

Caracterização da α -amilase produzida por fungo filamentososo isolado do umbuzeiro (*Spondias tuberosa* Arruda Câmara)

*Characterization of α -amylase produced by filamentous fungus isolated from umbuzeiro (*Spondias tuberosa* Arruda Câmara)*

Gabriel de Jesus Santos¹, Alana Caise dos Anjos Miranda², Pâmala Évelin Pires Cedro², Gildomar Lima Valasques Junior², Luciana Amaral de Faria Silva^{1*}

¹ Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Departamento de Ciências e Tecnologias/Laboratório de Alimentos, Jequié, Bahia, Brasil.

² Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, Vitória da Conquista, Bahia, Brasil.

*Autor correspondente. E-mail: lucianadefaria@gmail.com

Recebido: 28/05/2024; Aceito: 27/08/2024

RESUMO

O estudo buscou caracterizar a α -amilase produzida por um fungo filamentososo isolado do umbuzeiro. A determinação dos valores ótimos de pH e temperatura para a atividade enzimática foi conduzida usando metodologia de superfície de resposta com o planejamento Doehlert. A termoestabilidade da enzima foi avaliada submetendo a solução enzimática às temperaturas de 60 °C, 70 °C e 80 °C por 10, 30 e 50 minutos em pH 3,0. Foi possível identificar como condições ótimas pH 3,0 e temperatura em torno de 65 °C. O pH acima de 5,0 e temperaturas acima de 65 °C reduziram a atividade enzimática. A enzima pode ser considerada termoestável ($p \leq 0,05$) sob aquecimento a 70 °C, por até 30 minutos. O modelo experimental empregado, permitiu identificar condições ótimas que favoreceram a atividade enzimática da α -amilase produzida pelo fungo endofítico isolado do umbuzeiro. Além disso, a enzima demonstrou ser termoestável, nas condições avaliadas, tais fatores a tornam relevantes para aplicações biotecnológicas.

Palavras-chave: *fungo endofítico, superfície de resposta, termoestabilidade.*

ABSTRACT

The study sought to characterize the alpha-amylase produced by a filamentous fungus isolated from the umbu tree. The determination of the optimal pH and temperature values for enzymatic activity was conducted using response surface methodology with Doehlert planning. The thermostability of the enzyme was evaluated by subjecting the enzyme solution to temperatures of 60 °C, 70 °C and 80 °C for 10, 30 and 50 minutes at pH 3.0. It was possible to identify pH 3.0 and a temperature around 65 °C as optimal conditions. pH above 5.0 and temperatures above 65 °C reduced enzymatic activity. The enzyme can be considered thermostable ($p \leq 0.05$) when heated to 70 °C for up to 30 minutes. The experimental model used allowed us to identify optimal conditions that favored the enzymatic activity of alpha-amylase produced by the endophytic fungus isolated from the umbuzeiro. Furthermore, the

enzyme demonstrated to be thermostable under the conditions evaluated, such factors make it relevant for biotechnological applications.

Keywords: *endophytic fungus, response surface, thermostability.*

INTRODUÇÃO

As amilases (EC 3.2.1.1) desempenham um papel essencial na digestão de carboidratos, pois quebram moléculas de amido em unidades mais simples, monossacarídeos (BUSSA et al., 2019; DENTI, 2021). A α -amilase é capaz de atuar nas ligações α (1,4) dos polissacarídeos que contêm três ou mais unidades de D-glicose, resultando na quebra dessas ligações (GOMES et al., 2007; SANTOS et al., 2020).

A capacidade das amilases em acelerar reações químicas específicas, sem serem consumidas no processo, destaca sua importância biológica (ROBINSON, 2015). Essa capacidade torna as amilases versáteis para o ramo industrial, considerando seu envolvimento e aplicação em diferentes processos, como na produção de alimentos, na fabricação de produtos farmacêuticos e na indústria têxtil (EL-GENDI et al., 2021).

