

PRODUÇÃO DE AMILOGLUCOSIDASE UTILIZANDO COMO SUBSTRATO A PALMA FORRAGEIRA¹

RENATA SAMPAIO MAFRA DE SANTANA², ZANON SANTANA GONÇALVES², RENATA CRISTINA FERREIRA BONOMO³, MARCELO FRANCO^{2*}

RESUMO – O presente trabalho teve como objetivo avaliar a utilização da palma forrageira como principal substrato para a produção de amiloglucosidase, através da fermentação em estado sólido com o auxílio do fungo filamentososo *Aspergillus niger*. Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Resíduos Agroindustriais, na Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB. A palma foi desidratada até atingir aproximadamente 2% de umidade. As variáveis estudadas no processo fermentativo foram, a atividade de água (0,891, 0,964, 0,976 e 0,983) e o tempo de fermentação (24 h, 48 h, 72 h, 96 h e 120 h). Os resultados demonstraram a elevação na produção enzimática até o terceiro dia de fermentação, independentemente da atividade de água em todos os ensaios, após esse tempo de fermentação, foi observada a redução da atividade enzimática, a maior atividade observada foi de 60,32 U/g em 72 horas e com a atividade de água de 0,891. Durante os processos fermentativos o fungo sintetizou e excretou a enzima sem a necessidade de qualquer outro indutor além da palma forrageira e água, demonstrando a viabilidade de utilização da palma como matéria-prima para bioprocessos.

Palavras-chave: *Opuntia ficus indica*. *Aspergillus niger*. Tempo de fermentação. Atividade de água. Fermentação em estado sólido.

PRODUCTION OF AMYLOGUCOSIDASE USING CACTUS PEAR AS SUBSTRATE

ABSTRACT - This paper aimed to evaluate the use of cactus pear as the main substrate for the production of amiloglucosidase by solid state fermentation with the aid of the filamentous fungus *Aspergillus niger*. The experiments were conducted at the Laboratory of Agro-industrial wastes at the State University of Southwest Bahia - UESB. The cactus pear was dried up to about 2% moisture. The variables in the fermentation process were water activity (0.891, 0.964, 0.976 and 0.983) and fermentation time (24 h, 48 h, 72 h, 96 h and 120 h). The results showed high enzyme production by the third day of fermentation, irrespective of water activity in all trials, after the fermentation time reduction of enzyme activity was observed, with the highest activity was 60.32 U/g in 72 hours and the water activity of 0.891. During the fermentation process the fungus synthesized and excreted the enzyme without the need for any other inducer addition to forage cactus and water, thus demonstrating the viability of using the palm as raw materials for bioprocesses.

Keywords: *Opuntia ficus indica*. *Aspergillus niger*. Fermentation time. Water activity. Solid state fermentation.

*Autor para correspondência.

¹Recebido para publicação em 03/01/2011; aceito em 27/08/2011.

Trabalho de dissertação de mestrado do curso de pós-graduação em engenharia de alimentos do primeiro autor.

²Departamento de Estudos Básicos e Instrumentais, UESB, Caixa Postal 179, 45700-000, Itapetinga - BA; renatasms@zipmail.com.br; nonaz_sg@hotmail.com; marcelofranco@pq.cnpq.br

³Departamento de Tecnologia Rural e Aplicada, UESB, Caixa Postal 179, 45700-000, Itapetinga - BA; bonomorf@yahoo.com.br

INTRODUÇÃO

A zona fisiográfica do semiárido da Bahia ocupa 360 mil km², área que corresponde a 64% respectivamente, do território baiano, onde residem 48% da população estadual. O semiárido é caracterizado por solos rasos, pedregosos ou arenosos e pouca matéria orgânica. As precipitações pluviométricas são irregulares e concentradas no verão. A cobertura vegetal é constituída por plantas que suportam longos períodos de estiagem. Dentre estas, a palma forrageira tem sido utilizada como forragem (BLAMONT, 2002; CHIACCIO et al., 2006; GUEDES et al., 2009; SOUSA et al., 2009). Além dessa aplicação, a palma pode ser utilizada como matéria-prima para bioprocessos, visando à produção de compostos orgânicos como as enzimas (ARAÚJO et al., 2007; ARAÚJO et al., 2008; ARAÚJO et al., 2009; GHORAI et al., 2009, PANDEY et al., 2005; SANTOS et al., 2011).

