



**Marque a opção do tipo de trabalho que está inscrevendo:**

**Resumo**

**Relato de Caso**

## **PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DE ENZIMAS AMILOLÍTICAS UTILIZANDO FILTRAÇÃO POR MEMBRANAS**

**AUTOR PRINCIPAL:**

Greice Borges Nunes

**CO-AUTORES:**

Éllen Francine Rodrigues

**ORIENTADOR:**

Luciane Maria Colla

**UNIVERSIDADE:**

Universidade de Passo Fundo - UPF

### **INTRODUÇÃO**

A aplicação de enzimas em processos biotecnológicos e industriais é ampla e diversificada, envolvendo diversas áreas. Os processos fermentativos se apresentam como uma tecnologia capaz de propor caminhos alternativos para a utilização de subprodutos agroindustriais gerados, bem como, agregar valor a essas matérias-primas, por meio da produção de substâncias de interesse econômico, como enzimas. Para viabilizar a produção de enzimas faz-se o uso de processos fermentativos utilizando microrganismos, e, também, o processo de purificação das mesmas através da filtração por membranas. As amilases estão entre as mais importantes enzimas industriais, devido à sua aplicabilidade em diferentes setores. O objetivo deste trabalho foi estudar a produção de enzimas amilolíticas via fermentação em estado sólido (FES) e fermentação submersa (FS) a partir de resíduo agroindustrial utilizando *Aspergillus niger* e a purificação das mesmas por filtração por membranas.

## DESENVOLVIMENTO:

O preparo dos inóculos para FES e FS foi realizado através da inoculação do *Aspergillus niger* em erlenmeyers e placas de petri contendo meio PDA solidificado, incubados a 30 °C por 7 d. O substrato utilizado nos processos fermentativos foi o farelo de trigo. A FES foi realizada em béquers de 1 L adicionando 25 g do farelo esterilizado, com umidade ajustada até 60% com solução de nutrientes os quais foram inoculados com  $4.10^6$  esporos/gmeio, sendo incubados a 30°C até 8d. As enzimas foram extraídas e denominadas de extrato bruto. Para a FS o meio de cultivo foi preparado a partir da cocção de 10 % de substrato em 500 mL de água destilada, a 100 °C, por 30 min. Após a cocção, realizou-se a filtração do meio e adicionou-se 10 % de solução de nutrientes. O meio foi avolumado para 1 L com água destilada e esterilizado. A inoculação foi de  $2.10^6$  esporos/gmeio, sendo, incubados por 8 d, 30 °C a 120 rpm. Após 8 d, o meio fermentado foi filtrado e centrifugado, sendo este denominado como extrato bruto. Os extratos brutos foram submetidos à microfiltração e estes denominados como retido e permeado. A atividade amilolítica dos extratos foi determinada utilizando amido como substrato, denominado de método sacarificante (MILLER, 1959) e a quantificação de proteínas por Kjeldahl (AOAC, 2005).

Com relação aos resultados, o aumento dos valores de atividade enzimática quando comparados aos extratos brutos obtidos na FES e FS foram semelhantes (Tabela 1), porém as atividades amilolíticas encontradas em 8 d para a fermentação em estado sólida foi de  $37,53 \pm 2,02$  U/gfarelofermentado quando expressa em grama de farelo fermentado. O aumento das atividades em relação ao tempo pode ser explicado devido à baixa disponibilidade de açúcares redutores da matéria-prima no início da fermentação, por isso, algumas cepas de *Aspergillus niger* produzem enzimas que são capazes de hidrolisar o amido liberando glicose, e assim há necessidade da presença de uma fonte de amido para ocorrer à indução da produção de amilases. Os resultados obtidos para o retido da FES foi elevado quando comparado aos resultados de atividade enzimática do extrato bruto (Tabela 2). Uma fração elevada das enzimas produzidas ficaram retidas na membrana de microfiltração, ocorrendo um aumento em torno de 93% nas atividades, o que indica que no permeado foram eliminados compostos de baixo peso molecular que tinha incidência negativa sobre a atividade. O retido também foi o que apresentou a maior atividade específica ( $66,65 \pm 0,36$  U/mgproteína), quando comparado a todos os experimentos. Com relação às atividades específicas dos extratos purificados pela filtração por membranas da FS, os resultados obtidos tanto para o permeado ( $581,08 \pm 13,23$  U/mgproteína) quanto para o retido ( $297,34 \pm 3,81$  U/mgproteína) foram superiores aos extratos brutos ( $77,24 \pm 1,46$  U/mgproteína), assim verifica-se que o processo de microfiltração eliminou inibidores da atividade da enzima.

### CONSIDERAÇÕES FINAIS:

Conclui-se que os resultados dos extratos purificados através da microfiltração obtidos na fermentação submersa apresentaram maiores atividades enzimáticas específicas quando comparados aos extratos purificados da fermentação em estado sólido, o que aponta a escolha da primeira como processo para a produção dessa enzima aliada a utilização do farelo de trigo como fonte de substrato.

### REFERÊNCIAS

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official methods of analysis of the association analytical chemists**. 18. Ed. Washington: AOAC, 2005.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Washington, v.31, n. 3, p. 426-428, 1959

### ANEXOS

A Tabela 1 apresenta os resultados das atividades amilolíticas dos extratos brutos obtidos para os processos fermentativos.

Tabela 1 – Atividades enzimáticas obtidos para os extratos da FES e FS

Exp.	AA* (T0)	AA* (T8)
<b>FES</b>	0,04±0,02	1,29±0,07
<b>FS</b>	0,38±0,04	1,23±0,02

FES: Atividades amilolíticas após a extração das enzimas (U/ml) \*AA: Atividade Amilolítica (U/ml); Resultados FES: 1,15±0,69 (T0); 37,53±2,02 (T8) U/gfarelofermentado; Resultados de média±desviopadrão.

A Tabela 2 apresenta os resultados de atividades enzimáticas obtidos para os extratos brutos e purificados através do processo de microfiltração por membranas.

Tabela 2 – Resultados de atividades amilolíticas para os extratos brutos e da microfiltração obtidos via FES e FS

	FES			FS		
	AA*	Proteína (mg/ml)*	AE*	AA*	Proteína (mg/ml)*	AE*
Extrato bruto	1,29±0,07	0,032±0,002	40,57±2,18	1,23±0,02	0,016±0,001	77,24±1,46
Permeado	0,63±0,06	0,020±0,000	31,51±3,01	3,42±0,07	0,005±0,001	581,08±13,23
Retido	2,52±0,01	0,037±0,003	66,65±0,36	4,26±0,05	0,014±0,001	297,34±3,81

AA: Atividade amilolítica (U/mlamostra); AE: Atividade específica (U/mgproteína). \*Resultados de média±desvio padrão