Os fungos filamentosos são microrganismos reconhecidos por sua adaptabilidade e versatilidade metabólica. Para isso, os fungos produzem uma variedade de enzimas (RÖDER et al., 2023), incluindo amilases, capazes de operar em condições ambientais diversas (SANTOS et al., 2020). Esta capacidade adaptativa não apenas desempenha um papel crucial na sobrevivência desses microrganismos, mas também confere às amilases fúngicas propriedades únicas quanto à velocidade de produção e a diversidade em aplicações biotecnológicas (GOMES et al., 2007).

Amilases fúngicas são alvos de pesquisa e proporcionam *insights* valiosos para a compreensão de processos fisiológicos (SHAHRYARI et al., 2019) e da complexidade bioquímica dessas enzimas (SHAHRYARI et al., 2019). Mas além disso, essas enzimas têm sido estudadas no desenvolvimento de aplicações práticas inovadoras, como aplicações diagnósticas e terapêuticas para o câncer, infecções e cicatrização de feridas (AZZOPARDI et al., 2016). O interesse por pesquisas envolvendo amilases fúngicas pode ser um reflexo da importância econômica das amilases, uma vez que cerca de 30% da produção global de enzimas é composta por amilases (GAETE et al., 2020).

Neste contexto, explorar as propriedades e funções, bem como entender as melhores condições de atividade das enzimas amilases torna-se crucial para uma compreensão mais profunda da bioquímica e para o avanço de tecnologias que envolvem a manipulação eficiente de substratos amiláceos. Dessa forma, o objetivo desse estudo foi obter uma amilase a partir de um fungo filamentoso isolado do umbuzeiro (*Spondias tuberosa* Arruda Câmara) e caracterizá-la de modo a determinar o pH e temperatura ótimos para a atuação da enzima.

MATERIAL E MÉTODOS

Microrganismo

O fungo foi obtido da Coleção de Fungos Filamentosos Endofíticos Isolados de Umbuzeiro da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (SANTOS; SILVA, 2022) e mantido em Ágar Batata e Dextrose (BDA), a 4 °C até o início dos experimentos.

Produção da amilase

O microrganismo foi inicialmente cultivado em meio BDA por um período de 7 dias a 30 °C (em uma incubadora BOB sl200/90-solab). Posteriormente, o fungo foi inoculado em meio líquido composto por amido (10 g/L), extrato de levedura (3 g/L), extrato de malte (3 g/L) e sulfato de magnésio (0,758 g/L) em pH 7,0. Em seguida, uma concentração de 1×10^7 esporos/mL do microrganismo foi inoculada ao meio. O processo de fermentação foi

conduzido em um agitador rotativo (incubadora shaker sl 222, Solab) a 150 rpm, ao longo de 120 horas. Após a fermentação, o meio de cultura foi filtrado a vácuo e o sobrenadante resultante foi utilizado como extrato enzimático bruto.

Ensaio de determinação da atividade enzimática

A avaliação da atividade da amilase foi conduzida conforme a metodologia proposta por Miller (1956). O método se baseia na quantificação de açúcares redutores liberados no meio de reação pela interação de 0,1 mL de extrato enzimático bruto com 0,1 mL de solução de amido a 1% em tampão fosfato pH 7,0, durante um período de 10 minutos a 50 °C. Posteriormente à incubação, 0,2 mL de ácido 3,5-diitrosalicílico (DNS) foi adicionado, e a mistura foi aquecida a 100 °C por 5 minutos, seguida de resfriamento com 2 mL de água destilada. A atividade enzimática foi determinada pela leitura da absorbância a 540 nm em um espectrofotômetro (Mars Spectro 560) e comparada com uma curva-padrão de glicose obtida nas mesmas condições.

