

SELEÇÃO DE FUNGOS PARA PRODUÇÃO EXTRACELULAR DE GLICOSE OXIDASE (EC 1.1.3.4) E OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO

Elusiane da Silva SANTOS¹
Diego Rayan Teixeira de SOUSA²
João Vicente Braga de SOUZA³

¹Bolsista Iniciação Científica INPA-PIBIC/CNPq;
²Colaborador, Laboratório de Micologia/INPA/CSAS;
³Orientador, Laboratório de Micologia/INPA/CSAS.

INTRODUÇÃO

Estima-se que menos de 10% dos microrganismos existentes no planeta tenham sido caracterizados e descritos (Staley 1998; Sotão *et al.* 2004). Na Amazônia, pouco se conhece sobre os fungos, não existindo ainda uma lista com citação de todas as espécies já descritas, o que impossibilita a informação de dados quantitativos referentes à diversidade desse grupo na região.

Os fungos filamentosos carregam um poderoso arsenal enzimático, capaz de quebrar macromoléculas (Sotão *et al.* 2004). Essa capacidade dos fungos é explorada, hoje em dia em vários processos industriais, dentre eles, na produção de enzimas de interesse diagnóstico (Nagel 2002).

Uma das enzimas mais importantes, a glicose oxidase, possui diversas aplicações, especialmente na indústria de alimentos e farmacêuticas, sendo muito utilizada em panificações, produção de vinhos, produtos de higiene bucal além de biomarcadores enzimáticos, onde a mesma tem como fonte de produção os fungos, obtida principalmente a partir do *Aspergillus niger* e *Penicillium* sp. (Jerzy *et al.* 1988). Com isso, leva ao objetivo deste trabalho que é selecionar fungos produtores de Glicose Oxidase e aperfeiçoar a produção desta enzima.

Os resultados obtidos no processo de otimização por resíduos foi negativo, devido à grande contaminação das amostras, inviabilizando a técnica, de modo que houve a necessidade de mudança pela técnica de meio sintético, onde neste caso, a contaminação foi reduzida havendo crescimento do fungo produtor de GOD. Observou-se ainda que os gêneros *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. obtiveram maior produção de GOD. Na cinética houve picos de produção de 17,4 U/L a 27,1 U/L para o gênero *Aspergillus*, demonstrando dessa forma que *Aspergillus* se sobressaiu na produção da enzima. No peso seco, *Aspergillus* sp. apresentou a maior quantidade de concentração de biomassa.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta da amostra

Realizou-se a coleta de cinco amostras de solo na Reserva Florestal Adolpho Ducke, localizada na cidade de Manaus, estado Amazonas, situada entre os paralelos: latitude 03°00' 00 "e 03°08'00" S e longitude 59°52'40 "e 59°58'00" W. As mesmas foram retiradas de uma porção superficial de 0-10 centímetros. Em seguida, levadas para o laboratório onde, usando a técnica de diluição sucessiva e para identificação, foi realizado a técnica de Redell (1950), microcultivo em lâmina e os fungos foram identificados de acordo com Wotanabe (2002) e Barnett e Berry (1972) e armazenadas.

Métodos

Os organismos foram incubados durante 72 horas, em meio de cultura suplementado com glicose a 8%. Em seguida, todos os frascos foram inoculados em uma suspensão de esporos para obter uma concentração final de

4×10^5 esporos/ml de meio, pH 6,0 a 25 ° C, sob agitação orbital (100 rpm). Após 72h de incubação a 25° C, as atividades foram determinadas (Guimarães *et al.* 2006).

O caldo fermentado foi centrifugado a 10.000 rpm durante 30 min para separar a biomassa. Para a determinação de GOD (glicose oxidase), foi utilizada uma mistura reacional composta de 0,01 M de D-glicose, 0,02% de o-dianisidina em tampão fosfato pH 7,0, 25 µg de peroxidase e 20 µl de solução de enzima (GOD). A mistura foi incubada durante 30 min a 40 °C. A reação sofreu um *stop*, pela adição de 0,5 ml de HCl 4N, e quantificada a 490 nm.

Todos os resultados foram resultantes da média de pelo menos três (n = 3) experiências independentes. Uma unidade (U) de atividade de GOD será definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar 1 mmol de glicose / (mL.min) nessas condições de ensaio (Tsuge e Mitsuda 1973).

Foi avaliada a influência de diferentes substratos e diferentes fontes de nitrogênio na produção da enzima. Foi realizada a análise quantitativa da Glicose Oxidase produzida, a concentração de substrato, biomassa, pH e tempo de tratamento. Foi avaliada a influência da concentração de fonte de carbono, fonte de nitrogênio, pH e inóculo na produção de glicose oxidase, como descrito por Barros Neto (1996).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo como demonstrado na Tabela 1, observa-se que as espécies que se sobressaem na produção de GOD são as amostras 16 de *Penicillium* sp., produzindo 25,0 U/L, e a amostra 12 de *Aspergillus* sp. produzindo 22,1 U/L. Esses resultados estão de acordo com os resultados obtidos por Javed *et al.* (2011).

Tabela 1. Seleção de Fungos produtores de GOD.

