



Universidade Federal do Maranhão
Agência de Inovação, Empreendedorismo, Pesquisa,
Pós-Graduação e Internacionalização
Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto
Mestrado Acadêmico



**Purificação parcial e caracterização de uma amilase
estável de *Fusarium solani* e potencial aplicação na
indústria**

Fernanda Jeniffer Lindoso Lima

**São Luís
2023**

FERNANDA JENIFFER LINDOSO LIMA

**PURIFICAÇÃO PARCIAL E CARACTERIZAÇÃO DE UMA
AMILASE ESTÁVEL DE *Fusarium solani* E POTENCIAL
APLICAÇÃO NA INDÚSTRIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto da Universidade Federal do Maranhão para obtenção do Grau de Mestre em Saúde do Adulto.

Orientadora: Profa.Dra. Maria do Socorro de Sousa
Cartagenes

Coorientadora: Profa.Dra. Geusa Felipa de Barros
Bezerra

Coordenador: Marcelo Souza de Andrade

São Luís
2023

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Diretoria Integrada de Bibliotecas/UFMA

Lindoso Lima, Fernanda Jeniffer.

Purificação parcial e caracterização de uma amilase estável de *Fusarium Solani* e potencial aplicação na Indústria / Fernanda Jeniffer Lindoso Lima. - 2023.

74 p.

Coorientador(a): Geusa Felipa De Barros Bezerra.

Orientador(a): Maria do Socorro De Sousa Cartagenes.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Saúde do Adulto/ccbs, Universidade Federal do Maranhão, São Luís do Maranhão, 2023.

1. Amido. 2. Biotecnologia. 3. Enzimas. 4. Fermentação submersa. I. De Barros Bezerra, Geusa Felipa. II. De Sousa Cartagenes, Maria do Socorro. III. Título.

FERNANDA JENIFFER LINDOSO LIMA

**PURIFICAÇÃO PARCIAL E CARACTERIZAÇÃO DE UMA
AMILASE ESTÁVEL DE *Fusarium solani* E POTENCIAL
APLICAÇÃO NA INDÚSTRIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto da Universidade Federal do Maranhão para obtenção do Grau de Mestre em Saúde do Adulto.

A Banca Examinadora da Defesa de Mestrado, apresentada em sessão pública, considerou o candidato aprovado em: ____/____/____.

Prof. Dr. Maria do Socorro de Sousa Cartagenes
Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr. Geusa Felipa de Barros Bezerra
Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr. Talita Da Silva Esposito
IES ou PPG de fora do PPGSAD

Prof. Dr. Marcelo Souza De Andrade
Universidade Federal do Maranhão

Prof^a. Dr^a. Mayara Cristina Pinto Da Silva
Universidade Federal do Maranhão

Prof^a. Dr^a Flavia Castello Branco Vidal Cabral
Universidade Federal do Maranhão

Ao meu Deus que cuida de mim, conheces o meu coração e me coloca em lugares altos. À Ele toda a glória para sempre, amém!

Aos meus pais que sempre apoiaram minhas escolhas,

Aos meus irmãos pelos momentos felizes,

Ao meu querido esposo Fred, por me inspirar com a sua dedicação em tudo que faz,

Aos meus sobrinhos lindos Gustavo, Isadora e Benjamin, o amor verdadeiro de vocês me motiva.

AGRADECIMENTOS

A Deus agradeço por sua presença e graça, que foram os suficientes para prosseguir em segurança nessa jornada. Tudo ficou mais leve com você. Obrigada meu Pai celestial.

Agradeço a todos que, durante esses anos de vivência acadêmica, cruzaram meu caminho e, que de alguma forma, contribuíram para meu crescimento pessoal e profissional. A caminhada foi longa, por muitas vezes cansativa e dura, mas, sobretudo nesses momentos de dificuldade, nunca estive só.

À minha família, agradeço por todo amor, sempre presentes. Por todo investimento na minha educação, e pela compreensão das minhas ausências em virtude dela. Em especial, ao meu pai e minha mãe.

Agradeço a minha orientadora professora Socorro pela oportunidade e confiança. Por todo apoio, sempre atenciosa. A minha coorientadora, professora Geusa, por todos os ensinamentos que vão além da academia e por acreditar em mim para o desenvolvimento dessa pesquisa.

Aos colegas do Niba, pelos momentos compartilhados, por me ensinarem, sem querer, um tanto sobre a vida e sobre as pessoas. Agradeço aos que ajudaram ativamente na execução dessa dissertação: Katia, Rita e Karlene pela solicitude nas dúvidas científicas; Lila, Layana, Cristina, Carol, Diamantino, Nivea, Laís, Bruna, David, Flavio, Gabriel, Amanda, Carmen e Ivana pelos sorrisos compartilhados; e ao meu querido amigo incansável e brilhante Allysson pela parceria na execução de parte deste trabalho.