As enzimas amilolíticas se destacam pela sua utilização na produção de pães melhorando a cor e a maciez do produto final, na indústria de celulose são aplicadas no acabamento final do papel, são utilizadas na produção de cervejas claras, entre outras (LAUFENBERG et al., 2003; PANDEY, 2003; GUSAKOV et al., 2007; KUMAR et al., 2008; SOCOL et al., 2010). Essas enzimas catalisam as ligações α -1-4 glicosídicas de polissacarídeos e são classificadas em α -amilase, β -amilase e amiloglicosidase. A α -amilase quebra ligações α (1,4) dos polissacarídeos que possuem três ou mais unidades de D-glucose em união α -1,4. A β -amilase hidrolisa as ligações glicosídicas α -1,4 de polissacarídeos a partir da extremidade não-redutora sobre a penúltima ligação óxido, separando duas unidades de glicose na forma de β -maltose, por uma inversão. Por fim, a amiloglicosidase, é uma enzima extracelular que rompe as ligações α -1,4 e α -1,6 do amido a partir da extremidade não redutora até glicose (PANDEY et al., 2005). A produção de enzimas amilolíticas ocorre através da fermentação em estado sólido (FES) e os fungos filamentosos são aplicados (HAG et al., 2003). Entretanto, sua utilização é frequentemente limitada pelos custos dos substratos utilizados para o crescimento do microrganismo (JOO; CHAG, 2005).

Os fungos do gênero *Aspergillus* são aplicados na produção de ácido cítrico, biosurfactantes e enzimas (CASTILHO et al., 2000; COUTO; SANROMAN, 2006; GALEMBECK et al., 2009; GRAMINHA et al., 2008; HAG et al., 2003; SINGHANI et al., 2009). A FES é compreendida como o crescimento de uma cultura de microrganismos sobre partículas sólidas. O conteúdo de líquido deve assegurar o crescimento e o metabolismo celular e não exceder à máxima capacidade de ligação da água com a matriz sólida (GERVAIS; MOLIN, 2003; HOLKER et al., 2004; RAGHAVARAO et al., 2003).

Dentre os parâmetros que afetam a FES a

atividade de água (Aw) é o principal fator, devido à interação entre a água e a fase sólida. O teor de água adequada facilita a dissolução de nutrientes, de oxigênio e a dissipação de calor. A elevada atividade de água resulta na diminuição da porosidade do substrato, dificultando a penetração de oxigênio, enquanto que os baixos valores de Aw reduzem a acessibilidade dos nutrientes (GERVAIS; MOLIN, 2003; HOLKER et al., 2004; RAGHAVARAO et al., 2003).

O objetivo deste trabalho foi utilizar a palma forrageira (*Opuntia ficus indica* Mill) como matéria-prima para a produção de amiloglicosidase por fermentação em estado sólido com o auxílio do fungo filamentoso *Aspergillus niger*, as variáveis otimizadas foram a atividade de água e o tempo de fermentação.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas cepas de *Aspergillus niger* localizadas no LABRA (Laboratório de Resíduos Agroindustriais), na Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – Campus de Itapetinga. A esporulação foi realizada em Erlenmeyer sobre PDA (*Potato Dextrose Agar*-Difco) durante sete dias a 35 °C em estufa bacteriológica (SOLAB modelo SL 101), a retirada dos esporos foi efetuada com a adição de pérolas de vidro e água destilada estéril ao meio, a contagem dos esporos foi realizada em câmara de Neubauer, com auxílio do microscópio binocular (BIOVAL L1000).

A palma gigante foi coletada no campo Agrostológico da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB) – Campus de Itapetinga. Os cladódios da palma forrageira foram extraídos nas articulações, utilizando apenas aquelas em bom estado fitossanitário, a partir das terciárias, conforme a colheita realizada tradicionalmente na região. O processo de secagem foi efetuado na estufa com circulação de ar forçada (SOLAB) a 70 °C até atingir umidade de 2%, após esse procedimento, a palma foi triturada em moinho de facas tipo Wiley (20 mesh).

