



PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO PARCIAL E CARACTERIZAÇÃO DA AMILASE DE *Epicoccum nigrum*

Damaris Batistão Martim (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Fabiane Cristina dos Santos (Doutoranda/PBC), Ione Parra Barbosa-Tessmann (Orientadora), e-mail: ipbtessmann@uem.br.

Universidade Estadual de Maringá/Centro de Ciências
Biológicas/Departamento de Bioquímica/Maringá, PR.

Ciências Biológicas/Bioquímica

Palavras-chave: Endoglicanase, Fungo, Amido.

Resumo:

O amido é a principal molécula de reserva de muitos grãos. Indústrias de processamento do amido usam a hidrólise enzimática, com uso de amilases, para obtenção de produtos. A produção de amilase por *Epicoccum nigrum* é conhecida, mas a enzima ainda não foi caracterizada. Neste trabalho, a produção de amilase por *E. nigrum* foi otimizada e a enzima produzida foi parcialmente purificada e caracterizada.

Introdução

Para uso industrial, o amido, que não tem sabor, necessita ser degradado em produtos de sabor adocicado. A hidrólise se dá por desdobramento total das moléculas de amilose ou amilopectina em dextrinas, maltose e glicose.

As amilases podem ser divididas em duas classes, conforme o mecanismo de ação. As endoamilases catalisam a hidrólise das ligações glicosídicas do tipo α -1,4, no interior da molécula de amido, enquanto que as exoamilases hidrolisam ligações glicosídicas a partir da extremidade não redutora.

O *Epicoccum nigrum* é um fungo saprófita, que produz um pigmento usado como antifúngico. Não há relatos de estudos de produção ou de caracterização da amilase de *E. nigrum*. Portanto, este trabalho teve como objetivos estudar a produção e caracterizar a amilase deste fungo.





Materiais e Métodos

Microrganismo e condições de cultivo para a produção da enzima

O isolado de *E. nigrum* utilizado foi anteriormente bioprospectado de sementes de milho apresentando sinais de podridão (ABE et al., 2015). O seguinte meio de cultivo foi inicialmente utilizado: extrato de levedura 3 g/L, peptona 5 g/L, NaH_2PO_4 21 mmol/L, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 29 mmol/L, pH 7,0, e amido solúvel 2 g/L. Frascos de 125 mL contendo 25 mL do meio foram esterilizados em autoclave e inoculados com fragmentos de 1 cm^3 de cultura em BDA sólido. Após incubação estacionária por 5 dias, a 25 °C, as culturas foram homogeneizadas em malha de inox e passagem por agulha (16G) e um mL do homogeneizado foi utilizado como inóculo (4% v/v) para novos frascos de 125 mL contendo 25 mL do mesmo meio. Estes frascos foram incubados por 3 dias, sob agitação a 100 rpm, a 25 °C. Após, as culturas foram filtradas em papel de filtro e a atividade enzimática foi avaliada no filtrado pela descoloração do complexo amido-iodo (PALANIVELU, 2001). O peso do micélio seco a 50 °C foi utilizado como medida de crescimento do fungo.

Otimização das condições de cultivo

Os seguintes parâmetros foram avaliados: agitação, tempo e temperatura de cultivo, pH inicial do meio, tamanho do inóculo, presença de íons e fontes de carbono do meio, além da variação da concentração da fonte de carbono e do íon indutor. Os resultados apresentados são a média e o desvio padrão dos dados obtidos em três frascos de cultivo.

Purificação parcial da enzima

Proteínas de 250 mL de filtrado foram precipitadas com sulfato de amônio a 90%, coletadas por centrifugação (21.000g, 5 min), dialisadas em tampão fosfato 50 mmol/L, pH 7,0 e utilizadas como fonte da enzima.

Parâmetros cinéticos

Os parâmetros: temperatura ótima, estabilidade térmica, ativadores e inibidores, especificidade, K_M e $V_{m\text{áx}}$ foram obtidos com uso da reação enzimática estabelecida e com mudanças nas condições de ensaio.





Resultados e Discussão

A incubação estacionária para o pré-inóculo, e sob agitação de 100 rpm, a 25 °C, para o segundo cultivo, foi melhor para a produção da enzima e para o crescimento do fungo. A curva de crescimento obtida para o *E. nigrum* (Figura 1A) mostra que o melhor tempo de cultivo para a produção da enzima foi de 72h (3 dias). Um pH inicial do meio de cultivo de 7,0 foi melhor para a produção da enzima (Figura 1B) e um inóculo 8% (v/v) resultou em uma maior uniformidade de produção da enzima (Figura 1C)