Determinação dos valores ótimos de pH e temperatura

A determinação dos valores ótimos de pH e temperatura para a atividade amilásica foi conduzida através da aplicação da metodologia de superfície de resposta, utilizando o planejamento de Doehlert. A investigação da variável de pH envolveu a exploração de cinco níveis (3,0; 4,0; 5,0; 6,0 e 7,0), enquanto a temperatura foi analisada em três níveis distintos (30 °C, 50 °C e 70 °C). Todos os experimentos foram conduzidos em triplicata (n=3) e replicata do ponto central (n=9), para aferir possíveis erros experimentais. A análise estatística foi realizada no *software* Statistica® versão 7, com a análise de variância (ANOVA).

Avaliação da termoestabilidade

Para a análise da termoestabilidade, a solução enzimática foi submetida a aquecimento (60 °C, 70 °C e 80 °C) por 10, 30 e 50 minutos em pH constante (3,0). Após cada tratamento, a atividade da amilase foi determinada. O Teste de Tukey foi realizado, ao nível de 5% de significância ($p \leq 0,05$), para verificar se houve diferença significativa entre os tratamentos, utilizando o Microsoft Excel.

RESULTADOS

A Tabela 1 exhibe os valores observados e preditos de atividade enzimática (UA) sob condições específicas determinadas pelo planejamento experimental de Doehlert.

Tabela 1. Planejamento experimental Doehlert aplicado na otimização do pH e temperatura de atuação da amilase produzida pelo fungo obtido do umbuzeiro (*Spondias tuberosa* Arruda Câmara).

Experimento	pH	Temperatura (°C)	Valores observados (UA)	Valores preditos (UA)
1	4 (-0,5)	70 (+0,866)	0,1614	0,1627
2	6 (+0,5)	70 (+0,866)	0,1409	0,1395
3	3 (-1)	50 (0)	0,1635	0,1622
4C	5 (0)	50 (0)	0,1513	0,1551
4C	5 (0)	50 (0)	0,1568	0,1551
4C	5 (0)	50 (0)	0,1571	0,1551
5	7 (+1)	50 (0)	0,1303	0,1316
6	4 (-0,5)	30 (-0,866)	0,1362	0,1375
7	6 (+0,5)	30 (-0,866)	0,1313	0,1300

C: ponto central; UA: $\mu\text{mol}/\text{min}$. Os valores codificados são apresentados em parênteses.

As condições ótimas que conduziram à melhor atividade enzimática da amilase produzida pelo fungo filamentosso obtido do umbuzeiro foi pH ácido, em torno de 3,0 e temperaturas entre 60 e 70, como pode ser observado na Figura 1. A maioria das enzimas possui um pH ideal específico no qual a velocidade da reação catalisada atinge seu máximo e, qualquer variação acima ou abaixo do valor resulta em uma diminuição da sua atividade. Em pH ótimo, a estrutura tridimensional da enzima, especialmente o seu sítio ativo, é mantida de forma que a catálise da reação seja maximizada. Em um pH adequado, as cargas elétricas dos grupos funcionais da enzima e do substrato são ideais para a ligação e favorecem a catálise. Por outro lado, se a enzima for mantida fora do seu pH ótimo, pode ocorrer desnaturação, comprometendo a estrutura e, conseqüentemente, sua função (ROBINSON, 2015).