As fermentações foram conduzidas em Erlenmeyer de 250 mL contendo 10g do substrato, em seguida foram adicionados diferentes volumes de água estéril até a seguinte atividade de água (0,891, 0,964, 0,976 e 0,983), sendo cada um inoculado com 10⁷ esporos/grama de substrato. As incubações ocorreram em diferentes tempos de fermentação (24 h, 48 h, 72 h, 96 h e 120 h), todos a 35 °C em estufa bacteriológica. Finalizado o tempo de fermentação foram adicionados 100 mL de água deionizada estéril, essa suspensão permaneceu sob agitação orbital por 30 minutos (QUIMIS-Q816M20) a 200 rpm. Posteriormente a remoção dos sólidos foi efetuada por prensagem mecânica e o líquido homogêneo centrifugado a 3000 rpm por 15 minutos (Centribio modelo 80-2B) esse sobrenadante foi utilizado denominado extrato enzimático bruto (EEB).

A amiloglucosidase foi quantificada através da adição de 1 mL de uma solução contendo 1% de amido solúvel (Sigma-Aldrich) em tampão fosfato 0,5 M e pH 7,0 (Vetec) e 1 mL do EEB em tubos de ensaio esses foram incubados por 30 minutos a 37^o C em incubadora de bancada com agitação orbitalar (Quimis). Os açúcares redutores produzidos nessa incubação foram quantificados pela técnica de Miller (1959). A unidade enzimática corresponde à quantidade de enzima capaz de liberar 0,1 mg/mL de açúcares redutores nas condições do método proposto.

Foram feitos quatro experimentos diferentes, onde cada um foi composto por cinco tratamentos (24 h, 48 h, 72 h, 96 h e 120 h). Os dados foram submetidos à análise de variância da regressão. Os parâmetros dos métodos polinomiais foram testados pelo teste t, considerando 10% de probabilidade para erro tipo I.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Normalmente a atividade enzimática é o parâmetro mais difundido entre os pesquisadores, a essa é atribuída a unidade internacional (U), definida como a quantidade que catalisa a transformação de 1µmol de substrato por minuto em condições pré-definidas.

A variação da atividade enzimática em função do tempo de fermentação está demonstrada na Figu-

ra 1. Dentre todos os tratamentos, a maior atividade enzimática (60,32 U/g) foi observada no tempo de 72h e 0,891 de atividade de água, e a menor atividade enzimática (20,59 U/g), em 24h e 0,983 de atividade de água. Nos quatro diferentes experimentos foi observado um incremento na atividade enzimática até o terceiro dia de fermentação, após esse tempo de fermentação ocorreu a diminuição das atividades enzimáticas em todos os tratamentos. Esse comportamento independe da atividade de água do sistema fermentado. A redução na atividade enzimática após 72 horas de fermentação pode ser explicada devido ao esgotamento de nutrientes ou por acúmulo de produtos inibidores da síntese enzimática, geralmente as enzimas apresentam mecanismo de controle que são estimulados ou inibidos por produtos do meio (WHITAKER, 1994).

Biazus et al. (2006), observou que a produção de enzima à princípio é lenta, acelerando posteriormente até alcançar seu valor máximo, apresentando a melhor atividade enzimática também no terceiro dia de fermentação. A partir desse ponto foi observada a redução da sua atividade enzimática.

Na Tabela 1 se encontram os resultados para os modelos polinomiais de cada atividade enzimática bem como os coeficientes de variação para cada equação. Os dados indicam que todos os modelos são estatisticamente significativos (P < 0,1).