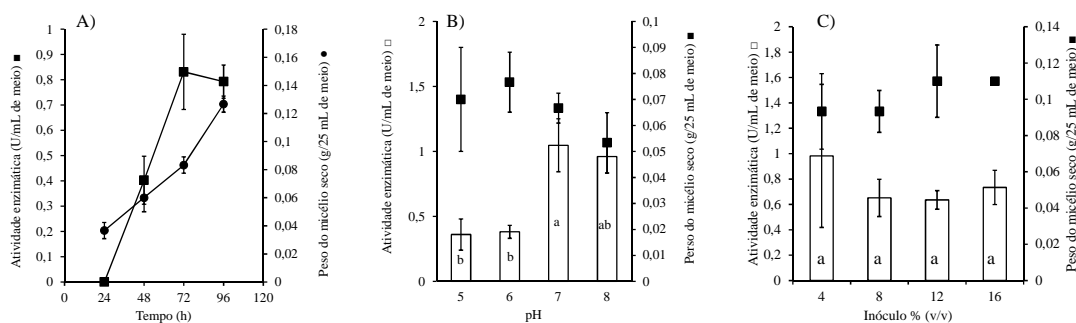


Figura 1 – Curva de crescimento do *E. nigrum* e produção da amilase (A). Influência do pH inicial do meio de cultura (B) e do tamanho do inóculo (C) para a produção da enzima. Médias seguidas de letras diferentes são diferentes pelo Teste de Tukey a 1% de significância.

O amido (0,2%, w/v) foi a melhor fonte de carbono para a produção da enzima (Figura 2A e 2B). A presença, no meio de cultivo, de Tween 80 (0,2 %, v/v), CuSO_4 e MgSO_4 (ambos a 10 $\mu\text{mol/L}$) inibiu tanto o crescimento quanto a produção da enzima. A adição de KCl (10 $\mu\text{mol/L}$ ou 20 $\mu\text{mol/L}$) ao meio de cultivo aumentou em 30% a produção da enzima (dados não mostrados). O K_M e a $V_{m\text{áx}}$ encontrados (Figura 3A) são 1,74 mg/mL e 1,53 mg/mL.min⁻¹, respectivamente. A temperatura ótima da enzima é de 50 °C (Figura 3B) e o pH ótimo é 6,0 (Figura 3C). A temperatura em que a enzima perde 50 % da sua atividade (T_{50}), calculada da curva polinomial obtida, é 46,25 °C (Figura 3D). Cobalto e cálcio atuaram como ativadores e SDS e Tween 80 como inibidores da enzima (dados não mostrados).

Conclusões

A nova amilase caracterizada representa uma alternativa para a hidrólise enzimática do amido.



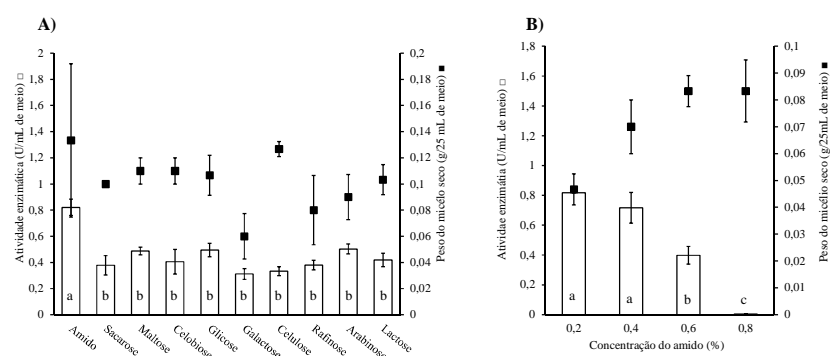


Figura 2 – A) Fontes de carbono para produção da amilase. B) Variação na concentração do amido. Diferentes letras indicam significância a 1% pelo Teste de Tukey.

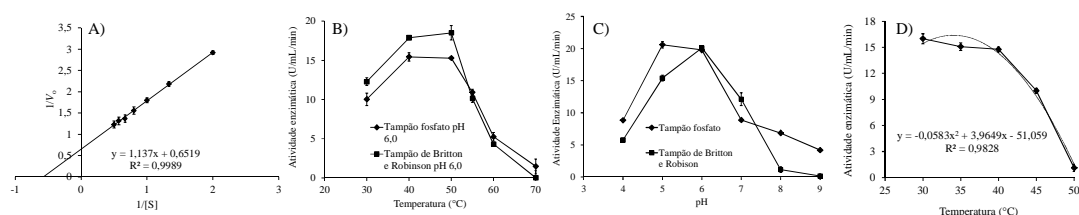


Figura 3 – A) Gráfico duplo-recíproco. B) Temperatura ótima. C) pH ótimo. D) Estabilidade térmica. Os dados representam médias e desvios padrão de triplicatas.

Agradecimentos

Agradecemos ao CNPq e à CAPES pelas bolsas concedidas.

Referências

ABE, C. A. L.; FARIA, C. B.; CASTRO, F. F.; SOUZA, S. R.; SANTOS, F. C.; SILVA, C. N.; TESSMANN, D. J.; BARBOSA-TESSMANN, I. P. Fungi isolated from maize (*Zea mays* L.) grains and production of associated enzyme activities. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 16, p. 15328-15346, 2015.

PALANIVELU, P. **Analytical biochemistry and separation**. Techniques. Madurai, India: Kalamani Printers, 2001.