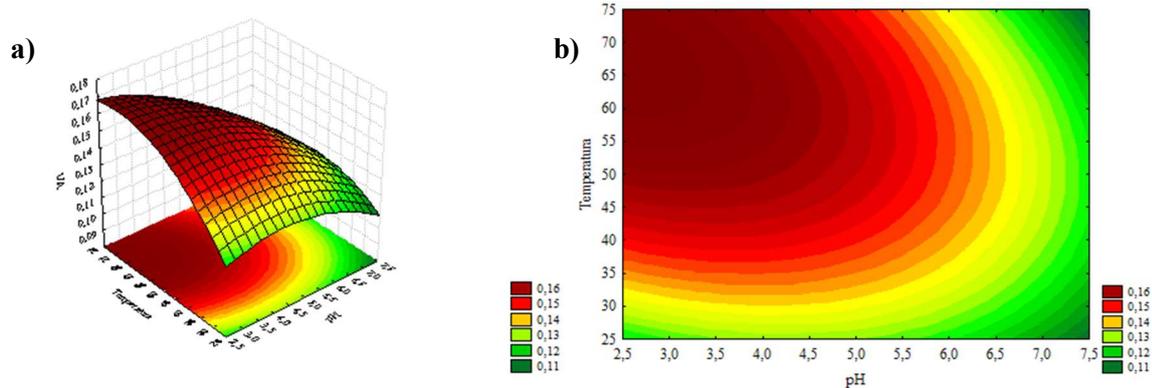


Figura 1. Gráficos de superfície de resposta e curva de níveis para a otimização do pH e temperatura ótimos para a atividade enzimática da amilase produzida pelo fungo obtido do umbuzeiro (*Spondias tuberosa* Arruda Câmara).

Equação que explicou a resposta:

$$UA = -0,015309 (\pm 0,001904)pH - 0,004077 (\pm 0,001505)pH^2 + 0,017401 (\pm 0,003297)T - 0,021217 (\pm 0,004515)T^2 - 0,007845 (\pm 0,003297)pH * T.$$

Em que, T é a temperatura em graus Celsius.

A influência das variáveis pH e temperatura no processo é descrita no Gráfico de Pareto (Figura 2), com nível de confiança de 95%. A análise do diagrama de Pareto indicou que as variáveis pH e temperatura linear, foram significativas no processo, bem como a temperatura quadrática. O pH quadrático e a relação linear entre pH e temperatura não indicaram significância no processo.

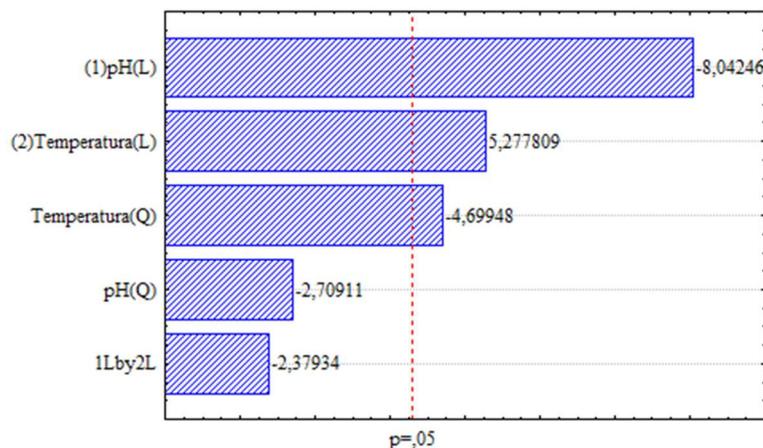


Figura 2. Diagrama de Pareto com a significância das variáveis pH e temperatura na atividade enzimática da amilase produzida pelo fungo obtido do umbuzeiro (*Spondias tuberosa* Arruda Câmara). (L)= Linear; (Q)= Quadrático.

A análise de variância (ANOVA) (Tabela 2) foi conduzida para avaliar a adequação do modelo aos resultados experimentais. A análise da regressão apresentou um valor calculado para a distribuição de Fisher maior que o valor tabelado ($25,18 > 9,013$), permitindo inferir que o modelo experimental está bem ajustado, comprovado pelo valor obtido na falta de ajuste, com F calculado igual a 0,94, inferior ao F tabelado de 18,51, indicando que os resultados encontrados não são aleatórios. O coeficiente de determinação R^2 foi de 0,98, indicando que 98% dos resultados são explicados pelo modelo experimental.

Tabela 2. Análise de variância (ANOVA) para a otimização do pH e temperatura de atuação da amilase produzida pelo fungo obtido do umbuzeiro (*Spondias tuberosa* Arruda Câmara).

