methods and Kinetic Parameters of Hydrolysis by Free and Immobilised α -amylase on Alginate (from *Laminaria digitata* algae). **Journal of Food Composition and Analysis**. v. 22, p. 563-570, 2009.

FARIA, R.C. Métodos de Purificação de Proteína. In: MORAES, C.S.; JUNIOR, F.O.R.O.; MASSON, G.; REBELLO, K.M.; SANTOS L.O.; BASTOS, N.F.P. **Série em Biologia Celular e Molecular**: métodos experimentais no estudo de proteínas. Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz, 2013, p. 42-59.

FENGXIA, L.; MEI, L.; ZHAOXIN, L.; XIAOMEI, B.; HAIZHEN, Z.; YI, W. Purification and characterization of xylanase from *Aspergillus ficuum* AF-98. **Bioresource Technology**. v. 99, p. 5938-5941, 2008.

FERNANDES, L.P.; ULHOA, C.J.; ASQUIERI, E.R.; MONTEIRO, V.N. Produção de Amilases Pelo Fungo *Macrophomina phaseolina*. **Revista Eletrônica de Farmácia**. v.4, p. 43-51, 2007.

FERREIRA, V.F.; ROCHA, D.R.; SILVA, F.C. Potencialidades e oportunidades na química da sacarose e outros açúcares. **Química Nova**. v. 32, n. 3, p. 623-638, 2009.

GOMBOTZ, W.R.; WEE, S.F. Protein Release from Alginate Matrices. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 64, p. 195-205, 2012.

GUIMARÃES, L.H.S.; PEIXOTO-NOGUEIRA, S.C.; MICHELIN, M.; RIZZATTI, A.C.S.; SANDRIM, V.C.; ZANOELO, F.F.; AQUINO, A.C.M.M.; JUNIOR, A.B., POLIZELI, M.L.T.M. Screening of Filamentous Fungi for Production of Enzymes of Biotechnology Interest. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 37, p. 474-480, 2006.

GUPTA, R.; GIGRAS, P. MOHAPATRA, H.; GOSWAMI, V.K.; CHAUHAN, B. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. **Process Biochemistry**. v. 38, p. 1599-1616, 2003.

JADHAV, S.B.; SINGHAL, R.S. Pullulan-complexed α -Amylase and Glucosidade in Alginate Beads: enhanced entrapment and stability. **Carbohydrate Polymers**. v. 105, p. 49-56, 2014.

KHOO, S.L.; AMIRUL, A.-A.; KAMARUZAMAN, M.; NAZALAN, N.; AZIZAN, M.N. Purification and Characterization of α -Amilase from *Aspergillus flavus*. **Folia Microbiologica**. v. 39, n. 5, p. 392-398, 1994.

KIM, J.H.; PARK, S.; KIM, H.; KIM, H.J.; YANG, Y.; KIM, Y.H.; JUNG, S.; KAN, E.; LEE, S.H. Alginate/bacterial Cellulose Nanocomposite Beads Prepared Using *Gluconacetobacter xylinus* and their Application in Lipase Immobilization. **Carbohydrate Polymers**. v. 157, p. 137-145, 2017.

KONSOULA, Z.; LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES, M. Thermostable α -Amylase Production by *Bacillus subtilis* Entrapped in Calcium Alginate Gel Capsules. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 39, p. 690-696, 2006.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**. v. 227, p. 680-685, 1970.

LEE, JW.; PARK, JY.; KWON, M.; CHOI, IG. Purification and characterization of a thermostable xylanase from the brown-rot fungus *Laetiporus sulphureus*. **Journal of Bioscience Bioengineering**. v.107, p. 33-37, 2009.

LINKE, D.; BERGER, R.G. Foaming of Proteins: new prospects for enzyme purification processes. **Journal of Biotechnology**. v. 152, p. 125-131, 2011.

LOWRY, H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDAL, R.J. Protein Measurement With the Folin Phenol Reagent. **Journal of Biological Chemistry**. v. 193, p. 267-275, 1951.