Agradeço a professora Talita Espósito em nome da equipe Laboratório de Micologia do Núcleo de Imunologia Básica e Aplicada (NIBA), pela acolhida e parceria científica inestimável.

Agradeço a todos que compõem o Departamento de Patologia. Aos professores do programa de Pós-graduação em Saúde do Adulto por compartilharem de seus conhecimentos, aos demais funcionários por todo auxílio e atenção, em especial à Edna, Nilson e Walbert.

Aos professores que compõem a banca examinadora, meu apreço pela disponibilidade e assistência na etapa final desta dissertação.

Aos laboratórios BIOAQUA, LEFISIO, LIAC e LPI pelo espaço cedido e apoio prestado.

Sou grata aos órgãos de fomento: FAPEMA, CAPES e PROCAD AMAZONIA pelo auxílio no financiamento da pesquisa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto - PPGSAD da Universidade Federal do Maranhão.

“A ciência é um quebra cabeça que Deus deu ao homem (cientista) para se divertir enquanto Ele prepara sua volta.”

RESUMO

As amilases são carboidrases amplamente distribuídas na natureza, podendo ser encontradas em animais, vegetais e micro-organismos. A amilase é usada principalmente na indústria farmacêutica como auxiliar digestivo, desbridamento, cicatrização de feridas e terapia anticâncer. Fungos filamentosos do complexo de espécies *Fusarium solani* são bons produtores de enzimas extracelulares. O objetivo deste trabalho foi avaliar uma fração parcialmente purificada de *Fusarium solani*, como fonte de enzimas biocatalizadoras de carboidratos para uso na indústria. Após a PCR e eletroforese a identificação molecular foi confirmada com o padrão de 560 pb para o fungo *Fusarium solani*. O extrato bruto obtido da fermentação submersa de *Fusarium solani* utilizando amido 6 %, foi submetido a purificação parcial realizada com sulfato de amônio em duas frações com graus de saturação diferentes: F1(0-40%) e F2 (40-80%). A amilase parcialmente purificada de F2 exibiu atividade específica de 4.603 U/mg de proteína. Após observar a alta atividade amilolítica nesta fração, realizou-se a caracterização físico-química das amilases. O pH e a temperatura ótimas para a atividade enzimática foram 4,5 e 95°C, respectivamente. Verificou-se que a estabilidade térmica da enzima se manteve após 1 h. A atividade amilolítica da F2 de *Fusarium solani* de foi inibida na presença dos elementos Fe^{3+} , Na^{+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Cl^{-} , Zn^{2+} , K^{+} nas concentrações 5 e 10 mM. A enzima purificada apresentou notável estabilidade em relação aos surfactantes (Triton X-100, Tween 20, Tween 80 e SDS). Na presença de EDTA a atividade de amilolítica da F2 foi levemente aumentada, sugerindo que esta enzima tem interação fraca com o reagente quelante. A amilase extremofílica foi estável na presença de vários solventes orgânicos como metanol, isopropanol, etanol e acetona. Estas propriedades indicam potenciais aplicações biotecnológicas desta enzima na indústria com produção ecologicamente correta.

Palavras chaves: Enzimas; fermentação submersa; amido; biotecnologia

ABSTRACT

Amylases are carbohydrases widely distributed in nature and can be found in animals, plants and microorganisms. Amylase is mainly used in the pharmaceutical industry as a digestive aid, debridement, wound healing and anti-cancer therapy. Filamentous fungi of the *Fusarium solani* species complex are good producers of extracellular enzymes. The objective of this work was to evaluate a partially purified fraction of *Fusarium solani* as a source of carbohydrate biocatalyst enzymes for use in the industry. After PCR and electrophoresis, the molecular identification was confirmed with the 560 bp pattern for the fungus *Fusarium solani*. The crude extract obtained from the submerged fermentation of *Fusarium solani* using 6% starch was subjected to partial purification carried out with ammonium sulfate in two fractions with different degrees of saturation: F1(0-40%) and F2 (40-80%). Partially purified F2 amylase exhibited specific activity of 4603 U/mg protein. After observing the high amyolytic activity in this fraction in relation, the physicochemical characterization of the amylases was carried out. The optimum pH and temperature for enzymatic activity were 4.5 and 95°C, respectively. It was found that the thermal stability of the enzyme was maintained after 1 h. The F2 amyolytic activity of *Fusarium solani* de was inhibited in the presence of the elements Fe³⁺, Na⁺, Ca²⁺, Mn²⁺, Cu²⁺, Cl⁻, Zn²⁺, K⁺ at concentrations of 5 and 10 mM. The purified enzyme showed remarkable stability in relation to surfactants (Triton X-100, Tween 20, Tween 80 and SDS). In the presence of EDTA the amyolytic activity of F2 amylases was slightly increased, suggesting that this enzyme has a weak interaction with the chelating reagent. Extremophilic amylase was stable in the presence of various organic solvents such as methanol, isopropanol, ethanol and acetone. These properties indicate potential biotechnological applications of this enzyme in industry, with ecologically correct production.