	SQ	gl	MQ	F _{calculado}	F _{tabelado}
Regressão	0,001343	5	0,0002686	25,18	9,013
Resíduo	0,000032	3	$1,0666 \times 10^{-05}$		
Falta de ajuste	0,000010	1	0,000010	0,94	18,51
Erro puro	0,000022	2	0,000011		
Total SQ	0,001375	8			

SQ: Soma quadrática; gl: Graus de liberdade; MQ: Média quadrática. R^2 0,98.

A influência da temperatura na atividade enzimática da amilase foi analisada (Figura 3). Os resultados indicaram que os tratamentos T7, T8 e T9 foram equivalentes e não resultaram em mudanças na atividade enzimática, assim como os tratamentos T1, T2 e T3. Na temperatura de 70 °C, os tratamentos T4, T5 e T6 também não apresentaram diferenças significativas entre si, nem em comparação com os tratamentos a 60 °C. Isso sugere que a atividade da amilase permanece estável durante o aquecimento por até 30 minutos, a 70 °C. Houve também uma diminuição da atividade enzimática com o aquecimento a 80 °C, entretanto, essa diminuição não dependeu do tempo de aquecimento.

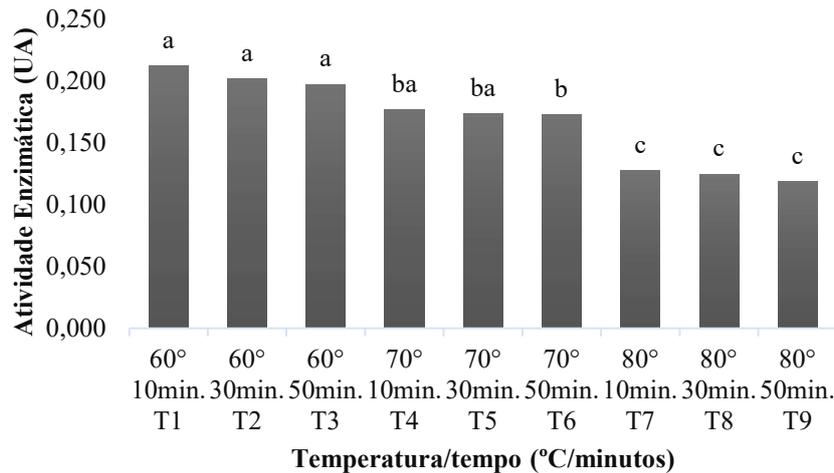


Figura 3. Gráfico da avaliação da termoestabilidade da amilase produzida pelo fungo obtido do umbuzeiro (*Spondias tuberosa* Arruda Câmara) a 60 °C, 70 °C e 80 °C por 10, 30 e 50 minutos (T9-T1). Teste de Tukey a 5% de significância ($p \leq 0,05$).

DISCUSSÃO

As amilases fúngicas apresentam vantagens que as tornam escolhas preferenciais em diferentes aplicações industriais, consistindo em alta eficiência na quebra das ligações do amido (BUSSA et al., 2019), estabilidade durante as reações catalisadas (PINTO et al., 2020), versatilidade de aplicações (AZZOPARDI et al., 2016) e facilidade em obter utilizando microrganismos (EGBUNE et al., 2022). Fungos são organismos que podem ser cultivados de forma sustentável, tornando as amilases de origem fúngica uma opção favorável para indústrias que buscam alternativas mais sustentáveis em seus processos (ABDULAAL, 2018).

O caráter ácido do pH e a temperatura elevada na qual a α -amilase produzida pelo fungo obtido do umbuzeiro (*Spondias tuberosa* Arruda Câmara) é comparável às amilases obtidas dos fungos filamentosos *Rhizopus microspores* var. *oligosporus* (SANTOS et al., 2020) e de *Fomitopsis palustres* (TANAKA et al., 2020).