MACIEL, G.M. **Desenvolvimento de bioprocesso para produção de xilanases por fermentação no estado sólido utilizando bagaço de cana-de-açúcar e farelo de soja**. 2006. 132 f. Dissertação (Mestrado em Processos Biotecnológicos) - Setor de Tecnologia da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

MAO, Y.; YIN, Y.; ZHANG, L.; ALIAS, S.A.; GAO, B.; WEI, D. Development of a Novel *Aspergillus* Uracil Deficient Expression System and its Application in

Expressing a Cold-adapted α -amylase Gene from Antarctic Fungi *Geomyces pannorum*. **Process Biochemistry**. v. 50, p. 1581-1590, 2015.

MATEO, C.; PALOMO, J.M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUIBAN, J.M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 40, p. 1451-1463, 2007.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugars. **Analytical Chemistry**. v. 31, p. 426-428, 1959.

MORAES, C.S.; SANTOS, L.O. Enzimologia: ensaios enzimáticos. In: JUNIOR, F.O.R.O.; MASSON, G.; REBELLO, K.M.; BASTOS, N.F.P.; FARIA, R.C. **Série em Biologia Celular e Molecular**: métodos experimentais no estudo de proteínas. Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz, 2013, p. 24-41.

MURAKOSHI, Y.; MAKITA, T.; KATO, M.; KOBAYASHI, T. Comparison and Characterization of α -amylase Inducers in *Aspergillus nidulans* Based on Nuclear Localization of AmyR. **Applied Microbiology Biotechnology**. v. 94, p. 1629-1635, 2012.

MUSSATTO, S.I.; FERNANDES, M.; MILAGRES, A.M.F. Enzimas: poderosa ferramenta na indústria. **Biotecnologia Ciência Hoje**. Outubro, p.28-33, 2007.

NASCIMENTO, K.B.M.; MARTINS, A.G.R.; TAKAKI, G.M.C.; SILVA, C.A.A.; OKADA, K. Utilização de Resíduos Agroindustriais para Produção de Tanase por *Aspergillus* sp. Isolado do Solo da Caatinga de Pernambuco Brasil. **E-xacta**. Belo Horizonte, v. 7 n. 1, p. 95-103, 2014.

NETO, B.A.M.; BARBOSA, A.A.; LEITE, C.X.S.; ALMEIDA, P.F.; BOMONO, R.C.F.; PONTES, K.V. Chemical Composition and Functional Properties of Starch from the Pejibaye Fruit (*Bactris gasepae* Kunth). **Acta Scientiarum Technology**. Maringá, v. 37, n. 1, p. 105-110, jan./mar. 2015.

OLIVEIRA, G.R. **Digestibilidade de nutrientes em ração com complexo enzimático para tilápia-do-nylo (*Oreochromis niloticus*)**. 2006. 90 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Nutrição de Monogástricos. Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, 2006.

ORLANDELLI, R.C.; SPECIAN, V.; FELBER, A.C.; PAMPFILE, J.A. Enzimas de Interesse Industrial: produção por fungos e aplicações. **SaBios: Revista de Saúde e Biologia**. v. 7, n. 3, p. 97-109, set./dez. 2012.

PARIZA, M.W.; COOK, M. Determining the safety of enzymes used in animal feed. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**. v. 56, p. 332-342, 2010.

POLIZELI, M.L.T.M.; RAI, M. **Fungal Enzymes**. CRC Press Taylor & Francis Group: Boca Raton, FL. 2013, 454p.

RAGHU, H.S.; RAJESHWARA, N.A. Immobilization of α -Amylase (1,4- α -D-Glucanglucanohydralase) by Calcium Alginate Encapsulation. **International Food Research Journal**. v. 22, n. 2, p. 869-871, 2015.

RAHIM, S.N.A.; SULAIMAN, A.; HAMZAH, F.; HAMID, K.H.K.; RODHI, M.N.M.; MUSA, M.; EDAMA, N.A. Enzymes Encapsulation Within Calcium Alginate-clay Beads: characterization and application for cassava slurry saccharification. **Procedia Engineering**. v. 68, p. 411-417, 2013.

RAMACHANDRAN, S.; PATEL, A.K.; NAMPOOTHIRI, K.M.; CHANDRAN, S.; SZAKACS, G.; SOCCOL, C.R.; PANDEY, A. Alpha Amylase from a Fungal Culture Grown on Oil Cakes and Its Properties. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v. 47, n. 2, p. 309-317, June 2004.