Código de Identificação	Fungos	GOD (U/L)
1A	<i>Aspergillus</i> sp.	11,5 U/L
3A	<i>Aspergillus</i> sp.	13,6 U/L
12A	<i>Aspergillus</i> sp.	22,1 U/L
15A	<i>Penicillium</i> sp.	10,7 U/L
16A	<i>Penicillium</i> sp.	25,0 U/L
29A	<i>Aspergillus</i> sp.	6,6 U/L
85A	<i>Aspergillus</i> sp.	6,5 U/L

De acordo com a Tabela 2, observa-se que houve picos de produção de GOD no período estimado de 24h a 96h. Onde as amostras 12, 29 e 85 obtiveram os melhores valores em 72h, e as amostras 12 e 29 mantiveram-se com uma boa produção da enzima em 96h. De acordo com Slivinsk e Ponta Grossa (2007). Essas variações são importantes para que se realize a determinação da amostra, que apresentou maior pico de produção de GOD em períodos de tempo específico.

Na Tabela 3 são encontrados os resultados do peso em gramas das amostras. Para chegar a esse resultado, após os experimentos, todos os fungos que participaram foram filtrados em provetas com papel de filtro e a solução resultante foi incubada em estufa por 3 dias. Em 96h as amostras 01, 12 e 85 obtiveram os melhores pesos por grama. De acordo com Slivinsk e Ponta Grossa (2007), esses resultados demonstram a quantidade que enzimas presentes no papel de filtro, que foi seco e pesado, demonstrando assim o peso sólido obtido no experimento.

Tabela 2. Cinética de Fungos produtores de GOD.

Código de Identificação	Fungos	24h	48h	72h	96h
1A	<i>Aspergillus</i> sp.	3,4 U/L	9,7 U/L	35,6 U/L	37,7 U/L
3A	<i>Aspergillus</i> sp.	0,8 U/L	2,0 U/L	22,3 U/L	13,9 U/L
12A	<i>Aspergillus</i> sp.	1,4 U/L	17,4 U/L	14,9 U/L	22,3 U/L
15A	<i>Penicillium</i> sp.	0 U/L	0,2 U/L	3,9 U/L	2,0 U/L
16A	<i>Penicillium</i> sp.	0,1 U/L	0,9 U/L	3,5 U/L	4,2 U/L
29A	<i>Aspergillus</i> sp.	3,3 U/L	17,4 U/L	30,0 U/L	27,1 U/L
85A	<i>Aspergillus</i> sp.	0,5 U/L	11,6 U/L	28,9 U/L	6,0 U/L

Tabela 3. Peso seco dos Fungos produtores de GOD. Peso por gramas.

Código de Identificação	Fungos	24h	48h	72h	96h
1A	<i>Aspergillus</i> sp.	0,1 U/L	0,2 U/L	0,7 U/L	0,7 U/L
3A	<i>Aspergillus</i> sp.	0,1 U/L	0,5 U/L	0,7 U/L	0,5 U/L
12A	<i>Aspergillus</i> sp.	0,1 U/L	0,4 U/L	0,6 U/L	0,8 U/L
15A	<i>Penicillium</i> sp.	0,1 U/L	0,3 U/L	0,4 U/L	0,6 U/L
16A	<i>Penicillium</i> sp.	0,1 U/L	0,1 U/L	0,2 U/L	0,1 U/L
29A	<i>Aspergillus</i> sp.	0,1 U/L	0,5 U/L	1,0 U/L	0,9 U/L
85A	<i>Aspergillus</i> sp.	0,1 U/L	0,4 U/L	0,6 U/L	1 U/L

CONCLUSÃO

Neste trabalho foi observado que os fungos que melhor produziram a Glicose Oxidase foram *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. Para definir os melhores produtores foram observadas duas variáveis: cinética e peso seco. Na cinética, observou-se que em 48h houve pico de produção da GOD; no peso seco, observou-se a produção da biomassa, onde foi possível observar que houve um resultado satisfatório na produção da enzima.

REFERÊNCIAS

- Barret, H.L.; Barry, B.H. 1972. *Illustrated genera of imperfect fungi*. Burgess publishing company. 3ed.
- Barros Neto, B.; Scarmínio, I.S.; Bruns, R.E. 1996. *Planejamento e Otimização de Experimentos*. 2ª edição. Ed. Unicamp, Campinas, SP, 299p.
- Guimarães, L.H. et al. 2006. Screening of filamentous fungi for production of enzymes of biotechnological interest. *Braz. J. Microbiol.*, 37(4) Dec.
- Nagel, F.J.I. 2002. *Process Control of Solid-State Fermentation, simultaneous control of temperature and moisture content*. PhD (Thesis) –University of Wageningen, Wageningen.
- Sotão, H.M.P.; Campos, E.L.; Costa, S.P.S.E. 2004. *Micologia. Diversidade dos fungos na Amazônia*. Sér. Cad. Alf. Cient., Vol. I.
- Tsuge, H.; Mitsuda, H. 1973. Studies on molecular complex of flavins IV. Activity and FAD-fluorescence change caused by the chemical modification of tryptophyl and tyrosyl residues in glicose oxidase. *J. Biochem.*, 73: 199-206.
- Watanabe, T. 2002. *Pictorial atlas of soil and seed fungi: morphologies of cultured fungi and key to species*/Tsuneo Watanabe.-2nd ed.
- Zimmer, K.R.; Borre, G.L. et al. 2009. Enzimas microbianas de uso terapêutico e diagnóstico clínico. *Revista Liberato*, 10(14): 123-137.