A atividade enzimática e estabilidade das enzimas são fatores sensíveis à ação da temperatura. Como resultado, em altas temperaturas durante um determinado período de tempo, pode ocorrer desnaturação da enzima e perda da sua atividade de forma parcial ou total (SANTOS et al., 2020; SHAHRYARI et al., 2019).

A amilase produzida pelo fungo filamentoso obtido do umbuzeiro é resistente ao aquecimento, mantendo sua atividade catalítica em temperaturas em torno de 70 °C e com uma redução sob a condição de temperatura de 80 °C. O aumento da temperatura impactou a atividade enzimática de uma amilase produzida pelo fungo *Neurospora intermedia* em estudos conduzidos por Shahryari et al. (2019). A enzima apresentou atividade acentuada em torno de 65 °C, no entanto, a partir desse ponto, em temperaturas a partir de 70 °C foi observado um declínio significativo na atividade enzimática.

Uma maior termoestabilidade ou resistência a ácidos de α -amilases fúngica ajudará a melhorar os processos industriais e a reduzir os custos de produção (LI et al., 2020). As amilases são amplamente utilizadas em diversas indústrias, cada uma exigindo uma α -amilase com propriedades específicas. Por isso, a busca por novos microrganismos e a exploração de características como termoestabilidade e perfil de pH dessas enzimas são contínuas e essenciais (SOUZA; MAGALHÃES, 2010).

CONCLUSÃO

A caracterização da α -amilase produzidas pelo fungo endofítico isolado do umbuzeiro revelou que as condições ótimas de pH em torno de 3 e temperatura em torno de 65 °C resultam em atividade enzimática acentuadas, de acordo com a metodologia de superfície de resposta. Além disso, a enzima estudada foi considerada termoestável quando submetida à temperatura de 70 °C por até 30 minutos, sem perda significativa de atividade. Esses resultados indicam o potencial dessa α -amilase para aplicações industriais e biotecnológicas, especialmente nas condições identificadas de pH e temperatura, otimizando sua eficiência e estabilidade térmica.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB) pelo auxílio financeiro que possibilitou a realização do projeto.

REFERÊNCIAS

- ABDULAAL, W.H. Purification and characterization of α -amylase from *Trichoderma pseudokoningii*. **BMC biochemistry**, v. 19, p. 1-6, 2018. <https://doi.org/10.1186/s12858-018-0094-8>
- AZZOPARDI, E.; LLOYD, C.; TEIXEIRA, S.R.; CONLAN, R.S.; WHITAKER, I.S. Clinical applications of amylase: **Novel perspectives Cirurgia**, Surg, v. 160, n. 1, p. 26-37. <https://doi.org/10.1016/j.surg.2016.01.005>
- BUSSA, N.F.; MOGES, M.; MUTHUSWAMY, M.; ABDISA, M. Isolation and Characterization of Amylase Enzyme from Selected Fungal Strains of Wof Washa Forest of North Shoa, Ethiopia. **Sci J Biol & Life Sci**. 1 (2): 2019. **Scientific Journal of Biology & Life Sciences**, v. 506, 2019. <https://doi.org/10.33552/SJBL.S.2019.01.000506>
- CERQUEIRA, U.M.F.M.; BEZERRA, M.A.; FERREIRA, S.L.C.; ARAÚJO, R.J.; SILVA, B.N.; NOVAES, C.G. Doehlert design in the optimization of procedures aiming food analysis – a review. **Food Chemistry**, v. 364, p. 130429, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130429>
- DENTI, A.F. Tecnologia enzimática: classificação, imobilização, suportes e aplicações. **Revista Perspectiva**, v. 45, n. 171, p. 97-110, 2021. <https://doi.org/10.31512/persp.v.45.n.171.2021.168.p.97-110>
- EGBUNE, E.O.; AVWIOROKO, O.J.; ANIGBORO, A.A.; AGANBI, E.; AMATA, A.I.; TONUARI, N.J. Characterization of a surfactant-stable α -amylase produced by solid-state fermentation of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) tubers using *Rhizopus oligosporus*: Kinetics, thermal inactivation thermodynamics and potential application in laundry industries. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 39, p. 102290, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2022.102290>
- EL-GENDI, H.; SALEH, A. K.; BADIERAH, R.; REDWAN, E. M.; EL-MARADNY, Y. A.; EL-FAKHARANY, E.M. A comprehensive insight into fungal enzymes: Structure, classification, and their role in mankind's challenges. **Journal of Fungi**, v. 8, n. 1, p. 23, 2021. <https://doi.org/10.3390/jof8010023>