RIZZATTI, A.C.S.; JORGE, J.A.; TERENCEZI, H.F.; RECHIA, C.G.V.; POLIZELI, M.L.T.M. Purification and properties of a thermostable extracellular b-D- xylosidase produced by thermotolerant *Aspergillus phoenicus*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. v. 259, p.156-160, 2001.

RODRIGUES, E.F.; FICANHA, A.M.M.; DALLAGO, R.M.; TREICHEL, H.; REINEHR, C.O.; MACHADO, T.P.; NUNES, G.B.; COLLA, L.M. Production and Purification of Amylolytic Enzymes for Saccharification Microalgal Biomass. **Bioresource Technology**. v. 225, p. 134-141, 2017.

SALEEM, A.; EBRAHIM, M.K.H. Production of Amylase by Fungi Isolated from Seeds Colected in Almadinah Almunawwarah, Saudi Arabia. **Journal of Taibah University for Science**. v. 8, p. 90-97, 2014.

SHARMA, A.; SATYANARAYANA, T. Microbial Acid-stable α -amylases: characteristics, genetic engineering and applications. **Process Biochemistry**. v. 48, p. 201-211, 2013.

SOUZA, K.V.; PERALTA-ZAMONA, P.; ZAWADZKI, S.F. Imobilização de Ferro (II) em Matriz de Alginato e sua Utilização na Degradação de Corantes Têxteis por Processos Fenton. **Química Nova**. v. 31, n. 5, p. 1145-1149, 2008.

SPINELLI, L.B.B.; POLIZELI, M.L.T.M.; TERENCEZI, H.F.; JORGE, J.A. Biochemical Characterization of Glucoamylase from the Hyperproducer *exo-1* Mutant Strain of *Neurospora crassa*. **FEMS Microbiology Letters**. v. 138, p. 173-177, 1996.

STROPARO, E.C.; BEITEL, S.M.; RESENDE, J.T.V.; KNOB, A. Seleção de Fungos Filamentosos e de Resíduos Agroindustriais para a Produção de Enzimas de Interesse Biotecnológico. **Semina: Ciências Agrárias**. Londrina, v. 33, n. 6, p. 2267-2278, nov./dez. 2012.

SYED, F.; ALI, K.; ASAD, M.J.; FRAZ, M.G.; KHAN, Z.; IMRAN, M.; TAJ, R.; AHMAD, A. Preparation and Characterization of a Green Nano-support for the Covalent Immobilization of Glucoamylase from *Neurospora sitophila*. **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology**. v. 162, p. 309-317, 2016.

TALEKAR, S.; CHAVARE, S. Optimization of Immobilization of α -Amylase in Alginate Gel and its Comparative Biochemical Studies With Free α -Amylase. **Recent Research in Science and Technology**. v. 4, n. 2, p. 01-05, 2012.

TANRISEVEN, A.; ÖLÇER, Z. A Novel Method for the Immobilization of Glucoamylase Onto Polyglutaraldehyde-activated Gelatin. **Biochemical Engineering Journal**. v. 39, p. 430-434, 2008.

TAVANO, O.L.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GOULART, A.J.; MONTI, R. Optimization of the immobilization of sweet potato amylase using glutaraldehyde-agarose support. Characterization of the immobilized enzyme. **Process Biochemistry**. v. 48, p. 1054-1058, 2013.

TAVANO, O.L. **Imobilização de Amilase de *Neurospora crassa* (Mutante EXO-1) e Produção de Derivados Ativos Estabilizados**. 2006. 101 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Química. Universidade Estadual de São Paulo. Araraquara, 2006.

TAVANO, O.L.; PESSELA, B.C.C; GOULART, A.J.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, J.M.; MONTI, R. Stabilization of an Amylase from *Neurospora crassa* by Immobilization on Highly Activated Supports. **Food Biotechnology**. v. 22, p. 262-275, 2008.

USTINOV, B.B.; GUSAKOV, A.V.; ANTONOV, A.I.; SINITSYN, A.P. Comparison of properties and mode of action of six secreted xylanases from *Chrysosporium lucknowense*. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 43, p. 56-65, 2008.

VOGEL, H.J. A Convenient Growth Medium for *Neurospora* (Medium N.). **Microbial Genetics Bulletin**. v. 13, p. 42-43, 1956.