Keywords: Enzymes; submerged fermentation; starch; biotechnology

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Estrutura tridimensional da α -amilase pancreática de porco ilustrando os três domínios que compõem a estrutura da α -amilase. Domínio A – verde; domínio B – azul; domínio C – laranja.	7
2	Estrutura catalítica da α -amilase de porco. (β/α)8-barril ou TIM-barril composta por oito α -hélices intercaladas por oito β -folhas.	8
3	Representação do sítio ativo de uma α -amilase ilustrando os seus subsítios. Cada subsítio interage com uma unidade de glicose do substrato. A fenda catalítica da enzima está indicada pela seta lilás. A quantidade de subsítios varia entre diferentes organismos.	10
4	Estrutura a α -amilase pancreática de porco complexada com arcabose (preto) na fenda de ligação do substrato mostrando os domínios, resíduos catalíticos e sítios de cálcio e cloreto. Observam-se os domínios A, B e C, além dos resíduos catalíticos indicados por * (Asp197, cinza escuro, Glu233, cinza claro, Asp300, cinza médio), e a tríade protease-like (Glu27, cinza escuro, Ser340, cinza médio, His386, cinza claro) indicada por °.	11
5	Características morfológicas de <i>Fusarium solani</i> . a- – Macroconídeos e microconídeos; b- Conidióforo simples; c- Conidióforo como monofialides; d- Microconídeo em falsa cabeça; e- clamidósporo; f- Conidióforo ramificado g-Clamidósporo ramificado; h- Macroconídeo.	15

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	4
2	REFERENCIAL TEÓRICO	6
	2.1 Amilases	
	2.1.1 Estrutura enzimática	
	2.1.2 Sítios de cálcio	
	2.1.3 Substrato	
	2.2 Aspectos biotecnológicos e aplicações industriais	
	2.2.1 Amilases na indústria farmacêutica	
	2.3 Obtenção de enzimas a partir de fungos filamentosos	
	2.3.1 <i>Fusarium solani</i>	
	2.4 Purificação de enzimas de microorganismos	
	2.4.1 Caracterização de enzimas de microorganismos	
3	OBJETIVOS	18
	3.1 Objetivos Geral	
	3.2 Objetivos Específicos	
4	ARTIGO.....	19
	4.1 Introdução	
	4.2 Metodologia	
	4.2.1 Microorganismo Utilizado e Identificação Molecular por PCR	
	4.2.2 Preparação do Extrato Bruto e Purificação Parcial de Amilases de <i>Fusarium solani</i>	
	4.2.3 Determinação da Concentração de Proteínas Totais	
	4.2.4 Determinação da Atividade Enzimática	
	4.2.5 Propriedades físico-químicas	
	4.2.6 Efeito dos Íons Metálicos sobre as amilases de <i>Fusarium solani</i>	
	4.2.7 Efeitos de solventes orgânicos na estabilidade de amilases de <i>Fusarium solani</i>	
	4.2.8 Efeitos de Surfactantes e agente quelante sobre a estabilidade amilases de <i>Fusarium solani</i>	
	4.3 Resultados	
	4.3.1 Microorganismo Utilizado e Identificação Molecular por PCR	

	4.3.2 Purificação Parcial de Amilases de <i>Fusarium solani</i>	
	4.3.3 Propriedades físico-químicas sobre amilases de <i>Fusarium solani</i>	
	4.3.4 Efeito dos Íons Metálicos sobre as amilases de <i>Fusarium solani</i>	
	4.3.5 Efeitos de solventes orgânicos na estabilidade de amilases de <i>Fusarium solani</i>	
	4.3.6 Efeitos de surfactantes e agente quelante sobre a estabilidade amilases de <i>Fusarium solani</i>	
	4.4 Discussão	
	4.5 Conclusões	
	4.6 Agradecimentos	
	4.7 Referências	
5	CONCLUSÕES.....	44
6	REFERÊNCIAS	45
7	ANEXO A.....	51
.		
8	ANEXO B.....	64