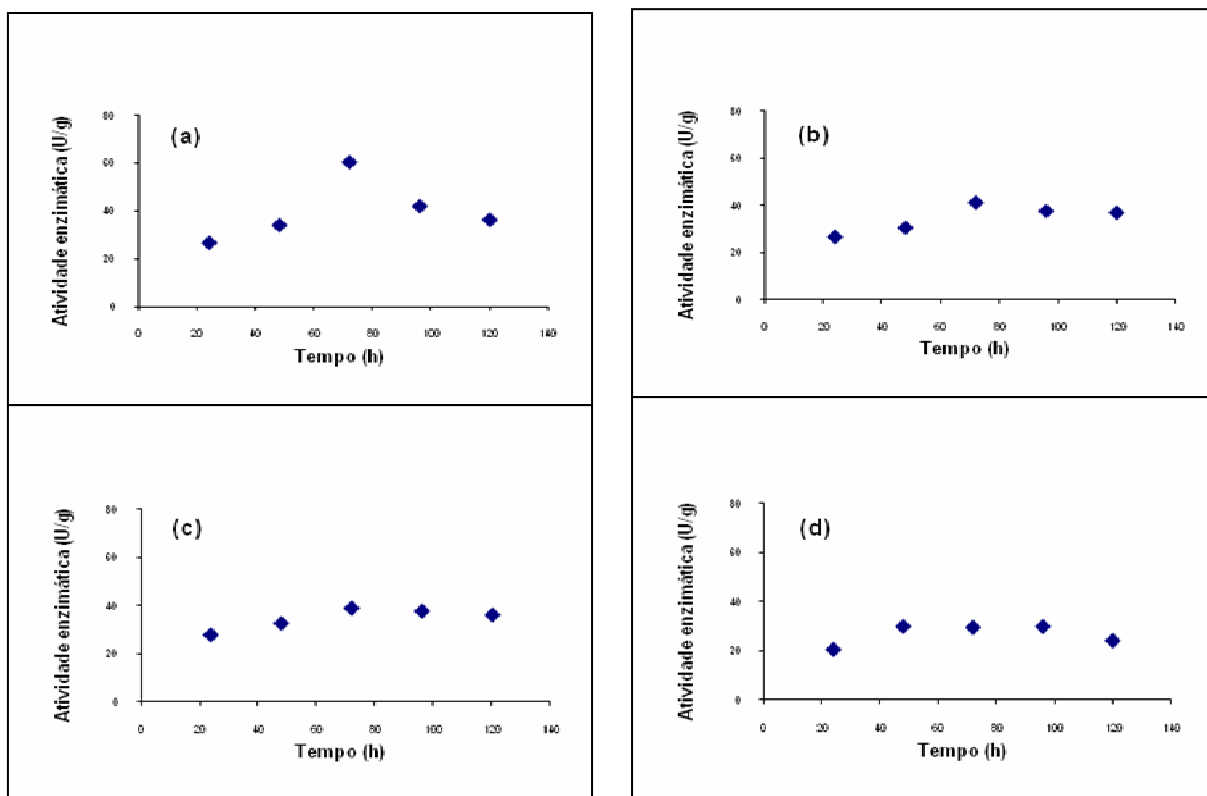


Figura 1. Efeito da atividade de água (Aw) e do tempo de fermentação sobre a atividade enzimática (U/g). (a) Aw = 0,891; (b) Aw = 0,964; (c) Aw = 0,976 e (d) Aw = 0,983.

Tabela 1. Análise de variância a 10% de probabilidade.

Atividade de água	Equação quadrática	R ²	Coefficiente de variação
0,891	$Y = -0,0088x^2 + 1,3729x - 3,484$	0,670159	2,03
0,964	$Y = -0,0029x^2 + 0,542x + 14,236$	0,836568	5,12
0,976	$Y = -0,0025x^2 + 0,4578x + 17,71$	0,950259	19,10
0,983	$Y = -0,0048x^2 + 0,7211x + 6,166$	0,973922	37,35

Tabela 2. Percentual de redução da atividade de enzima em função da atividade de água.

Atividade de água (Aw)	Redução da atividade enzimática (%)
0,891	-
0,964	31%
0,976	35%
0,983	43%

Nas fermentações com 0,891 de Aw, independente do tempo, foram observadas as maiores atividades enzimáticas, sendo a maior atividade de amiloglucosidase observada em 72 horas de fermentação, fato que pode ser explicado pela maior afinidade do fungo por baixos valores de umidade. Palácios-Cabrera et al. (2005) relatam que o crescimento de *Aspergillus niger* não é afetado por baixas Aw. Nesse trabalho foi observado que a elevação da Aw reduz a atividade enzimática, sendo que em 0,983 de Aw, ocorreu maior redução, cerca de 43% na atividade enzimática quando comparado ao ponto ótimo (Tabela 2).