GAETE, A.V.; TEODORO C.E.S.; MARTINAZZO, A.P. Utilização de resíduos agroindustriais para produção de celulase: uma revisão. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 8, p. e567985785-e567985785. <https://doi.org/10.33448/rsd-v9i8.5785>

GOMES, E.; GUEZ, M.; MARTIN, N.; SILVA, R.D. Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. **Química Nova**, v. 30, p. 136-145, 2007. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000100025>

LI, S.; YANG, Q.; TANG, B. Improving the thermostability and acid resistance of *Rhizopus oryzae* α -amylase by using multiple sequence alignment based site-directed mutagenesis. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 67, n. 4, p. 677-684, 2020. <https://doi.org/10.1002/bab.1907>

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>

PINTO, É.S.M.; DORN, M.; FELTES, B.C. The tale of a versatile enzyme: Alpha-amylase evolution, structure, and potential biotechnological applications for the bioremediation of n-alkanes. **Chemosphere**, v. 250, p. 126202, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126202>

ROBINSON, P. K. Enzymes: principles and biotechnological applications. **Essays in Biochemistry**, v. 59, p. 1, 2015. <https://doi.org/10.1042/bse0590001>

RÖDER, C.; CLIMACO, L.R.; OLIVO, J.E. Síntese de Glicoamilase em cultivo líquido e semissólido de fungos do gênero *Aspergillus*: uma análise das abordagens recentes da produção científica especializada. **Observatório de La Economía Latinoamericana**, v. 21, n. 11, p. 22019-22037, 2023. <https://doi.org/10.55905/oelv21n11-185>

SANTOS, I.R.; MENDES, T.P.S.; MIRANDA, A.C.A.; COSTA, D.N.; FIGUEROA, G.M.; SOARES, V.D.M.; VALASQUES JÚNIR, G.L.; CEDRO, P.É.P. Production and characterization of amylase obtained from *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus*. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 7, p. e694974810, 2020. <https://doi.org/10.33448/rsd-v9i7.4810>

SANTOS, K.S; SILVA, L.A.F. Endophytic fungi isolated from umbuzeiro (*spondias tuberosa* arruda câmara): potential alternative sources for the production of enzymes and natural pigments. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, p. 103761-103774, 2022. <https://doi.org/10.34117/bjdv6n12-759>

SHAHRYARI, Z.; FAZAELOPOOR, M.H.; GHASEMI, Y.; LENNARTSSON, P.R.; TAHERZADEH, M.J. Amylase and xylanase from the Edible Fungus *Neurospora intermedia*: Production and Characterization. **Molecules**, v. 24, n. 4, p. 721, 2019. <https://doi.org/10.3390/molecules24040721>

SOUZA, P.; MAGALHÃES, P. O. Application of microbial α -amylase in industry-A review. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 850-861, 2010. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822010000400004>

TANAKA, Y.; KONNO, N.; SUZUKI, T.; HABU, N. Starch-degrading enzymes from the brown-rot fungus *Fomitopsis palustris*. **Protein Expression and Purification**, v. 170, p. 105609, 2020.
<https://doi.org/10.1016/j.pep.2020.105609>