A produção de amiloglucosidase foi diretamente afetada pelo tempo de fermentação e pela atividade de água. Biazus et al. (2006), trabalhando com malte de milho, observou que a produção de enzima é lenta e ao longo do tempo ocorre a sua aceleração até o valor máximo no quarto dia de fermentação, a partir desse ponto a concentração de produtos gerados pelas enzimas faz com que parte destas, seja inibida e sua atividade reduzida a um valor constante, esse comportamento também foi observado no presente trabalho. Moreira et al. (1999) relatam que a máxima atividade (144U/mg) na produção de amiloglucosidase de *Aspergillus tamaritii* ocorreu após 120 horas de fermentação e que um decréscimo na produção foi observado quando a fase estacionária do microrganismo foi atingida. Kunamneni et al. (2005) encontraram maior atividade (534 U/g) de amiloglucosidase de *Thermomyces lanuginosus* em 120 horas de fermentação. Omemu et al. (2005) obtiveram maior rendimento (806 U/mL) de hidrólise do amido de mandioca por *A. niger* após 72 horas de fermentação, concordando com Alva et al. (2007), que também relataram uma maior atividade (16,42 U/mg) amilolítica de *Aspergillus*, sp JGL 12 em 144 horas de fermentação. O decréscimo na atividade da enzima com o aumento do tempo de incubação pode

ser devido à produção de metabolitos secundários, além do esgotamento de nutrientes, inibindo o crescimento do fungo e a formação da enzima (GUPTA et al., 2010; SHAFIQUE et al., 2009).

Neste trabalho foram determinados os valores ótimos de atividade de água e do tempo de fermentação para a otimização da produção da amiloglucosidase através da fermentação em estado sólido com auxílio do fungo filamentosso *Aspergillus niger* utilizando a palma forrageira como substrato para bioprocessos.

CONCLUSÕES

Palma forrageira pode ser utilizada como meio de cultura para o crescimento do fungo filamentosso *Aspergillus niger*, sem a necessidade de qualquer outro nutriente;

A otimização na produção da enzima amiloglucosidase ocorreu em 72 horas de fermentação, a 0,891 de atividade de água e a 35 °C;

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) e ao Banco do Nordeste Brasileiro (BNB) pelo apoio financeiro concedido.

REFERÊNCIAS

ALVA, S. et al. Production and characterization of fungal amylase enzyme isolated from *Aspergillus* sp. JGI 12 in solid state culture. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, n.5, p. 576-581, 2007.

- ARAÚJO, L. F. et al. Bioconversão da palma forrageira alternativa alimentar para pequenos ruminantes. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, João Pessoa, v. 1, n. 1, p. 59-61, 2007.
- ARAÚJO, L. F. et al. Enriquecimento protéico da palma forrageira com *Saccharomyces cerevisiae* para alimentação de ruminantes. **Arquivos Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 60, n. 2, p. 401-407, 2008.
- ARAÚJO, L. F. et al. Bioconversão do mandacaru sem espinhos (*Cereus jamacaru*) em alimento alternativo para Ruminantes. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, João Pessoa, v. 3, n. 1, p. 53-57, 2009.
- BIAZUS, J. P. M. et al. Caracterização da atividade amilásica do malte de milho (*Zea mays* L.). **Acta Scientiarum Technology**, Maringá, v. 28, n. 1, p. 13-19, 2006.
- BLAMONT, E. et al. O semi-árido da Bahia: problemas, desafios e possibilidades. **Bahia Agrícola**, Salvador, v. 5, n. 2, p. 45-49, 2002.
- CASTILHO, L. R.; MEDRONHO, R. A; ALVES, T. L. M. Production and extraction of pectinases obtained by solid state fermentation of agroindustrial residues with *Aspergillus niger*. **Bioresource Technology**, v. 71, n. 1, p. 45-50, 2000.
- CHIACCHIO, F. P. B.; MESQUISTA, A. S.; SANTOS, J. R. Palma forrageira: uma oportunidade econômica ainda desperdiçada para o semi-árido baiano. **Bahia Agrícola**, Salvador, v. 9, n. 3, p. 39-49, 2006.
- COUTO, S. R.; SANROMAN, M. A. Application of solid-state fermentation to food industry, A Review. **Journal of Food Engineering**, v. 76, n. 3, p. 291-302, 2006.
- GALEMBECK, F.; BARBOSA, C. A. S.; SOUSA, R. A. Aproveitamento sustentável de biomassa e de recursos naturais na inovação química. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 571-581, 2009.
- GERVAIS, P.; MOLIN, P. The role of water in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 2/3, p. 85-101, 2003.
- GHORAI, S. et al. Fungal Biotechnology in food and feed processing. **Food Research International**, v. 42, n. 5-6, p. 577-587, 2009.
- GRAMINHA, E. B. N. et al. Enzyme production by solid-state fermentation: Application to animal nutrition. **Animal Feed Science and Technology**, v. 144, n. 1-2, p. 1-22, 2008.
- GUEDES, R. S. et al. Germinação e vigor de sementes de *Opuntia ficus-indica* Mill após tratamentos para superar a dormência. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 22, n. 4, p. 20-26, 2009.
- GUPTA, A.; GAUTAM, N.; MODI, D. R. Optimization of α -amylase production from free and immobilized cells of *Aspergillus niger*. **Journal of Biotechnology and Pharmaceutical Research**, v. 1, n. 1, p. 1-8, 2010.
- GUSAKOV, A. V. et al. Design of Highly Efficient Cellulose Mixtures for Enzymatic Hydrolysis of Cellulose. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 97, n. 5, p. 1028-1038, 2007.
- HAG, I.; ALI, S.; IQBAL, J. Direct production of citric acid from raw starch by *Aspergillus niger*. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 6, p. 921-924, 2003.
- JOO, H. S.; CHANG, G. S. Production of protease from a new alkalophilic *Bacillus* sp. I-312 grown on soybean meal: optimization and some properties. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 3-4, p. 1263-1270, 2005.
- HOLKER, U.; HOFER, M.; LENZ, J. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 64, n. 2, p. 175-186, 2004.
- KUMAR, R.; SINGH, S.; SINGH, O. V. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 35, n. 5, p. 377-391, 2008.
- KUNAMNENI A, PERMAUL K, SINGH S. Amylase production in solid state fermentation by the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 100, n. 2, p. 168-171, 2005.
- LAUFENBERG, G.; KUNZ, B.; NYSTROM, M. Transformation of vegetable waste into value added products: (A) The upgrading concept (B) Practical implementations. **Bioresource Technology**, v. 87, n. 2, p. 167-198, 2003.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.
- MOREIRA, F. G; et al. Produção de amilases por *Aspergillus tamaritii*. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 30, p.157-162, 1999.
- OMEMU, A. M. et al. Hydrolysis of raw tuber starches by amylase of *Aspergillus niger* AM07 isolated from the soil. **African Journal of Biotechnology**, v. 4, n. 1, p. 19-25, 2005

PALACIOS-CABRERA, H. et al. Growth of *Aspergillus ochraceus*, *A. carbonarius* and *A. niger* on culture media at different water activities and temperatures. **Brazilian Journal Microbiology**, São Paulo, v. 36, n. 1, p. 24-28, 2005

PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 2/3, p. 81-84, 2003.

PANDEY, A. et al. **Enzyme Technology**. 1. ed. New Delhi: Asiatech Publishers, Inc, 2005. 760 p.

RAGHAVARAO, K. S. M. S.; RANGANATHAN, T. V.; KARANTH, N. G. Some engineering aspects of solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 9, p. 127-135, 2003.

SANTOS, T. C. et al. Aplicação da fermentação em estado sólido sobre o farelo de cacau (*Theobroma Cacao L.*): Obtenção de ligninases. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, Londrina, v. 32, n. 1, p. 87-96, 2011.

SHAFIQUE, S.; BAJWA, R.; SHAFIQUE, S. Screening of *Aspergillus niger* and *Aspergillus flavus* strains for extra cellular alpha-amylase activity. **Pakistan Journal of Botany**, v. 41, n. 2, p. 897-905, 2009.

SINGHANIA, R. R. et al. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, n. 1, p. 13-18, 2009.

SOCCOL, C. R. et al. Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4820-4825, 2010.

SOUSA, D. M. M. et al. Comportamento das sementes de palma (*Opuntia ficus-indica* L.) submetidas à fermentação e secagem. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 22, n. 3, p. 29-34, 2009.

WHITAKER, J. R. **Principles of enzymology for the food sciences**. 2. ed., New York, NY: Marcel Dekker, 1994. 625 p.